



# UNIVERSITA' DI PISA

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

Tesi di Laurea

## Lotta biologica ad alcune *formae speciales* di *Fusarium oxysporum*

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giovanni Vannacci

Candidato:

Christian Frasconi

Correlatore:

Chiar.mo Prof. Alberto Pardossi

---

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

*Ai miei genitori per la loro  
infinita pazienza e per il loro  
continuo supporto.*

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1. LOTTA BIOLOGICA	2
1.1.1. Funghi agenti di lotta biologica	6
1.1.2. Altri organismi impiegabili nella lotta biologica a funghi fitopatogeni	12
1.1.3. Biofitofarmaci	13
1.2. IL GENERE <i>Trichoderma</i>	32
1.2.1 Meccanismi di azione di <i>Trichoderma</i> in lotta biologica	35
1.3. LE TRACHEOFUSARIOSI DEL POMODORO E DEL MELONE	37
1.3.1. La coltivazione del pomodoro	37
1.3.2. La coltivazione del melone	44
1.3.3. <i>Fusarium oxysporum</i> e le tracheofusariosi	48
<b>2. SCOPI DEL LAVORO</b>	<b>62</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>64</b>
3.1. MATERIALI	65
3.1.1. Substrati utilizzati per la crescita degli isolati fungini	65
3.1.2. Substrati utilizzati per la crescita e lo sviluppo delle piante	66
3.1.3. Isolati fungini	67
3.1.4. Colture vegetali	68
3.1.5. Macchinari impiegati	68

3.2. METODI	68
3.2.1. Test “ <i>in vivo</i> ” di controllo delle tracheofusariosi di pomodoro e melone e di promozione di crescita delle piante.	68
3.2.2. Prova di valutazione della competenza rizosferica e dell’endofitismo di isolati fungini di <i>Trichoderma</i> spp.	75
3.2.3. Prova di antagonismo “ <i>in vitro</i> ” e micoparassitismo	79
3.2.4. Analisi dei dati	82
<b>4. RISULTATI</b>	<b>83</b>
4.1. TEST “ <i>IN VIVO</i> ” DI CONTROLLO DELLE TRACHEOFUSRAIOSI DI POMODORO E MELONE E PROMOZIONE DI CRESCITA DELLE PIANTE	84
4.1.1. Prova di controllo biologico	84
4.1.2. Promozione di crescita	92
4.2. PROVA DI VALUTAZIONE DELLA COMPETENZA RIZOSFERICA E DELL’ENDOFITISMO DI ISOLATI DI <i>Trichoderma</i> spp. SU PIANTE DI POMODORO	98
4.3. PROVA DI ANTAGONISMO “ <i>IN VITRO</i> ” E MICOPARASSITISMO	109
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>132</b>
<b>6. CONCLUSIONE</b>	<b>148</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>149</b>



# **1 Introduzione**

### 1.1 Lotta biologica

L'agroecosistema è un ecosistema finalizzato all'ottenimento di una produzione agricola e in cui si svolgono le attività proprie dell'agricoltura. In questo sistema ecologico l'uomo definisce la composizione della biocenosi e regola la funzionalità del sistema, modificando la disponibilità delle risorse ambientali. I prodotti che l'agricoltura fornisce alla società umana tramite, la coltivazione dei vegetali, non sono solo quelli alimentari, che tuttavia rappresentano la parte principale, ma anche tutti quelli che fanno parte del comparto detto "no food" come: prodotti per l'alimentazione animale, fibre per l'industria tessile, legname da ardere o da costruzione, composti per uso farmaceutico, resine e gomme per l'industria chimica, pigmenti per l'industria tintoria, materie prime per le cartiere, olii per uso industriale, piante ornamentali. A tutti questi si aggiungono i prodotti derivanti dall'allevamento animale, alimentari e non. L'agricoltura nasce nel neolitico con il passaggio dell'uomo da semplice raccoglitore di alimenti già presenti in un ecosistema naturale a coltivatore su di una ben definita superficie di terreno di una ben definita popolazione vegetale, divenendo così un manipolatore dei processi di formazione della sostanza organica vegetale ed animale. Pertanto, da semplice componente dell'ecosistema al pari di ogni altro essere vivente, l'uomo, modificando e trasformando la biocenosi e il biotopo naturali, assume ora il ruolo di creatore e gestore di sistemi ecologici particolari : gli agroecosistemi.

I principi di base che regolano la struttura e la funzionalità di un agroecosistema sono simili a quelli osservabili in un ecosistema naturale. Si ha infatti, la contemporanea presenza di sostanze biotiche e abiotiche, che sono tra loro interdipendenti e interagenti. Attraverso queste due componenti fondamentali si svolge il ciclo della materia e il flusso di energia. L'importante differenza tra questi due sistemi ecologici consta nel fatto che, in un agroecosistema, l'azione dell'uomo è il fattore ecologico dominante che condiziona e caratterizza l'intero sistema. Infatti, negli ecosistemi naturali la capacità produttiva della biocenosi è direttamente correlata con l'insieme delle condizioni ambientali in cui si trova ed è limitata da queste. Negli agroecosistemi ,invece, la relazione tra la produzione vegetale e le caratteristiche ambientali è molto meno stretta ed il limite produttivo imposto dal biotopo viene

## Introduzione

comunemente superato, in quanto l'agricoltore utilizza mezzi tecnologici a sua disposizione per diminuire l'incidenza dei fattori ecologici limitanti la produzione, aumentare la quantità di risorse naturali presenti nel biotopo e aumentare l'efficienza di utilizzazione delle risorse da parte sia dei singoli individui che dell'intera biocenosi.

L'agroecosistema fornisce, pertanto, una biomassa "utile" per unità superficie superiore a quella di un ecosistema naturale, permettendo ad un più elevato numero di persone di vivere su di esso. Un ecosistema modifica continuamente nel tempo la sua biocenosi, in primo luogo per raggiungere lo stadio di climax e in secondo luogo, una volta che l'ha raggiunto, per rimanerci in maniera sempre più efficiente e stabile, aumentando la sua capacità omeostatica. Questo processo implica, nelle prime fasi, un continuo aumento del numero delle specie presenti nei diversi anelli della catena alimentare e successivamente una loro continua sostituzione con altre. Nell'agroecosistema la tecnica colturale è finalizzata ad eliminare, per quanto possibile, piante infestanti, organismi fitofagi e parassiti. Ne consegue che la biodiversità in un agroecosistema è sempre molto ridotta. Inoltre, in certi momenti stagionali, sono presenti numerose nicchie ecologiche libere, come nelle prime fasi di sviluppo delle colture o nel periodo intercorrente tra la raccolta di una coltura e la semina di quella che la segue nell'avvicendamento. Gli agroecosistemi presentano, quindi, le caratteristiche degli ecosistemi in accrescimento e sono di conseguenza continuamente oggetto di migrazione da parte di specie vegetali e animali, che qui trovano un'ampia disponibilità di risorse ambientali per il loro accrescimento e una ridotta competizione.

Nel mondo, escludendo le specie legnose utilizzate per la produzione di legno, cento specie (distribuite in trentasette famiglie botaniche diverse) sono considerate "colture principali", altre ottantuno specie (distribuite in quarantacinque famiglie), sono considerate "colture minori". La ridotta diversità biotica degli agroecosistemi costituisce un fattore di vulnerabilità alle variazioni dei fattori ambientali, aumentando il grado di instabilità del sistema. L'elevato numero di specie presenti in ciascun anello della catena alimentare di un ecosistema naturale costituisce, per questo, un'assicurazione verso un'improvvisa variazione di un qualsiasi fattore ambientale, specialmente di tipo biotico. Le formazioni agrarie, pertanto, a parità di condizioni pedoclimatiche hanno una capacità omeostatica nettamente inferiore

rispetto agli ecosistemi naturali. Se però prendiamo in considerazione l'agroecosistema includendovi il fattore ecologico "agricoltore", che ne è in realtà parte integrante, il sistema acquista capacità di autoregolazione e di stabilità, dovuta al continuo monitoraggio dell'ambiente a cui, ove se ne presenti la necessità, segue tutta una serie di interventi tecnici correttori. La tecnica agronomica, in definitiva, non è altro che una continua sequenza di interventi di "feedback", che si aggiungono o sostituiscono quelli naturali, indirizzandosi verso la stabilità del sistema.

L'agricoltura moderna basata sulla coltivazione di un limitato numero di colture, per lo più diffuse su aree piuttosto vaste rappresenta un sistema ecologicamente sbilanciato che favorisce la diffusione di malattie epidemiche. Le preoccupazioni dell'opinione pubblica verso le problematiche legate all'impiego di prodotti chimici, hanno consentito di individuare strategie di difesa alternative, riscoprendo tra l'altro la lotta biologica.

Con il termine lotta biologica si definisce, nella difesa fitosanitaria, l'uso di agenti biotici (virus, batteri, funghi, piante superiori, protozoi, nematodi, acari, insetti, etc.) per contenere le popolazioni di organismi potenzialmente dannosi al di sotto di soglie di dannosità economica.

Gli interventi di lotta biologica si classificano in tre categorie:

- metodo propagativo, che si prefigge di contenere in modo permanente un organismo nocivo di origine esotica, mediante l'introduzione di fattori biotici da quei determinati ecosistemi, che sono ritenuti originari delle specie da contenere.
- metodo inondativo, che prevede la distribuzione in massa di agenti biotici di controllo allo scopo di realizzare un rapido decremento della popolazione dell'organismo dannoso, paragonabile a quello ottenibile con l'uso dei fitofarmaci.
- metodo protettivo, che prevede la protezione e il potenziamento dell'azione svolta dai nemici naturali presenti negli agroecosistemi, mediante la periodica inoculazione di organismi già introdotti o la modificazione di pratiche colturali sfavorevoli a questi.

All'interno della lotta biologica il metodo protettivo appare essere, dal punto di vista ecologico, quello più corretto per la gestione e il controllo dei fitopatogeni. Infatti, si cerca di rendere l'agroecosistema più simile, in termini di biodiversità, ad un

## Introduzione

ecosistema naturale, in modo che in esso alberghino stabilmente gli organismi antagonisti dei patogeni. L'aumento della biodiversità avvicina il sistema ad un equilibrio meno fragile, perché aumentano resistenza e resilienza (Odum,1983).

Il concetto di malattia può essere espresso come l'interazione tra tre fattori; il patogeno, l'ospite suscettibile e l'ambiente. Questo concetto può essere ben rappresentato da un triangolo ai cui vertici siano collocati i tre fattori. Alcuni autori aggiungono un'ulteriore componente: per alcuni il quarto fattore consisterebbe nell'insieme dei microrganismi antagonisti, per altri invece il quarto fattore sarebbe rappresentato dal tempo (Matta 1996) in quanto gli antagonisti sarebbero parte integrante dell'ambiente. Quindi, la rappresentazione ideale del concetto di malattia non sarebbe più una figura piana, ma una figura solida, il tetraedro ai cui vertici si posizionano i quattro fattori. (Fig. 1)

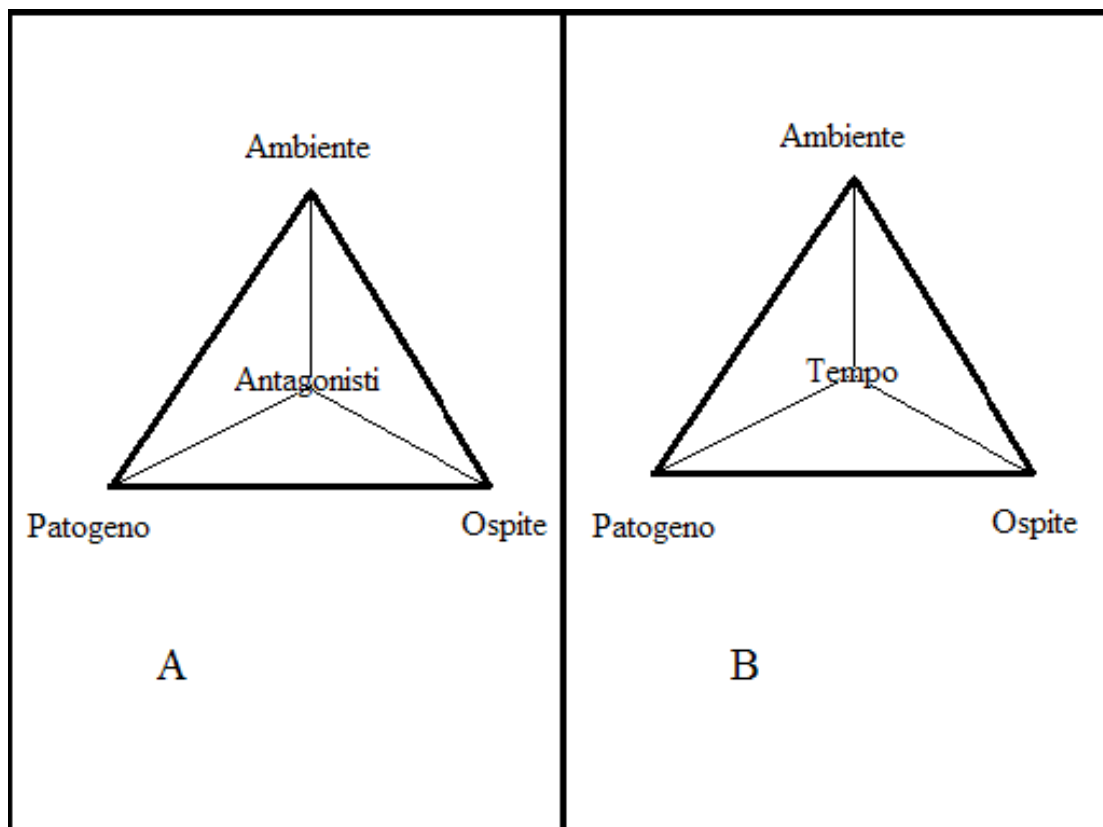


Fig.1.1 : Tetraedro idealmente rappresentante il concetto di malattia in cui il quarto fattore è rappresentato dagli antagonisti (A) o dal fattore tempo (B) [Matta 1996]

In ambito agrario, la necessità di contrastare la malattia al fine di ridurre quanto più possibile le perdite causate alle piante coltivate giustifica gli interventi di difesa. Per molto tempo la difesa delle colture agrarie si è basata sull'uso di prodotti chimici di sintesi che, pur aumentando le rese delle colture, ha prodotto effetti collaterali negativi quali inquinamento ambientale rottura degli equilibri ecologici, sviluppo di specie resistenti e danni alla salute umana.

### 1.1.1 I Funghi agenti di lotta biologica

Nella lunga storia biologica del pianeta, i funghi si sono adattati a trarre nutrimento da una vasta varietà di habitat. Durante questa evoluzione la competizione con altri organismi per fonti di nutrimento e spazio, è stata la causa che ha provocato, da parte dei funghi, lo sviluppo di quei meccanismi di antagonismo o soppressione dei loro competitori. Può accadere che la fonte di nutrimento di un fungo o l'organismo con cui compete con successo per spazio e nutrimento, sia un'entità biologica direttamente o indirettamente dannosa per le piante. In tal caso questo fungo potrebbe avere le potenzialità di essere utilizzato come un agente di controllo biologico (Burge, 1988). I possibili obiettivi dei funghi utilizzati in lotta biologica sono: artropodi, nematodi, funghi e piante superiori. Si escludono, infatti: virus, viroidi, fitoplasmii e batteri. I meccanismi di azione antagonista svolta dai microrganismi agenti di controllo biologico verso i patogeni vegetali si possono classificare in : predazione, parassitismo, competizione, antibiosi e induzione di resistenza. Un organismo antagonista può anche attuare contemporaneamente più di uno tra questi meccanismi: per esempio molti isolati di *Trichoderma*, fra i funghi antagonisti più studiati nel campo della lotta biologica, esplicano un'azione sia di competizione, sia di parassitismo che di antibiosi.

- Predazione.

La predazione è, in generale, un rapporto trofico che si instaura tra due popolazioni di organismi, una definita predatrice e l'altra preda: gli individui predatori attaccano direttamente le prede e si nutrono di esse (Odum, 1983). La predazione è un fenomeno estremamente comune in natura e gli organismi predatori e prede possono appartenere sia al regno animale, sia al regno vegetale, sia al regno dei funghi. Sono noti diversi esempi di funghi tellurici coinvolti in rapporti di predazione con altri

organismi non fungini che risiedono nella rizosfera, in cui il fungo può essere sia predatore sia preda. Tra i funghi predatori, sono conosciuti alcuni Deuteromiceti, alcuni Zigomiceti e Oomiceti che svolgono attività di predazione nei confronti dei Nematodi che sono causa di numerose malattie delle piante .

- Parassitismo

Le relazioni simbiotiche da cui solo uno dei bionti trae vantaggi sono le simbiosi parassitarie e le simbiosi commensalistiche. Un parassita è un organismo o un'entità virale che sta dentro, attaccato, o in intima associazione con un altro organismo vivente, dal quale trae una parte essenziale del materiale per la sua esistenza, senza conferire alcun beneficio in cambio. Ci sono funghi che parassitizzano alghe, piante superiori, artropodi, nematodi, ed altri funghi. Questi ultimi si definiscono micoparassiti. Se l'ospite è già un parassita, l'organismo che vive a sue spese si definisce iperparassita. La maggior parte dei funghi micoparassiti sono necrotrofi o biotrofi distruttivi (probabilmente i più interessanti come agenti di biocontrollo). Altri funghi sono invece biotrofi bilanciati e la loro utilità nella funzione di biocontrollo appare leggermente inferiore ai precedenti. L'ecologia e la fisiologia del micoparassitismo necrotrofico è stata accuratamente studiata e più precisamente riguardo al complesso dei processi coinvolti nel micoparassitismo da parte di funghi appartenenti al genere *Trichoderma*. Molti studi si sono concentrati sulla fisiologia e sui processi biochimici che portano alla colonizzazione dei funghi ospiti da parte dei micoparassiti. Alcuni degli eventi come i fenomeni di riconoscimento, appaiono simili a quelli già dimostrati nelle interazioni parassitiche fungine verso le piante. Altri processi differiscono per gli enzimi coinvolti, poichè componenti della parete cellulare di alcuni funghi differiscono da quelli che compongono quelle delle piante superiori. Nelle colture duali si possono talvolta osservare avvolgimenti ifali attorno alle ife dell'ospite. Queste strutture prendono il nome di coilings. Questo fenomeno non è dovuto ad un tigmotropismo, bensì al chemiotropismo in cui le agglutinine sembrano essere le principali indiziate per spiegare questo meccanismo.

Quando un ospite viene avvicinato, il micoparassita può formare strutture ad uncino che probabilmente fungono da appressori. Queste strutture possono coadiuvare la penetrazione nella cellula ifale dell'ospite, come avviene in molte relazioni parassitiche tra funghi e piante. Alcuni micoparassiti penetrano la parete cellulare dell'ospite con azioni meccaniche, altri con azioni enzimatiche e, in questi casi, le

zone degradate della parete dell'ifa dell'ospite si trovano sotto gli avvolgimenti ifali. Alcuni funghi sono specializzati nella distruzione di organi di resistenza di altri funghi, in particolare di sclerozi prodotti da patogeni come *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfii* e *Botrytis cinerea*. *Coniothyrium minitans* e *Sporidesmium sclerotivorum*, ad esempio, parassitizzano gli sclerozi di *Sclerotinia* spp., mentre *Laetisaria arvalis* è in grado di parassitizzare strutture di sopravvivenza di *Rhizoctonia solani* e di *Pythium ultimum* (Cook e Baker, 1983). Il micoparassitismo può essere utilizzato per ottenere vantaggi contro i fitopatogeni in un vasto numero di agroecosistemi, ma deve essere posto in associazione ad una corretta gestione dei parametri ecologici.

- Competizione.

I microrganismi competono per nutrienti minerali e organici per proliferare e sopravvivere nel suolo. Per la germinazione e la penetrazione nel sito di infezione molti funghi fitopatogeni richiedono fonti di nutrimento esterne, in altri casi i propaguli fungini possono avere riserve endogene adeguate per dare inizio all'infezione, oppure possono essere associati ad un ospite già infettato che può fornire substrato per aumentare il potenziale inoculo. In tutti questi casi esiste la possibilità di sfruttare la competizione degli agenti di biocontrollo, in modo tale che i patogeni siano privati di elementi essenziali per il completamento del processo di infezione o del loro ciclo vitale. La competizione tra i microrganismi si verifica per i nutrienti, particolarmente per determinati carboidrati ad alta energia, ma anche per l'azoto. Ci può essere competizione anche per spazio e ossigeno, ma non per il potenziale idrico, la temperatura o il pH, che però rappresentano fattori ambientali altamente selettivi. Molti presumono che i microrganismi competono anche per l'acqua, ma ciò non è corretto, (Baker e Snyder 1965). Affinché esista competizione per l'acqua, i microrganismi dovrebbero consumare quantità di acqua tali da abbassare l'umidità relativa dell'ambiente che li circonda, rendendola un fattore limitante. Ciò non avviene, come del resto non si verifica una modificazione della temperatura circostante a causa del loro assorbimento di calore.

I principali elementi che i patogeni tellurici necessitano per la germinazione dei propaguli e la penetrazione nei tessuti dell'ospite sono, carbonio, azoto e ferro. L'attenzione dei ricercatori si è concentrata sul ferro, più precisamente in relazione a quei composti ferro-leganti chiamati siderofori. Questi composti, che sono capaci di



legare lo ione  $\text{Fe}^{3+}$ , sono prodotti sia dalle piante superiori, sia dai microrganismi. Il Ferro nei vegetali manifesta le sue funzioni in tutti i più importanti processi metabolici ossido-riduttivi (fotosintesi, respirazione). Inoltre è un elemento indispensabile per la sintesi proteica. Il ferro è presente in grande abbondanza nella crosta terrestre, dove occupa il quarto posto per contenuto percentuale. Non è certamente la mancanza di ferro a provocare fenomeni di carenza, quanto quella di forme assimilabili per la vegetazione. Infatti, in condizioni aerobiche e di pH neutro, esso tende a formare idrossidi altamente insolubili che lo rendono disponibile per gli organismi viventi solo a concentrazioni inferiori a  $10^{-18}$  M.

Nei funghi, le ife assorbono il ferro con meccanismi diversi rispetto a quelli impiegati per gli altri nutrienti minerali. Infatti, in alcuni casi, l'assimilazione avviene mediante emissione siderofori, che sono capaci di legare il ferro intrappolandolo, e quindi sottraendolo all'ambiente. Questi si legano al ferro, e successivamente vengono riassorbiti mediante una proteina di membrana specifica. I siderofori possono essere classificati strutturalmente come idrossammati o catecolati. La varietà di siderofori prodotti da un organismo può essere ristretta ad una particolare famiglia strutturale, ma in molti casi i funghi sintetizzano siderofori di differenti famiglie strutturali. I batteri appartenenti alle specie *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, che colonizzano la rizosfera, producono siderofori sia del tipo idrossammato che catecolato. I composti chelanti, prodotti dai funghi, rientrano nella categoria degli idrossammati. È essenziale che la disponibilità di ioni  $\text{Fe}^{3+}$  sia a concentrazioni basse nella rizosfera. Infatti i siderofori vengono prodotti quando la disponibilità di questo ione è molto bassa, questo assicura una feroce competizione per l'elemento. Bassi livelli di  $\text{Fe}^{3+}$  sono caratteristici dei suoli alcalini, questo fornisce una parziale spiegazione della soppressività dei terreni della Salinas Valley californiana nei confronti di patogeni tellurici appartenenti al genere *Fusarium* (Baker 1992).

- L'antibiosi.

Quando si ebbe il risveglio dell'interesse scientifico per le tecniche di biocontrollo, la maggior parte dei ricercatori saltò repentinamente alla conclusione che la produzione di antibiotici da parte degli organismi antagonisti forniva una logica spiegazione per questo meccanismo. L'antibiotico è un metabolita diffusibile prodotto da un microrganismo che riesce ad inibire il normale sviluppo di un altro microrganismo a concentrazioni pari a  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  o inferiori. Sono, quindi, composti altamente attivi

con bersagli cellulari specifici (Deacon 2000). Successivamente, ci si rese conto, che non esistevano prove evidenti per supportare la tesi che gli antibiotici prodotti in laboratorio dagli antagonisti, esercitassero un effetto significativo nelle condizioni naturali. L'antibiosi che si evidenzia in colture duali su piastre Petri non è correlabile con la capacità di controllo in campo della malattia da parte dei potenziali antagonisti. Infatti, la produzione di antibiotici è direttamente correlata con la ricchezza del substrato di crescita. Diversamente la vita dei microrganismi tellurici è caratterizzata da prevalente carenza di sostanze nutritive, intervallata da brevi periodi di attività in condizioni saprofitiche o parassitarie (Baker 1992). Inoltre, una volta prodotti, gli antibiotici potrebbero legarsi a particelle di argilla, inattivandosi (Pink *et al.*, 1961a, b). Ci sono prove che questi potrebbero anche essere utilizzati come substrato da qualche altro microrganismo (Baker 1992). Queste considerazioni portano alla conclusione che la funzione degli antibiotici all'interno di un ecosistema è un metodo difensivo per mantenere il possesso di un substrato relativamente ricco. Una strategia adottata nel biocontrollo consiste nel manipolare questi antagonisti affinché producano antibiotici, non solo per la loro sopravvivenza ma soprattutto per interferire con l'attività del patogeno nel sito d'infezione, oppure sovrapponendosi a questo nella crescita saprofitica. L'antibiosi si manifesta con la mancata germinazione dei propaguli fungini e con ritardi nella crescita dei miceli patogeni (Agrios, 1997). Diversi studi in vitro, per esempio, hanno rilevato che *T. viride*, *T. harzianum* e *Gliocladium* spp. producono sostanze volatili e non volatili capaci di inibire fortemente lo sviluppo miceliare di importanti patogeni appartenenti ai generi *Rhizoctonia*, *Phythium*, *Fusarium* (Lynch, 1990).

- Induzione di resistenza.

Alcuni dei più affascinanti fenomeni osservati negli studi condotti sul controllo biologico sono gli effetti della resistenza di un ospite vegetale, indotta da agenti biotici capaci di colonizzarne i tessuti, nei confronti di un patogeno a cui era inizialmente suscettibile. Esempi includono la riduzione della severità di malattie tracheomicotiche, ottenuta grazie ad una precolonizzazione dei tessuti vegetali dell'ospite con specifici ceppi non patogenetici appartenenti al genere *Fusarium*. I meccanismi coinvolti in questo sistema sono complessi e hanno basi molecolari e fisiologiche come la protezione attraverso lectine, l'aumento della attività perossidasi e della lignificazione, la produzione di fitoalessine. La resistenza indotta

coinvolge l'attivazione di sistemi di difesa delle piante finalizzati alla protezione della pianta dai patogeni (Ouchi 1983, Boller 1989). Il riconoscimento del segnale del potenziale patogeno da parte della pianta ospite è un fattore chiave dell'induzione di resistenza, tra le interazioni ospite-patogeno. La letteratura scientifica afferma che gli induttori o gli elicitori della risposta difensiva sono prodotti direttamente dal patogeno o possono essere il risultato dell'interazione ospite patogeno (Boller 1989). E' importante notare che, specialmente per i patogeni tellurici, il patogeno e la pianta raramente interagiscono in assenza di altri organismi. Le risposte difensive indotte dall'interazione tra le piante con i microrganismi possono rimanere localizzate o diventare sistemiche. L'induzione di una resistenza sistemica può coinvolgere sia l'apparato epigeo che l'apparato ipogeo. Wyss *et al.* (1992) hanno osservato che un isolato di *Trichoderma harzianum* ha indotto un accumulo di fitoalessine e gliceolline nei tessuti radicali di soia, ma questo non assicurava protezione ad attacchi del patogeno *Rhizoctonia solani*. Zimand *et al.* (1996) hanno provato che il *Trichoderma harzianum* ceppo T39 ostacola gli effetti di *Botrytis cinerea* sulle foglie di pisello a causa della minor attività degli enzimi pectolitici del patogeno. Secondo gli autori la minor attività delle poligalatturonasi del patogeno potrebbe essere il risultato di un accumulo di oligogalatturonidi che fungono da elicitori nella difesa della pianta.

Molte specie di *Trichoderma* producono elicitori che inducono risposte difensive nei tessuti delle piante (Andersonn *et al.* 1993; Calderon *et al.* 1993M; Ishii 1997). Una xilanasi di 22kDa, prodotta da *Trichoderma viride* in coltura su mezzi liquidi contenenti D-xilosio e xilani, come fonte primaria di carbonio, induce risposte difensive da parte delle piante come la concentrazione di ioni  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $H^+$  (Bailey *et al.* 1992), la sintesi di etilene (Fuchs *et al.* 1989), la glicosilazione e l'acilazione dei fitosteroli (Moreau *et al.* 1994). Il modello proposto da Anderson *et al.* (1993), postula che questa xilanasi si leghi ad un recettore di membrana da questo, attraverso una catena di traduzione del segnale, sarebbe poi indotta la risposta "like-hipersensitive".

### 1.1.2 Altri organismi impiegabili nella lotta biologica a funghi fitopatogeni.

Oltre ai funghi esistono altri microrganismi o entità, che possono agire come antagonisti di funghi fitopatogeni. Ad esempio i micovirus e gli insetti micofagi potrebbero esercitare un contenimento naturale sullo sviluppo dei funghi. Potenzialmente potrebbe esistere la possibilità di un loro utilizzo, in certe condizioni, come agenti di biocontrollo. Tra i micovirus, quelli che possano esercitare degli effetti dannosi sui funghi agenti causali di malattia delle piante, potrebbero essere impiegati come mezzi di controllo biologico (Ghabrial 1980). Infatti, coinoculando ceppi infetti dal virus, che abbiano una compatibilità vegetativa con il fungo patogeno, ci sarebbe la possibilità di trasmettere a questo la virosi, con la speranza che lo stato infettivo neoindotto possa causare la diminuzione della sua attività patogenetica.

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse degli studiosi per quegli organismi della rizosfera che si nutrono di funghi: varie specie di insetti, di nematodi predatori, di protozoi ed amebe che utilizzano i funghi fitopatogeni come fonte di cibo.

Alcuni recenti studi hanno messo in evidenza che i collemboli si nutrono del micelio di funghi fitopatogeni e si è ipotizzato un loro eventuale utilizzo nella lotta biologica. L'interazione tra questi animali e i funghi fitopatogeni è però complicata dall'effetto letale che alcuni funghi patogeni hanno sui collemboli (Crossley *et al.*, 1989; Lartey *et al.*, 1994; Sabatini e Innocenti, 1995).

Più promettente, senza dubbio, è l'utilizzo di batteri antagonisti per controllare i fitopatogeni fungini sui tessuti danneggiati delle piante sia nella rizosfera che nel filloplano. I generi di maggior interesse in questo campo sono *Pseudomonas* e *Bacillus*. I meccanismi antagonistici di alcuni batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, possono essere ragionevolmente ascritti alla competizione. Durante la germinazione delle spore dei funghi fitopatogeni, infatti, si verifica una perdita di soluti endogeni verso l'esterno da parte del tubo germinativo. Questi soluti divengono un vero e proprio substrato preferenziale per la crescita dei batteri; ciò è dimostrato dall'aumento della popolazione dei batteri nelle immediate vicinanze delle spore fungine (Fraser 1971). Questo fenomeno provoca un'inibizione del completo processo di germinazione delle spore fungine. Infatti, in assenza di batteri, la perdita

di soluti nutrienti endogeni verrebbe riassorbita dai conidi, contribuendo al completamento della germinazione (Brodie e Blakeman 1977). In natura, la perdita di nutrienti da parte dei conidi potrebbe avere una minor importanza, perché i nutrienti sarebbero disponibili esogenamente dalla superficie della pianta, tuttavia l'attività competitiva dei batteri potrebbe restringere notevolmente la disponibilità di nutrienti per le spore. Specie di batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, isolate dal filloplano di piante di *Beta vulgaris* L. var. *cruenta* sono risultate essere particolarmente attive sia per l'attività competitiva nell'assorbimento degli aminoacidi, sia nell'inibizione della germinazione di conidi di *Botrytis cinerea* e di altri patogeni necrotrofici come *Phoma betae* e *Cladosporium herbarum* (Brodie e Blakeman 1975). Specie di batteri appartenenti al genere *Bacillus* contrastano i funghi fitopatogeni principalmente con due meccanismi, il parassitismo e la produzione di antibiotici. *Bacillus pumilus* riduce marcatamente l'infezione di *Puccinia recondita* quando è applicata sulle foglie. Il batterio sembra, infatti, capace di indurre una lisi del tubo germinativo delle uredospore mediante la produzione di sostanze ad azione litica termostabili (Morgan, 1963). Altri isolati di *Bacillus* spp. hanno un effetto simile, l'azione litica non si limita però al tubo germinativo delle uredospore, ma si estende anche ad altre strutture di fruttificazione caratteristici delle ruggini, come i picnidi, gli ecidi e gli uredosori (Levine *et al.*, 1936). Gli antibiotici sono implicati nella maggior parte delle interazioni antagonistiche che coinvolgono il *Bacillus subtilis*, McKeen *et al.* (1986) hanno estratto quattro polipeptidi ciclici da filtrati di coltura di *Bacillus subtilis*, mediante precipitazione dopo un'acidificazione e un'estrazione con etanolo. Il composto era attivo contro una vasta gamma di funghi fitopatogeni. Loeffler *et al.* (1986) hanno individuato due antibiotici dal *Bacillus subtilis*. Uno, è un dipeptide chiamato bacilysina, inibisce lieviti e batteri, l'altro la fengymicina è un complesso di lipopeptidi, è attivo contro i funghi filamentosi. La fengymicina è risultata essere maggiormente attiva nel controllo di certi patogeni come *Rhizoctonia solani* su riso.

### 1.1.3 Biofitofarmaci

Con il termine biofitofarmaci si intendono quei prodotti fitosanitari i cui principi attivi sono costituiti da microrganismi viventi. Come è facile intuire, uno dei maggiori punti di forza di questi prodotti è la sicurezza ambientale. Nei prodotti tradizionali il principio attivo è un composto chimico naturale o di sintesi. Nella maggior parte dei casi si tratta di molecole non biodegradabili che si accumulano a vari livelli della catena trofica. L'accumulo di queste sostanze chimiche determina la riduzione delle popolazioni di determinate specie causando un'alterazione dell'ecosistema. Nel caso dei biofitofarmaci, invece, il principio attivo è un microrganismo vivente. I microrganismi che costituiscono il principio attivo dei biofitofarmaci possiedono una specificità di azione contro il patogeno, per questo motivo l'impatto sugli organismi non target è limitato, se non assente. Ed è per questo stesso motivo che i biofitofarmaci non presentano rischi concreti contro gli esseri umani. Uno degli aspetti più vantaggiosi nell'impiego dei biofitofarmaci è la scarsa tendenza ad indurre lo sviluppo di organismi target resistenti. Questa proprietà è strettamente correlata alla natura dell'interazione antagonistica, che essendo basata su più di un meccanismo d'azione rende difficile lo sviluppo di individui resistenti. Nonostante i numerosi vantaggi derivanti dal loro impiego, i biofitofarmaci non presentano una significativa diffusione. Uno tra i principali motivi è senza dubbio lo sfavorevole confronto con i composti organici di sintesi caratterizzati da efficacia immediata, effetto abbattente, ampio spettro d'azione, facilità di preparazione ed applicazione. Uno tra gli svantaggi più significativi è la limitata efficacia biologica, infatti, l'impiego dei biofitofarmaci è possibile quando la pressione della malattia non è ancora troppo elevata, altrimenti il microrganismo è incapace di contenere la popolazione target. Questo limite è dovuto ad una lentezza del fitofarmaco nel produrre effetti. Questa lentezza è intrinseca alla natura biologica del principio attivo. Il microrganismo infatti, ha bisogno di tempo per svilupparsi ed agire nel contenimento della popolazione infestante. I biofitofarmaci, inoltre, presentano uno spettro d'azione assai più ridotto rispetto ai prodotti di sintesi. Questo, per l'utilizzatore, si traduce in uno svantaggio economico sia diretto, dovuto all'acquisto di un numero maggiore di prodotti per combattere specie diverse che invece potrebbero essere controllate con un singolo prodotto chimico, sia indiretto dovuto alla necessità di effettuare un numero maggiore

di trattamenti. Un altro svantaggio proprio dei biofitofarmaci riguarda la durata e le condizioni di conservazione. Per quanto concerne la durata, si fa riferimento alla shelf life, che è il numero di mesi a cui corrisponde una sopravvivenza del 50% dei propaguli. La shelf life dei biofitofarmaci non può essere inferiore ai 18 mesi, mentre l'ideale sarebbe di 2 - 4 anni. La shelf life dipende da molti fattori, primo tra tutti dalla specie fungina e, più precisamente, dipende dalle strutture svernanti che è capace di produrre. Prioritario è anche il ruolo rivestito dalla temperatura e dall'umidità presenti, tanto nella fase di produzione che in quella di conservazione. I possibili campi di impiego dei biofitofarmaci sono: patogeni vegetali (con l'esclusione di virus, viroidi e fitoplasmi), erbe infestanti, artropodi fitofagi e nematodi parassiti.

### **La Brevettazione**

Quando un produttore possiede un microrganismo utile per la lotta biologica ha due possibilità concrete per trarne profitto: la brevettazione e la registrazione. Affinchè possa vendere il microrganismo come prodotto fitosanitario è obbligato a registrarlo, mentre si può avvalere dell'istituto brevettuale quando voglia proteggere il microrganismo come proprietà intellettuale. Le due vie non sono alternative e la registrazione è essenziale altrimenti la vendita del prodotto non sarebbe legalmente possibile. Il brevetto è un documento tecnico-legale che descrive il contenuto di un'invenzione della quale si intende proteggere l'utilizzazione finale. Tramite il brevetto si concede un diritto esclusivo di utilizzo dell'invenzione e si assegna all'inventore il privilegio di usufruire del profitto che ne deriva. Chi voglia utilizzare tali diritti privativi brevettando un microrganismo può seguire due strade: il Brevetto Nazionale (italiano, francese, tedesco, etc.) o il Brevetto Europeo. I due brevetti sono molto simili, rifacendosi alle stesse normative, ma presentano differenze per quanto riguarda l'estensione territoriale della protezione e i costi.

### **Cenni storici sui brevetti riguardanti microrganismi**

L'Istituto brevettuale classico riguarda la "tutela giuridica della proprietà intellettuali e delle invenzioni". Occorre precisare la differenza tra invenzione e scoperta.

L'invenzione è "qualcosa di nuovo alla cui identificazione partecipa l'attività inventiva dell'uomo", mentre la scoperta si riferisce "al rinvenimento di qualcosa di nuovo che già esiste in natura".

Allo stato dell'arte giuridico, per brevettare un microrganismo si deve fare riferimento alla Convenzione di Monaco sul Brevetto Europeo (CBE) sancita il 5 ottobre 1973.

La concessione del brevetto può riguardare prodotti e procedimenti. La convenzione di Monaco stabilisce, dall'articolo 52 al 57, l'oggetto del brevetto. Esso riguarda ogni nuovo prodotto o procedimento in qualsiasi settore della tecnica, esclusi procedimenti terapeutici sul corpo umano o animale e nuove varietà animali e vegetali ottenute con metodi essenzialmente biologici.

L'invenzione deve avere i caratteri di novità, attività inventiva, industrialità e riproducibilità.

- **Novità:** deve essere assoluta, poichè ogni divulgazione anteriore alla data di deposito della domanda di brevetto o alla data di priorità può rendere nullo il brevetto
- **Originalità:** è il requisito che considera l'attività inventiva; essa deve sussistere al momento del deposito della domanda di brevetto a giudizio di un esperto del ramo che è a conoscenza dello stato dell'arte.
- **Industrialità:** il risultato dell'invenzione deve poter essere oggetto di applicazione industriale, cioè utilizzabile nell'industria, inclusi i settori dei servizi e dell'agricoltura
- **Riproducibilità:** un qualsiasi tecnico medio deve essere in grado di riprodurre il trovato, partendo dalla sua descrizione.

Le invenzioni vengono suddivise in due categorie: invenzioni microbiologiche ed invenzioni macrobiologiche. Prendendo spunto dalla Convenzione di Strasburgo (24 marzo 1971) vengono dichiarati brevettabili i prodotti e i procedimenti microbiologici (art.53). L'interpretazione di tale articolo è cambiata col tempo, grazie anche all'influenza di decisioni brevettuali assunte negli USA, aprendo la strada al brevetto su tecniche biotecnologiche, microrganismi isolati in natura e microrganismi modificati geneticamente. Il trattato di Budapest del 28 aprile 1977, stabilisce in modo non equivoco il riconoscimento internazionale del deposito dei microrganismi, presso enti di deposito internazionali.



### **Modalità per la costituzione di un brevetto**

Ogni persona fisica o giuridica, italiana o straniera, inventore o suo cessionario, ha diritto a richiedere un brevetto europeo, presentando la domanda per la concessione, indipendentemente dall'esistenza di un precedente brevetto nazionale. La domanda va depositata presso una delle sedi dell'Ufficio Brevetti Europeo di Monaco (RFT) o presso l'Ufficio Brevetti nazionale di uno Stato aderente alla Convenzione Europea. Le lingue ufficiali, da utilizzare nella procedura di fronte all'Ufficio Brevetti Europeo sono il francese, l'inglese e il tedesco.

L'Ufficio Europeo effettua una ricerca di novità sull'invenzione che viene messa a disposizione del titolare e che serve di base per la successiva fase di esame, attivata dallo stesso titolare. L'Ufficio Europeo può concedere o rifiutare la concessione del brevetto e la sua decisione ha effetto in ciascuno Stato membro. Contro il rifiuto di concessione si può fare ricorso ad una Commissione di Appello interna all'Ufficio Europeo.

Il Brevetto Europeo è valido per vent'anni e ha validità territoriale negli Stati membri a cui si vuole estendere la domanda. Il titolare della domanda dopo la pubblicazione della domanda europea, cioè dopo 18 mesi dalla data di deposito o di priorità, può conseguire la protezione provvisoria, negli Stati membri designati, attivando la relativa procedura. Conseguentemente, il titolare della domanda può agire nei confronti di terzi secondo le leggi dei rispettivi paesi e ha comunque diritto ad un equo compenso per l'attività di tali terzi che, nel periodo tra la pubblicazione e la concessione del brevetto, comporti la violazione dei diritti di brevetto.

Contro la concessione può essere presentata un'opposizione da parte di terzi che viene discussa di fronte alle divisioni di opposizione dello stesso Ufficio Europeo. Alla fine della procedura, l'Ufficio può confermare integralmente il brevetto concesso, modificarne la portata, annullare il brevetto. Contro tale decisione può essere proposto appello ad una Commissione di Appello interna all'Ufficio Europeo.

Dopo la concessione del brevetto, il titolare deve procedere alla sua convalida nazionale nei singoli Stati designati. Tale operazione in generale richiede una traduzione nella lingua di tale stato. Dopo la convalida il brevetto europeo è regolato in ciascuno stato dalla legge nazionale.

I documenti da presentare riguardano il testo della domanda di brevetto nazionale di cui si rivendica la priorità e la notifica dei paesi che si vogliono designare nella domanda di brevetto. Nel caso si tratti di un primo deposito si devono presentare la bozza di descrizione dell'invenzione preparata dall'inventore, l'indicazione dello stato della tecnica a partire dal quale l'invenzione è stata realizzata, la bozza dei disegni, se previsti, il nome e dati anagrafici e fiscali del richiedente il brevetto e l'identità dell'inventore.

### Considerazioni

Il limite del Brevetto Europeo è quello di essere fondamentalmente un insieme di brevetti valevoli nei 19 stati membri firmatari della Convenzione di Monaco. Infatti, tale istituto giuridico non offre una protezione omogenea in tutti gli stati. Il brevetto, adottato nei singoli paesi, rientra nei diversi quadri normativi e genera sperequazioni sulla protezione finale. Ad esempio, può essere diverso il trattamento giuridico di chi trasgredisca alle norme di protezione, qualora alcuni Stati membri abbiano, in materia, norme penali diverse. In più il procedimento è molto costoso perché richiede la traduzione di tutto il fascicolo nelle lingue dei paesi in cui si vuole estendere la validità del brevetto. Già da 1975 si è sentita l'esigenza di creare uno strumento nuovo, più completo e più efficiente, per disciplinare i brevetti a livello europeo. La Convenzione sul Brevetto Comunitario o Convenzione di Lussemburgo del 15 dicembre 1975, prevede la concessione di un brevetto unico avente identica efficacia sul territorio di tutti gli Stati membri dell'Unione Europea. Questa Convenzione nacque dall'esigenza di creare un unico brevetto comunitario e per aiutare la costituzione del mercato unico europeo, il quale, attraverso l'abbattimento di qualsiasi barriera doganale, potesse aumentare il livello di concorrenza e rendesse necessario tutelare le invenzioni al di là delle frontiere nazionali. Oggi l'unione economica dell'Europa è una realtà, ma la Convenzione di Lussemburgo non è ancora entrata in vigore, nè si possono fare previsioni attendibili circa i tempi necessari per la sua costituzione. In sua mancanza le procedure previste dalle Convenzioni di Monaco acquistano quindi una rilevanza ancor più significativa. Ciò soprattutto alla luce del sempre più intenso processo di globalizzazione dell'economia, che ormai coinvolge in modo rilevante anche le piccole e medie imprese.

### Registrazione

Uno dei maggiori problemi da superare per commercializzare un prodotto biologico è la fase di registrazione. Alla base della registrazione è la necessità di identificare in modo univoco il prodotto così da differenziarlo da altri e per poterne seguire il destino nell'ambiente una volta rilasciato. Le tecniche utilizzabili sono molteplici e normalmente i criteri d'elezione sono la economicità, rapidità di esecuzione e la complessità intrinseca della tecnica. Ad oggi sono disponibili metodiche basate sull'analisi del DNA, delle proteine, degli acidi grassi di membrana e di tutte quelle caratteristiche fisiologiche e morfologiche che possano aiutare nella distinzione di un individuo microbico. Ma per la registrazione devono esser tenuti in conto requisiti di tipo tossicologico.

La registrazione di un microrganismo deputato a svolgere il ruolo di antagonista microbico segue differenti legislazioni, a seconda che il prodotto venga certificato negli USA o in Europa.

### Registrazione negli USA

Negli Stati Uniti, si attua una politica "case by case", in cui le analisi richieste per la registrazione variano in base al microrganismo da immettere nell'ambiente e allo scopo con cui viene rilasciato. Il primo requisito da stabilire, per un prodotto fitosanitario la cui sostanza attiva sia un microrganismo, è la unicità del ceppo utilizzato, al fine di poter seguire il suo destino nello spazio e nel tempo una volta rilasciato nell'ambiente. La "carta di identità" del microrganismo può essere creata con strumenti eterogenei e che forniscono, in ordine decrescente, un numero di informazioni inferiore:

- l'analisi del DNA ;
- l'analisi proteica ;
- la tipizzazione degli acidi grassi della membrana ;
- lo studio dei metaboliti secondari (antibiotici, terpeni, fenoli, alcaloidi) ;
- la caratterizzazione fisiologica e morfologica ;

L'iter del prodotto, durante la registrazione è scandito da diverse fasi la cui importanza è valutata in base a criteri tossicologici. Ogni prodotto che manifesti caratteristiche negative in fase 1 viene bloccato. I dati tossicologici, prodotti da laboratori indipendenti dal gruppo richiedente la registrazione, vengono inviati all'EPA (U.S. Environmental Protection Agency) per una valutazione complessiva.

Per quanto riguarda la valutazione dei potenziali effetti dannosi sull'ambiente l'EPA sottopone il prodotto a 4 fasi di studio. Tali prove comprendono la valutazione degli effetti tossici aspecifici e gli effetti patogenetici sulle piante e sull'uomo. E' importante sottolineare che in base al microrganismo da registrare il numero e il tipo di analisi cambiano. Tale procedura, particolarmente snella, ha portato ad un grande divario tra il numero di microrganismi registrati negli USA e quelli registrati in Europa.

### Registrazione nell'UE

Per la registrazione di un prodotto fitosanitario contenente microrganismi con capacità antagonistiche, ci si deve riferire alla Direttiva Comunitaria 91/414/CEE, applicata in Italia con il Decreto Legislativo numero 194 del 17/5/95. Tale decreto disciplina:

- a) l'autorizzazione, l'immissione in commercio, l'utilizzazione ed il controllo dei prodotti fitosanitari presentati nella loro forma commerciale;
- b) l'immissione in commercio ed il controllo delle sostanze attive per l'uso cui sono destinate;
- c) l'autorizzazione all'immissione in commercio di prodotti fitosanitari contenenti o costituiti da organismi geneticamente modificati, per i quali l'emissione deliberata nell'ambiente sia già stata approvata in base al decreto legislativo 3 marzo 1993, n. 92.

Il decreto precisa la definizione del termine generale prodotto fitosanitario in cui vengono comprese: *“le sostanze attive ed i preparati contenenti una o più sostanze attive, presentati nella forma in cui sono forniti all'utilizzatore e destinati a: proteggere i vegetali o i prodotti vegetali da tutti gli organismi nocivi o a prevenirne gli effetti, favorire o regolare i processi vitali dei vegetali, con esclusione dei fertilizzanti, conservare i prodotti vegetali, con esclusione dei conservanti disciplinati*

*da particolari disposizioni, eliminare le piante indesiderate, eliminare parti di vegetali, frenare o evitare un loro indesiderato accrescimento” (art 2).*

Vengono definite sostanze attive: le sostanze o i microrganismi, compresi i virus, aventi un'azione generale o specifica sugli organismi nocivi o su vegetali, su parti di vegetali o su prodotti vegetali.

Così pure il decreto precisa che per preparati si intendono: le miscele o le soluzioni composte da due o più sostanze, delle quali almeno una sostanza attiva, destinate ad essere utilizzate come prodotti fitosanitari.

Vengono elevati al ruolo di prodotto fitosanitario anche i microrganismi, permettendo il loro l'utilizzo e disciplinando la loro registrazione e il controllo dopo la loro immissione.

### **Autorizzazione alla sperimentazione**

La richiesta di autorizzazione alla sperimentazione deve essere inoltrata al Ministero della Sanità, almeno 90 giorni prima dell'inizio delle prove. Tale richiesta è necessaria nel caso in cui le prove comportino l'immissione di un prodotto fitosanitario non ancora autorizzato o allo scopo di estendere l'autorizzazione a nuovi impieghi di prodotti già autorizzati.

L'autorizzazione viene concessa, sentito il parere del Servizio Fitosanitario Centrale e dell'Agenzia Nazionale per la protezione dell'ambiente, che devono dare il loro parere entro 45 giorni. Dopo tale periodo il Ministero della Sanità può procedere autonomamente. Il Ministero determina tutte le condizioni necessarie per la prevenzione dei rischi per l'uomo, gli animali e l'ambiente, fissando i quantitativi massimi per l'applicazione sperimentale. Le derrate derivate dalle sperimentazioni devono essere mantenute separate dalle altre, smaltite secondo le normative vigenti o nel caso in cui si sia ottenuta l'autorizzazione all'immissione al commercio, potenzialmente destinate all'alimentazione umana.

Tale decreto non si applica direttamente agli organismi geneticamente modificati se non quelli che abbiano ottenuto un provvedimento formale di assenso per la sperimentazione e per l'autorizzazione all'immissione in commercio (parte B e C della Direttiva 90/220 recepita con il D.Leg n.92 del 3/3/1993).

### **Autorizzazione all'immissione in commercio**

Il decreto presenta, nella sua parte finale, sei allegati a cui il testo rimanda per la specifica dei singoli articoli della legge.

I prodotti devono sottostare a determinate condizioni per l'autorizzazione. Un prodotto fitosanitario può essere autorizzato solo “se: (A) le sostanze attive in esso contenute sono iscritte nell'allegato I e se soddisfa i principi uniformi di cui all'allegato VI; (B) se è sufficientemente efficace; non produce effetti inaccettabili sui vegetali o sui prodotti vegetali; non provoca sofferenze e dolori inaccettabili ai vertebrati da combattere; non produce effetti nocivi in maniera diretta o indiretta, sulla salute dell'uomo o degli animali o sulle acque sotterranee; non produce effetti inaccettabili sull'ambiente, in particolare per quanto riguarda il suo destino e la sua distribuzione ambientale, con riferimento particolare alla contaminazione delle acque, comprese quelle potabili e sotterranee, nonché l'impatto sulle specie non bersaglio; (C) se è possibile determinare la natura e la quantità delle sostanze attive in esso contenute e, ove occorra, delle sue impurezze e degli altri componenti significativi dal punto di vista tossicologico ed ecotossicologico, con adeguati metodi stabiliti in sede comunitaria o, in mancanza, riconosciuti dal Ministero della Sanità; (D) se possibile, con adeguati metodi di uso corrente, determinarne i residui di rilevanza tossicologica ed ambientale derivanti da un impiego autorizzato; (E) se le sue proprietà fisico-chimiche sono state determinate e giudicate accettabili per garantire un'utilizzazione ed un magazzino adeguati; (F) se per i prodotti agricoli previsti dall'autorizzazione, i suoi residui non superano i limiti massimi stabiliti ai sensi dell'articolo 19 (art. 4).

Il decreto disciplina il riconoscimento degli enti preposti allo svolgimento delle prove necessarie. Le condizioni viste sono accertate dai centri di saggio secondo l'applicazione dei principi di “buona prassi di laboratorio”(GLP) descritti dal decreto legislativo n°120 del 27 gennaio 1992. Le prove ed analisi compiute dai centri di saggio devono ottemperare alle norme previste nell'allegato III del decreto. L'autorizzazione viene rilasciata dal Ministero della Sanità ed ha una durata di dieci anni. Essa prescrive i requisiti di commercializzazione, di utilizzazione e di quelli necessari per ottemperare alle condizioni previste dall'articolo 4. Per richiedere l'A.I.C. per un prodotto fitosanitario un produttore deve presentare la domanda di

autorizzazione al Ministero della Sanità, un dossier che soddisfi i requisiti richiesti dall'allegato III e un dossier per ogni sostanza attiva presente nel preparato, redatto secondo le modalità precisate nell'allegato II. La domanda e i fascicoli allegati devono essere redatti in lingua italiana.

La commissione consultiva (art. 20), è lo strumento che il Ministero utilizza per verificare la conformità del prodotto con le condizioni stabilite dall'articolo 4. Tale commissione valuta, avvalendosi della cooperazione dei richiedenti la domanda e procede al rilascio dell'autorizzazione entro e non oltre un periodo di 12 mesi dal momento in cui è disponibile un dossier completo dal punto di vista tecnico.

L'A.I.C. viene notificata al titolare con il relativo numero di registrazione e vengono pubblicate sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana le etichette dei prodotti autorizzati. Presso il Ministero della Sanità viene conservata tutta la documentazione consegnata così da renderla disponibile agli Stati membri e alla Commissione Europea.

L'A.I.C. può essere rinnovata al termine della sua durata se la domanda di rinnovo viene presentata almeno un anno prima della sua scadenza, purchè il Ministero della Sanità accerti che non siano venute a mancare le condizioni imposte dall'articolo 4 del decreto.

L'A.I.C. non è un'autorizzazione "statica" ma può essere modificata, con o senza il parere della commissione e sulla base dell'importanza delle modificazioni richieste (art.5 comma 13, 14, 15, 16). Essa può essere riesaminata e ritirata, anche su richiesta del titolare, quando vengano a mancare le condizioni viste all'articolo 4. L'informazione riguardante la riesamina e il ritiro sono di competenza del Ministero che si deve occupare di darne ampia pubblicità al titolare, agli organi di vigilanza e alle principali organizzazioni professionali di rivenditori e agricoltori affinché tutti gli operatori ne vengano a conoscenza.

Dopo l'accettazione della domanda di autorizzazione all'immissione in commercio, il prodotto fitosanitario autorizzato viene iscritto nell'allegato I (art. 6, comma1) per un periodo di dieci anni e ogni modifica viene stabilita dal Ministero della Sanità.

L'iscrizione a tale allegato rimane vincolata "a: (A) assenza di effetti nocivi sull'uomo, sugli animali, sull'ambiente e sulle acque sotteranee, (B) rispetto della dose giornaliera per l'uomo, (C) livello ammissibile d'esposizione dell'operatore, (D)

stima del destino e della distribuzione nell'ambiente nonché dell'impatto sulle specie non bersaglio.

Ottenuta l'AIC è possibile, per il titolare, vendere il prodotto che prevedibilmente verrà immesso nell'ambiente. Durante le fasi di registrazione la legislazione si occupa di regolamentare le modalità di accertamento dei rischi.

### **Valutazione dell'impatto ambientale**

Il rilascio deliberato o accidentale nell'ambiente di un microrganismo ha delle implicazioni ambientali molto importanti. Dal punto di vista giuridico, il decreto legislativo n.194 del 17/5/1995 definisce, all'articolo 4, le caratteristiche generali che un microrganismo deve possedere per salvaguardare l'ambiente, mentre nell'allegato II, con riferimento all'organismo, e nell'allegato III, con riferimento al prodotto fitosanitario, precisa le prove da effettuare prima che l'AIC venga concessa.

La legge si occupa di definire quali siano il "destino e il comportamento nell'ambiente" del prodotto, ponendo l'attenzione sulla sua diffusione, mobilità, moltiplicazione e sulla persistenza nell'aria, nell'acqua e nel suolo. Dal punto ecotossicologico si occupa delle possibili interazioni tossiche con pesci, uccelli, lombrichi e insetti, così come i possibili effetti negativi sulle api da miele, sulle alghe, gli effetti su organismi utili, su altri organismi non bersaglio e sulla microflora del suolo.

Tuttavia, il decreto legge non definisce, in modo preciso, un microrganismo mentre il precedente decreto legislativo n.91 del 3 marzo 1993, dava una chiara definizione dove ad un microrganismo corrisponde: ogni entità microbiologica cellulare o non cellulare capace di replicarsi e di trasferire materiale genetico. Se da una parte tale legge ammette che ci possa essere uno scambio di materiale genetico, la legislazione sulla registrazione di microrganismi come prodotti fitosanitari non ne fa menzione, nel caso di microrganismi non modificati geneticamente, prevedendo tale eventualità solo per i MOGM.

Dal punto di vista della stabilità genetica e del trasferimento orizzontale di geni non viene precisato nulla, valutando che potrebbe verificarsi un rischio effettivo per l'ambiente solo quando del materiale esogeno venga introdotto in un ospite o quando



siano applicate tecniche che creino nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile.

Nel caso della registrazione, le prove di valutazione del rischio sono quindi inferiori di numero e molto meno onerose perché ricadono sotto una legge, da questo punto di vista, più permissiva. Ciò ha una ricaduta pratica sulle strategie di ricerca che le aziende mettono a punto per sviluppare un microrganismo utile. Il produttore che si trova di fronte la possibilità di migliorare un ceppo antagonista, modificandolo geneticamente, deve quindi sottostare ad una prima legge per l'impiego in ambiente confinato e quindi ad una seconda che si occupa della sua immissione sul mercato. Le procedure tecniche diventano onerose e il prodotto perde in economicità e competitività. Esistono tuttavia delle scappatoie legislative per migliorare l'attività antagonistica senza ricadere nella normativa sul rilascio in ambiente confinato di MOGM (Decr.leg. n.91 del 3/3/93). Si possono creare varianti genetiche tramite coniugazione, trasduzione, trasformazione o qualsiasi altro processo naturale; e' permessa induzione della poliploidia, la mutagenesi per creare mutanti con caratteristiche nuove e la fusione cellulare (compresa la fusione dei protoplasti) di cellule di piante che possono essere ottenute mediante metodi tradizionali di riproduzione.

### **Etichettature e controlli**

Il problema dell'etichettatura ha assunto oggi una rilevanza cruciale. Il decreto legislativo 194/95 regola tale materia per i prodotti fitosanitari. Esso prevede che siano apposte delle etichette, in lingua italiana, su tutti gli imballaggi e contenitori. In generale, l'etichetta deve portare notazioni riguardanti il prodotto e il produttore. In modo specifico le etichette devono contenere la denominazione commerciale del prodotto fitosanitario, con il nome e l'indirizzo del titolare dell'autorizzazione, il numero e la data di registrazione, nonché i dati anagrafici del responsabile dell'imballaggio, dell'etichettatura e della distribuzione, (qualora questo sia diverso dal titolare dell'autorizzazione), nonché l'indicazione del nome e della sede dello stabilimento di produzione. L'etichetta deve inoltre contenere notazioni molto precise riguardanti il nome e la concentrazione di ciascuna sostanza attiva presente nel prodotto fitosanitario, (come da decreto del Presidente della Repubblica

24 maggio 1988, n. 223). I nomi delle sostanze attive devono essere indicate secondo la nomenclatura di cui alla legge 29 maggio 1974, n. 256, (e successive modifiche), oppure, se la sostanza non vi figura, essa può essere indicata con il suo nome comune ISO o, in assenza, con la sua denominazione chimica IUPAC.

L'etichetta deve essere corredata anche dai dati sul tipo di azione del prodotto fitosanitario, il tipo di preparazione, la quantità netta del prodotto fitosanitario, espressa in unità di misure legali, il numero di partita del preparato o una indicazione che ne permetta l'identificazione.

Con Decreto del Ministro della Sanità vanno indicate le frasi di rischio (R) riferite all'uomo, gli animali o l'ambiente (allegato IV) e le complementari frasi di sicurezza (S) per la tutela dell'uomo, degli animali o dell'ambiente (allegato V) e le indicazioni riguardanti i primi soccorsi da prestare.

Il comune utilizzatore del prodotto deve poter comprendere dall'etichetta le possibilità di uso del "fitofarmaco". A tale scopo devono essere indicati "gli usi autorizzati, le specifiche condizioni agricole, fitosanitarie ed ambientali nelle quali il prodotto fitosanitario può essere utilizzato o, al contrario, deve essere escluso" (art.16, comma 1, lettera k). Sono fondamentali le istruzioni per l'uso e la dose, espressa in unità metriche, per ogni diverso impiego autorizzato. I prodotti fitosanitari, seppure autorizzati, possono presentare effetti fitotossici o effetti tossici verso l'uomo; per tal motivo, in etichetta va indicato, nel caso sia necessario, l'intervallo di sicurezza da rispettare tra l'applicazione e la semina, tra l'impianto della coltura da proteggere o di quelle successive, tra l'applicazione e l'accesso dell'uomo o degli animali, tra l'applicazione ed il raccolto e tra l'applicazione e l'uso o il consumo dei vegetali trattati. L'etichetta appare molto simile a quella di un farmaco ad uso umano ed, infatti, contiene la dicitura "Prima dell'uso leggere le istruzioni sul foglio illustrativo" qualora sia allegato un foglio illustrativo, la data di scadenza in normali condizioni di conservazione del preparato, se la durata dello stesso è inferiore a due anni. Non si possono apporre sull'etichetta notazioni quali innocuo o non tossico, in riferimento, ad esempio, all'effetto verso insetti pronubi. Nel caso di trattamento previsto in concomitanza di periodi critici per la presenza di api è permesso indicare sull'etichetta frasi del tipo "utilizzabile in presenza di specie non bersaglio". I titolari hanno il compito di adeguare gli imballaggi, le etichette fatto salvo per le scorte di prodotti etichettati ed imballati prima dell'entrata in vigore di tale decreto. I controlli

effettuati dal legislatore prevedono misure a breve e media scadenza. Il controllo ufficiale dei prodotti fitosanitari viene attuato con l'adozione di piani nazionali annuali per verificare la rispondenza ai requisiti per cui i diversi prodotti sono stati messi in commercio e la loro utilizzazione conforme alle indicazioni annotate sull'etichetta nel rispetto dei principi di buone pratiche fitosanitarie e di lotta integrata. E' compito delle regioni e delle provincie autonome trasmettere, annualmente, i risultati ispettivi al Ministero della Sanità che deve presentare, successivamente, agli Stati membri e alla Commissione Europea una relazione in materia. Il Ministero della Sanità deve approntare, in accordo con il Ministero dell'Ambiente e sentito il parere della Conferenza permanente Stato-Regioni dei piani nazionali triennali (art.17, comma 4). In analogia con la Farmacopea Ufficiale dei farmaci destinati all'uomo è stata creata la Fitofarmacopea ufficiale. Il Ministero della Sanità tramite il Servizio Informativo Sanitario, ne cura la pubblicazione. Essa comprende le monografie delle sostanze attive autorizzate, il prontuario dei prodotti fitosanitari autorizzati e i metodi di analisi per la verifica dei requisiti sanciti dall'articolo 4. Il decreto stabilisce di adottare, riferendosi anche alla legge n.283 del 30/4/1962, i limiti massimi residuali definiti in sede comunitaria, qualora essi non esistano, di stabilirli, in via provvisoria con il parere della Commissione Consultiva.

### **Considerazioni sulle differenti legislazioni**

E' evidente la grande differenza normativa che esiste tra Unione Europea e USA in materia di registrazione di prodotti fitosanitari. In Europa l'obbligatorietà di molte analisi, anche quando il microrganismo sia palesemente innocuo, fa sì che le richieste di autorizzazione di prodotti fitosanitari presentate siano inferiori di numero a quelle presentate negli USA. La laboriosità delle prove necessarie nonché la difficoltà economica della registrazione, che in se non avrebbe tempi di accettazione eccessivamente lunghi, ha come effetto non solo la depressione del mercato ma la comparsa di fenomeni di frode. E' nota agli operatori l'esistenza in commercio di prodotti non registrati come prodotti fitosanitari, bensì come ammendanti, aventi come denominazione: "Additivi per terreni e substrati di radicazione a base di sostanze naturali e attivanti biologici". E' quasi inevitabile che accada ciò, vista la grande massa critica, talora non essenziale, che un produttore deve presentare per la

registrazione. Sarebbe quindi auspicabile una riforma della legge che presti più attenzione al singolo prodotto, intendendo ogni prodotto fitosanitario come “unico” così da esigere un insieme di prove ed analisi adeguate e non standardizzate come numero. Lo stesso si potrebbe dire per gli OGM e gli MOGM, campo in cui il divario con gli USA è ancora più ampio.

### **Produzione e commercializzazione**

Dopo la fase di isolamento di un microrganismo e lo studio delle sue caratteristiche utili come agente di contenimento biologico, la tappa fondamentale per il successo di un prodotto biologico è la cosiddetta “fase industriale”. Essa studia la formulazione del prodotto e la sua produzione su vasta scala. Spesso si ritrovano in fase di ricerca microrganismi utili e promettenti, ma il passaggio alla produzione e alla commercializzazione non è sempre facile e comunque di esito non scontato. La carenza sul mercato di prodotti microbiologici è frequentemente da ascrivere ai costi di produzione elevati e dai margini di profitto inadeguati, se riferiti all’investimento iniziale. Per capire le ragioni di tale fenomeno occorre analizzare gli elementi caratterizzanti la produzione di biomasse microbiche. In una biofabbrica i costi che più incidono sono l’acquisto dei substrati e l’energia elettrica richiesta per far funzionare gli impianti. A questi due fattori primari si collegano l’efficienza del processo fermentativo, collegato a sua volta alle diverse esigenze di sviluppo dei microrganismi e dal punto di vista del marketing, la ridotta economia di scala che tali prodotti per la difesa riescono a raggiungere sul mercato. L’approvvigionamento di substrati economici per le fermentazioni è un fattore cruciale. Le melasse di scarto, derivate dalla lavorazione della barbabietola da zucchero e della canna da zucchero, gli scarti derivati dalla trasformazione industriale del mais rappresentano un materiale di partenza assai economico ma qualitativamente eterogeneo nel tempo. In questo ambito si deve ricercare il compromesso tra economicità dei fattori produttivi e qualità costante del prodotto finale. La produzione in grandi fermentatori è, di solito, il mezzo più comune per la produzione di biomasse ingenti. Si utilizzano due tipi di colture: la coltura su mezzo liquido e quella su mezzo solido. Sono molte di più le conoscenze sulla fermentazione in liquido che non in solido, dal momento che la prima è stata il mezzo di produzione d’elezione di attinomiceti produttori di

antibiotici. Tuttavia, occorre considerare ogni microrganismo come a sè stante e con caratteristiche di sviluppo ed esigenze nutrizionali differenti. Non sembra corretto privilegiare un tipo di fermentazione rispetto ad un altro in modo aprioristico. La coltura in liquido necessita, alla fine del processo due fasi fondamentali: la separazione dell'inoculo dal mezzo di coltura mediante filtrazione e la fase di concentrazione dell'inoculo tramite processi di centrifugazione e di disidratazione. Quest'ultima può alterare la capacità funzionale del microrganismo, specie se condotta rapidamente tramite riscaldamento. Al contrario, una coltura solida non richiede separazione dell'inoculo né la disidratazione del prodotto; ad esempio il micoparassita *Sporidesmium sclerotivorum* viene prodotto, di routine, con una fermentazione solida (Ayers e Adams, 1983) e anche per *Trichoderma spp.* è stata messa a punto una strategia per la coltura solida su vasta scala (Roussos *et al.*, 1991). Per produrre una grande quantità di biomassa si devono ricercare i valori adeguati non solo per il microrganismo di interesse ma per lo stadio vitale desiderato (conidio, ascospora, clamidospora). La temperatura, l'ossigenazione, il pH, l'umidità, la fonte di carbonio nel substrato, i micro- meso- e macro-elementi del substrato devono essere considerati per raggiungere due obiettivi tra loro contrastanti: massimizzare le rese e contenere i costi. La temperatura influenza direttamente lo sviluppo dei microrganismi, influenzando la cinetica delle reazioni enzimatiche. Avere a disposizione un ceppo microbico che cresca a temperature relativamente vicine a quelle ambiente rappresenta un vantaggio economico, poiché fa risparmiare energia. Il pH e la fonte di carbonio influenzano la qualità dei metaboliti secondari prodotti nel mezzo. E' noto che, ad esempio la produzione di fenazina in *Pseudomonas fluorescens* è altamente influenzata dalla composizione del mezzo (Slininger e Shea-Wilbur, 1995). La necessità di ossigenare il mezzo di coltura richiede energia per aumentare la velocità delle pale del fermentatore. Talvolta, la scarsa aerazione può incrementare la formazione di clamidospore in ceppi micoerbicidi di *Fusarium oxysporum* (Hebbar *et al.*, 1997). Variare le condizioni di coltura per promuovere la formazione di strutture di resistenza porta ad indubbi vantaggi di tipo commerciale. Un prodotto microbiologico, infatti, richiede, oltre alle caratteristiche finali di elevato titolo, una buona efficacia ed un'elevata stabilità commerciale (shelf life). La vita commerciale del prodotto è tanto più elevata quanto più si commercializzano le forme di resistenza del microrganismo. Ceppi di *Fusarium*

saprofiti vengono prodotti in forma di clamidospore (Hebbar *et al.*, 1997); le spore di *Bacillus subtilis* rappresentano la forma di resistenza più efficace per la conservazione del prodotto. *Talaromyces flavus* presenta ascospore molto resistenti, preferibili ai conidi, per la commercializzazione (Fravel *et al.*, 1985); alcuni batteri, come *Agrobacterium radiobacter* K84, sono facilmente disidratabili (Kerr, 1980), altri, tra cui i batteri gram negativi, sono più difficili da conservare, mancando di forme fisiologiche di resistenza.

### Formulazione

La formulazione di un prodotto fitosanitario è l'equivalente della forma farmaceutica dei farmaci destinati all'uso umano e rende la sostanza attiva utilizzabile per le applicazioni. Spesso una corretta formulazione è il fattore discriminante tra il successo e l'insuccesso di un prodotto. E' pressoché inutile avere a disposizione un microrganismo utile ed efficace se non si sono compiuti studi adeguati sulla formulazione da adottare. Il microrganismo rimane uno strumento utile *in pectore*. Gli obiettivi della formulazione di prodotti fitosanitari contenenti microrganismi riguardano il mantenimento dell'efficacia, la durata commerciale e la facilità d'uso, la distribuzione completa sul sito da raggiungere, la compatibilità con le normali pratiche agricole e i bassi costi di produzione. Un fitofarmaco microbiologico, rispetto ad un fitofarmaco chimico tradizionale, presenta problemi peculiari che riguardano la stabilizzazione e la durata del prodotto. Spesso i produttori di formulati tendono a trascurare queste componenti rispetto ai problemi, di più facile soluzione tecnica, di distribuzione, assorbimento e sicurezza per l'operatore. Queste non devono mancare, ma dal momento che il prodotto fitosanitario contiene microrganismi che devono svolgere una funzione in campo diventa primario ed essenziale che essi arrivino vivi al sito di applicazione. Un'adeguata formulazione deve rendere stabile la sostanza attiva, sia durante la conservazione, sia nell'esposizione agli agenti abiotici, una volta applicata alla coltura. Anche in questo caso esistono formulati specifici e più idonei al differente utilizzo finale di un prodotto. Sono molto usate paste a base di talco, pirofillite o kaolinite utilizzati come veicoli della sostanza attiva; altre volte sono usati substrati veicolanti quali torba, vermiculite, lignite (Kloepper e Schroth, 1981; Vidhyasekaran *et al.*, 1997). Gli alginati si prestano molto alla veicolazione del

microrganismo nell'ambiente, ma dal momento che occorre studiare, prodotto per prodotto, l'adatta formulazione il loro costo finale è eccessivo. Il "Pesta" (Connick *et al.*, 1991) è un formulato granulare che è stato preparato utilizzando la tecnologia della "pasta fatta in casa". Si prepara un impasto con la farina di semola e la kaolinite cui viene aggiunta la sospensione conidica di interesse; si lavora l'impasto fino a creare una "palla" umida di pasta, si tira in sfoglia e si producono degli spaghetti. Gli spaghetti seccati vengono poi frammentati in granuli di 3-4 mm di lunghezza e 1-2 mm di diametro. Tale formulato viene usato per microrganismi micoerbicidi, per *Trichoderma* spp. etc... pur essendo molto efficace è molto costoso se applicato a produzioni su vasta scala, a causa dell'elevato costo della kaolinite. Un ulteriore miglioramento potrebbe essere apportato sostituendo la kaolinite con substrati più a buon mercato come la bentonite. Amidi pregelatinizzati vengono utilizzati per formulare *Trichoderma virens* e *Trichoderma hamatum* (Lewis *et al.*, 1995); in tal caso l'amido viene gelatinizzato aggiungendo 10 ml di acqua ogni 100 g di farina di mais creando delle maglie in cui vengono intrappolati i microrganismi. Tale sistema garantisce una buona sopravvivenza all'inoculo, è facile da produrre ed economico. I biopolimeri sfruttano il medesimo principio degli amidi gelatinizzati per incapsulare il microrganismo (Bok *et al.*, 1996). Alcuni formulati sono costituiti da emulsioni invertite in cui il microrganismo è nella fase dispersa, circondata dalla fase continua oleosa: tale forma garantisce una buona protezione dagli UV.

Si può influire sull'efficacia di un prodotto microbiologico grazie ad additivi che alterino lo stato nutrizionale della sostanza attiva. L'azione di *Trichoderma* e *Gliocladium* spp. è migliore se si aggiunge crusca di grano al formulato (Elad *et al.*, 1980; Elad e Hadar, 1981; Lewis e Papavizas, 1985). Sono noti casi, come per *Trichoderma flavus*, in cui una formulazione "povera" garantisce risultati migliori (Fravel *et al.*, 1995) ed altri in cui una formulazione con sostanze nutritive specifiche come additivi avvantaggiano l'antagonista sul patogeno (Chun *et al.*, 1997). La durata di un prodotto è essenziale per garantire la qualità del prodotto nel tempo. E' importante ridurre il tenore di ossigeno nel preparato aggiungendo delle sostanze adsorbenti l'ossigeno, o mediante formulati sotto vuoto. E' utile ridurre il tenore di acqua (Connick *et al.*, 1996) così come si possono aggiungere agenti osmoprotettori e UV protettori (Shapiro, 1992; Shapiro e Robertson, 1992). L'abbassamento della temperatura non sembra essere la giusta via da perseguire, dal momento che

occorrerebbe creare sistemi quali “catene del freddo” nei canali distributivi e ciò porterebbe, con tutta probabilità, a problemi logistici specie in un sistema a basso profilo tecnologico come quello agricolo italiano, rappresentato da una moltitudine di piccole aziende.

### 1.2 il genere *Trichoderma*

I Funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono cosmopoliti nel suolo e nel materiale vegetale in decomposizione. Alcune specie sono le componenti principali della micoflora in un'ampia gamma di habitat. Questo può essere attribuibile alle ampie capacità metaboliche delle specie appartenenti a questo genere e alla loro natura ecologica aggressivamente competitiva (Gams, 1991). Ceppi di *Trichoderma* spp. sono raramente agenti eziologici di malattie delle piante. Alcuni ceppi invece arrecano danni alle coltivazioni su substrato di funghi eduli come *Plerotus ostreatus* o *Agaricus bisporus*. La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Trichoderma* non sono associati ad alcuna forma perfetta. Nel genere *Hypocrea*, (divisione *Ascomycota*; classe *Pyrenomycetes*; ordine *Hypocreales* ; famiglia *Hypocreaceae*) ritroviamo forme di riproduzione gamica, che possono essere ricondotte al genere *Trichoderma*. Negli ultimi anni, grazie ad indagini molecolari, è stato possibile associare un numero crescente di teleomorfi appartenenti al genere *Hypocrea* ai rispettivi anamorfi del genere *Trichoderma*. Comunque, nonostante questi significativi progressi, la tassonomia del genere *Trichoderma* rimane ancora piuttosto incompleta e la distinzione delle specie è problematica.

Il genere *Trichoderma* è stato introdotto da Persoon nel 1794 nel quale l'autore introdusse quattro specie fungine simili a livello macroscopico, descrivendole “apparentemente come polveri farinose racchiuse da una copertura lanuginosa”. Le quattro specie originariamente descritte furono chiamate *T. aureum*, *T. roseum*, *T. nigrescens* e *T. viride*, ognuna di queste assumeva infatti una colorazione differente durante la produzione di conidi. Adesso sappiamo che le quattro specie fungine non hanno alcun rapporto di parentela, tuttavia il genere *Trichoderma* fu applicato a tutte quelle specie fungine ubiquitarie, verdi e con caratteri simili al *T. viride*.

Il rapporto metagenetico con il genere *Hypocrea*, venne messo in luce dai fratelli Tulasne nel 1865. Tuttavia, la precisa tassonomia infragenerica di *Trichoderma* è



rimasta oscura fino alle ultime decadi del ventesimo secolo. Bysby, nel 1939, ipotizzò che le variazioni morfologiche potessero essere imputate a diversi ceppi appartenenti ad una singola specie: *T.viride*. Il primo tentativo per fornire una tassonomia infragenerica del genere *Trichoderma*, si deve a Rifai che nel 1969 distinse, all'interno del genere, nove specie aggregate, essendo conscio del fatto che i taxa da lui introdotti non costituissero singole entità biologiche, in rapporto metagenetico con una singola e precisa specie teleomorfica. I rapporti di alcune specie con le relative forme perfette furono stabiliti da Webster (1964), studiando isolati provenienti da ascospore, che erano stati ottenuti da Dingley nel 1957. In Giappone, negli anni tra il 1969 e il 1972, Doi studiò e descrisse attentamente molte specie di *Hypocrea*, osservando anche i relativi anamorfi; sfortunatamente nessuna coltura dei ceppi da lui utilizzati è stata conservata. Studi più dettagliati sulla morfologia del genere *Trichoderma* sono stati effettuati da Bisset che nel 1984, prendendo in considerazione l'intera gamma di variazioni morfologiche osservate, propose di collocare specie morfologicamente simili insieme, arrivando così a distinguere cinque sezioni: *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*. Questi studi evidenziarono che delimitare specie biologiche sul piano meramente morfologico è estremamente difficoltoso.

Attualmente sono a disposizione altri metodi per l'identificazione tassonomica, che vengono a supporto di quello morfologico come: indagini sui metaboliti secondari, che evidenziano una grande variabilità all'interno del genere (Okuda *et al.* 1984); caratteristiche fisiologiche evidenziabili in piastre microtiter che potrebbero fornire un sistema utile per l'identificazione infragenerica; l'analisi dei profili isoenzimatici effettivamente utilizzata come strumento tassonomico (Leutchman *et al.* 1996, Samuels *et al.* 1994); indagini molecolari condotte sulle sequenze ITS del DNA ribosomale e tecniche "fingerprinting" costituiscono i metodi a risoluzione più fine per l'identificazione tassonomica (Fujimori, Okuda 1994; Kuhls *et al.* 1995,1996,1997; Meyer *et al.* 1992).

Nella sezione *Longibrachiatum* Bisset (1984), i conidiofori sono moderatamente e irregolarmente ramificati, con le fialidi disposte in modo poco regolare e di rado organizzate in spirali o verticilli.

Le specie appartenenti alla sezione *Longibrachiatum* spesso producono pigmenti giallo verdognoli nel retro delle piastre di coltura. La sezione *Saturnisporum* Doi *et*

## Introduzione

*al.*(1987) fu eretta a causa delle peculiari strutture che si potevano osservare sulla superficie delle pareti dei conidi, talvolta vere e proprie estroflessioni verso l'esterno simili ad ali. Questa sezione è inoltre caratterizzata da un modello di ramificazione dei conidiofori, simile a quello della sezione *Longibrachiatum*, con ramificazioni e fialidi non raggruppate frequentemente appaiate.

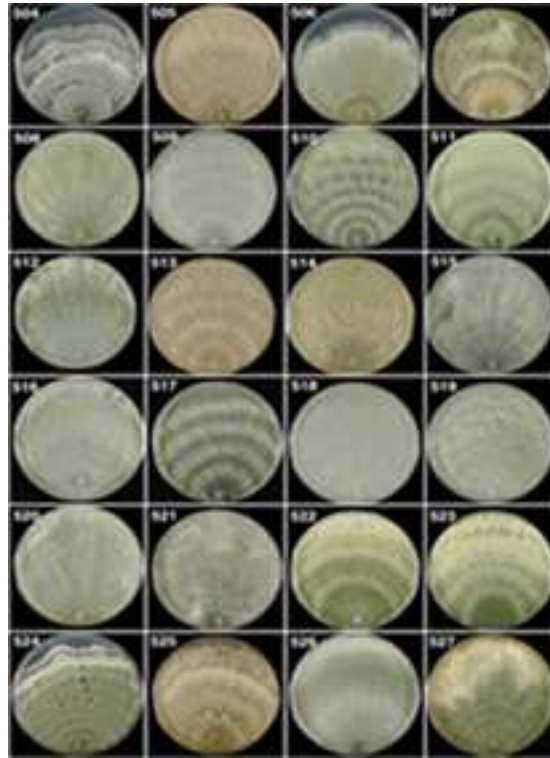


Foto 1.2 Aspetto delle colonie di *Trichoderma* spp. in piastre Petri allevate su PDA [Tratta da Studies on Mycolgy 48 *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores Priscila Chaverri and Gary J. Samuels 2004

La produzione di conidi appare organizzata in pustole compatte, come nella sezione *Pachybasium*. Studi molecolari sulle specie appartenenti a questa sezione, (Kuhls 1997), hanno evidenziato che queste specie sono strettamente imparentate con altre appartenenti alla sezione *Longibrachiatum*. Per questo sia W.Gams che J.Bisset concordano sulla necessità di includere nella sezione *Longibrachiatum* la sezione *Saturnisporum*.

In definitiva, quindi, il genere *Trichoderma*, sarebbe suddiviso in quattro sezioni: *Longibrachiatum*, *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*. Le specie di

*Trichoderma* possono essere prontamente isolate dal suolo con ogni metodo convenzionale, ciò a causa della loro crescita rapida e della loro abbondante produzione di conidi. Sono stati proposti metodi selettivi basati sull'utilizzo di substrati agarizzati cui sono aggiunti antimicrobici e fungicidi specifici, ma anche la diversa temperatura di sviluppo può essere utilizzata per un isolamento selettivo.

### 1.2.1 Meccanismi di azione di *Trichoderma* in lotta biologica

Le numerose applicazioni pratiche fanno del genere *Trichoderma* argomento di intensi studi sia come agente di lotta biologica, sia come microrganismo modello per studiare i processi di biocontrollo. In tabella 1.2 sono riportati alcuni dei funghi fitopatogeni controllati dalle diverse specie di *Trichoderma* (Harman and Kubicek, 1997).

Tabella 1.1: Funghi fitopatogeni controllati da alcune specie di *Trichoderma* Harman and Kubicek, 1997

<b>Trichoderma</b>	<b>Pianta trattata</b>	<b>Patogeno controllato</b>
<i>T. harzianum</i>	barbabietola, pomodoro, fagiolo, girasole	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	aglio	<i>Sclerotium cepivorum</i>
	lattuga	<i>Pythium ultimum</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	patata, narciso, pomodoro cotone, melone, patata, lattuga,	<i>Phytophthora spp.</i> <i>Fusarium oxysporum</i>
	cotone, fagiolo, patata, barbabietola rafano, carota, tabacco	<i>Rhizoctonia solani</i>
	pomodoro	<i>Verticillium spp.</i>
	fruttiferi	<i>Armillaria mellea</i>
<i>T. viride</i>	Fagiolo	<i>Penicillium digitatum</i>
	lattuga	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	narciso	<i>Pythium ultimum</i>
	cotone, pomodoro	<i>Fusarium oxysporum</i>
	leguminose, patata, barbabietola	<i>Rhizoctonia solani</i>
	patata	<i>Verticillium spp</i>

I funghi del genere *Trichoderma* agiscono come agenti di biocontrollo principalmente producendo antibiotici, competendo per i nutrienti e micoparassitizzando l'ospite. La capacità antibiotica dei funghi appartenenti al genere *Trichoderma* si esplica con la produzione di numerosi metaboliti tossici quali ad esempio la gliovirina, la gliotossina, la trichodermina e le trichozianine, attivi contro una vasta gamma di

funghi e batteri (Papavizas, 1985). Faull e Scarseletti (1994) osservarono che il composto 6-pentil- $\alpha$ -pirone, un metabolita di *T. harzianum*, ha attività inibitoria *in vitro* contro *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Whilhite e colleghi (1994) attribuirono alla gliotossina l'effetto fungistatico dimostrato dal ceppo G20 di *T. virens*, già commercializzato come Gliogard®. Il meccanismo di competizione è legato alla capacità di *Trichoderma* spp. d'influenzare la disponibilità di alcuni nutrienti nella rizosfera, limitando la nutrizione di altri funghi, tra cui quelli patogeni (Silvan and Chet, 1989). Il ferro, ad esempio, viene sequestrato mediante la produzione di siderofori simili a quelli prodotti da *Pseudomonas* spp.. Un altro meccanismo di competizione consiste nell'occupazione di nicchie comuni con i microrganismi fitopatogeni. Infatti la sola presenza di *Trichoderma* spp. sui fiori o grappoli d'uva impedisce la colonizzazione della corte d'infezione da parte di *B. cinerea* (Lorito *et al.*, 1994b). Il micoparassitismo di *Trichoderma* è di tipo distruttivo perché l'interazione *Trichoderma* - ospite si risolve con la soppressione di quest'ultimo. Questo meccanismo di biocontrollo prevede un'iniziale crescita chemiotattica di *Trichoderma* verso le ife del suo ospite, il quale produce un gradiente di essudati (Nordbring-Herts and Chet, 1986); questo primo riconoscimento è mediato dalle lectine del fungo ospite e da residui di zucchero, generalmente galattosio e fruttosio, presenti sulla parete di *Trichoderma* (Inbar and Chet, 1997). Il micelio di *Trichoderma*, dopo il contatto fisico con l'ospite, sviluppa strutture specializzate simili a ganci e appressori, atti ad avvolgere le ife del patogeno. Infatti, rimuovendo le ife di *Trichoderma* dal suo ospite sono stati osservati solchi e fori di penetrazione, generati dagli enzimi litici prodotti dall'antagonista. Le chitinasi e le  $\beta$ -glucanasi svolgono un ruolo cruciale nella penetrazione, dal momento che la struttura della parete cellulare fungina è costituita principalmente di polimeri strutturali  $\beta$ -glucani e chitina (Lorito *et al.*, 1994b). Nell'ultima fase dell'interazione antagonista-ospite, *Trichoderma* digerisce il contenuto intracellulare del fungo attaccato, provocando la perdita del citoplasma e la disintegrazione delle ife dell'ospite (Benhamur and Chet, 1996).

Le specie del genere *Trichoderma* maggiormente utilizzate per il controllo biologico sono *T. harzianum* e *T. virens* (Papavizas, 1985; Chet, 1987). In particolare, gli enzimi chitinolitici di questi due ceppi sono studiati perché ritenuti responsabili della degradazione della parete cellulare nei funghi contenenti chitina (De la Cruz *et al.*,

1992; Di Pietro *et al.*, 1993, Lorito *et al.*, 1993, 1994). Numerosi lavori dimostrano che *T. harzianum*, da solo o in combinazione con altre specie di *Trichoderma* oppure con prodotti chimici, attacca direttamente gli agenti patogeni quali ad esempio *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotinia* e *Botrytis*. Particolarmente interessante è il sinergismo degli enzimi litici di *Trichoderma* e alcuni fungicidi inibitori della sintesi degli steroli (flusilazolo, miconazolo), della chitina e dei  $\beta$ -glucani. I CWDEs (Cell Wall Degrading Enzymes), operando la degradazione della parete cellulare fungina, favoriscono la penetrazione dei fungicidi nei siti specifici d'azione che raggiungono in tal modo concentrazioni più elevate nelle cellule bersaglio (Lorito *et al.*, 1994a). Il sinergismo tra gli enzimi e i fungicidi suggerisce l'applicazione di questi composti per migliorare la resistenza alle malattie delle piante e nella produzione di nuovi formulati anticrittogamici (Lorito *et al.*, 1994a) utili nella lotta integrata, permettendo di ridurre la quantità di pesticidi chimici e pertanto l'impatto ambientale. Diverse specie di *Trichoderma* sono utilizzati in preparati commerciali, ad esempio *T. harzianum* T39 è l'ingrediente attivo del Trichodex™ (Elad and Shitenberg, 1996). E' stato inoltre osservato che alcune specie di *Trichoderma* hanno un effetto sinergico con i PGPR (*Plant Growth Promoter Rhizobacteria*), microorganismi capaci di colonizzare le radici e produrre benefici alla coltivazione potenziando la crescita e controllando le malattie (Clavet *et al.*, 1993).

### 1.3 Le tracheofusariosi del pomodoro e del melone

#### 1.3.1 La coltivazione del pomodoro

Il pomodoro coltivato che, appartiene alla famiglia delle *Solanaceae*, è stato classificato per la prima volta da Carlo Linneo nel 1753 nel genere *Solanum* come *Solanum Lycopersicum*. Successivamente Philip Miller scisse il genere *Solanum* introducendo un nuovo genere *Lycopersicon*, comprendente a sua volta due subgeneri:

-*Eulycopersicon* C.H. Mull.

in cui sarebbero collocate la specie *Lycopersicon esculentum* Mill. e la specie *Lycopersicon pimpinellifolium* (L) Mill , che presentano frutti rossi e glabri;

- *Eriopersicon* C.H. Mull.

## Introduzione

in cui sarebbero collocate le specie: *Lycopersicon peruvianum*(L.) Mill; *Lycopersicon pissipi* Phil. ; *Lycopersicon cheesmani* Riley ; *Lycopersicon hirsutum* Humb. E Bonpl. ; *Lycopersicon glandulosum* C.H. Mull; che presentano frutti verdi e pelosi.

Secondo le attuali conoscenze si ritiene che il centro di origine del genere *Lycopersicon* sia l'area compresa nell'America latina, tra il Cile settentrionale, Perù ed Ecuador, dove sono diffuse forme selvatiche di *Lycopersicon esculentum* e *Lycopersicon pimpinellifolium*, passando successivamente nel Messico meridionale, dove probabilmente è avvenuto il primo miglioramento per la presenza di diverse forme. Una delle forme più ancestrali è il *Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme* (Dunnal)A.Gray, che è presente allo stato spontaneo nelle regioni tropicali e subtropicali. Nelle aree di più antica coltivazione, sono state riscontrate due direttrici nell'evoluzione della pezzatura e della forma del frutto, una verso l'aumento delle dimensioni dei loculi, con la formazione delle forme allungate, l'altra verso l'aumento del numero dei loculi, con la formazione delle forme a bacca piatta.

La coltura del pomodoro è praticata un pò in tutto il mondo, occupando una superficie stimata di circa 4.429.898 ha, con una produzione che si aggira intorno ai 123 milioni di tonnellate (FAOSTAT 2005).

Tabella 1.2 Coltivazione di pomodoro nel mondo superfici FAO 2005

N°	Nazione	ha
1	<b>Cina</b>	1.255.046
2	<b>India</b>	540.000
3	<b>Turchia</b>	255.000
4	<b>Egitto</b>	195.164
5	<b>U.S.A</b>	172.810
6	<b>Russia Federazione</b>	150.910
7	<b>Italia</b>	144.963
8	<b>Iran</b>	130.000
9	<b>Nigeria</b>	127.000
10	<b>Ucraina</b>	96.000
11	<b>Spagna</b>	69.900
12	<b>Messico</b>	67.084
13	<b>Brasile</b>	59.315
14	<b>Romania</b>	58.484
15	<b>Cuba</b>	58.100
16	<b>Uzbekistan</b>	56.380
17	<b>Indonesia</b>	52.719
18	<b>Sudan</b>	52.000
19	<b>Algeria</b>	47.000
20	<b>Grecia</b>	39.223

Tabella 1.3 Coltivazione di pomodoro nel mondo produzioni FAO 2005

N°	Nazione	Tonn.
1	<b>Cina</b>	30.143.929
2	<b>U.S.A.</b>	12.766.000
3	<b>Turchia</b>	9.440.000
4	<b>Italia</b>	7.682.504
5	<b>Egitto</b>	7.640.818
6	<b>India</b>	7.600.000
7	<b>Spagna</b>	4.441.800
8	<b>Iran</b>	4.200.000
9	<b>Brasile</b>	3.489.270
10	<b>Messico</b>	2.148.130
11	<b>Russia Federazione</b>	2.017.860
12	<b>Grecia</b>	1.932.000
13	<b>Romania</b>	1.330.085
14	<b>Uzbekistan</b>	1.245.470
15	<b>Marocco</b>	1.201.230
16	<b>Portogallo</b>	1.200.930
17	<b>Cile</b>	1.200.000
18	<b>Ucraina</b>	1.145.700
19	<b>Tunisia</b>	1.118.000
20	<b>Siria</b>	920.000

## Introduzione

Tabella 1.4 Europa coltivazione pomodoro superfici  
FAO 2005

N°	Nazioni	ha
1	Italia	141.258
2	Spagna	70.400
3	Romania	48.905
4	Yugoslavia, (Area Ex)	39.250
5	Grecia	39.000
6	Bulgaria	15.000
7	Portogallo	14.000
8	Polonia	13.000
9	Albania	6.500
10	Ungheria	6.000
11	Cecoslovacchia (Area Ex)	4.385
12	Francia	2.900
13	Paesi bassi	1.300
14	Belgio	460
15	Germania	450
16	Malta	280
17	Svizzera	200
18	Regno unito	191
19	Austria	184
20	Finlandia	122
21	Danimarca	100
22	Svezia	57
23	Norvegia	33
24	Irlanda	27
25	Islanda	4

Tabella 1.5 Europa coltivazione pomodoro  
produzioni FAO 2005

N°	Nazioni	Tonn.
1	Italia	7.814.899
2	Spagna	4.473.573
3	Grecia	1.700.000
4	Portogallo	1.200.930
5	Romania	821.451
6	Paesi bassi	645.000
7	Francia	630.600
8	Iugoslavia (Area ex)	454.000
9	Bulgaria	400.000
10	Ungheria	285.000
11	Belgio	230.000
12	Polonia	210.000
13	Albania	169.000
14	Cecoslovacchia (Area ex)	82.000
15	Regno unito	78.500
16	Germania	56.000
17	Austria	37.271
18	Finlandia	35.000
19	Svizzera	27.500
20	Svezia	20.086
21	Danimarca	20.000
22	Malta	14.657
23	Irlanda	10.000
24	Norvegia	9.042
25	Islanda	1.300

I primi cinque produttori a livello mondiale sono: Cina, U.S.A, Turchia, Italia ed Egitto. In Europa, la superficie interessata da questa coltivazione è di 404.006 ha con una produzione che si aggira intorno ai 19 milioni di Tonnellate (FAOSTAT 2005). I primi sei produttori europei sono l'Italia, la Spagna, la Romania, l'area dell'Ex Iugoslavia, la Grecia, la Bulgaria

Il *Lycopersicon esculentum* Mill. presenta diverse varietà botaniche, che differiscono per la morfologia della foglia e dei frutti: var. *comune*, var. *cerasiforme*, var. *piriforme*, var. *grandifolium*, , var. *valium*. Il pomodoro è una pianta a tendenza perennante , che però si comporta come una pianta annuale in condizioni climatiche caratterizzate da temperature molto variabili nei diversi periodi dell'anno. Il portamento della pianta originariamente espanso e strisciante, ha subito nel tempo diverse modifiche, in relazione agli interventi del miglioramento colturale, con la realizzazione di tipi a portamento più raccolto , fino a quasi al fusto eretto e con bacche di notevoli dimensioni. La radice è di tipo fittonante, ma con un'ampia rete di radici laterali più o meno superficiali, infatti il 70% dell'apparato radicale è situato

nei primi 30 cm di terreno. Lo stelo eretto nei primi stadi, è poi decumbente di altezza variabile fino ad anche 2 metri. Ci sono cultivar con tipologia di accrescimento indefinito e cultivar con tipologia di accrescimento determinato, nelle quali l'apice vegetativo dello stelo e dei germogli dopo aver dato luogo ad un certo numero di palchi fiorali termina l'accrescimento differenziandosi in una infiorescenza. Le foglie sono alterne grandi, con lunghezza che può arrivare fino ai 25 cm, picciolate e irregolarmente pennatosette. Le infiorescenze sono inserite sull'internodo, i singoli fiori sono portati da peduncoli articolati, con calice gamosepalo a cinque lobi persistenti. Anche la corolla è gamopetala di colore giallo con un numero di petali normalmente pari a cinque. Gli stami, solitamente in numero uguale ai petali, sono corti con antere biloculari connate all'apice, formando una colonna attorno al pistillo, costituito da un ovario supero con lo stamma che può sporgere più o meno dalla colonna staminale. Il frutto è una bacca, di colore rosso, di tonalità, di grandezza e forma molto variabile. La colorazione rossa è determinata dalla presenza del licopene, quella gialla dal  $\beta$ -carotene. Nel frutto si distingue: l'epicarpo, liscio e sottile, organizzato in una pellicola più o meno resistente formata da cellule poligonali; il mesocarpo, polposo e sugoso di sapore dolce acido con spessore più o meno rilevante, costituito da cellule a pareti sottili, tondeggianti ed ovoidi; l'endocarpo, suddiviso in due o più logge, è costituito da tessuto placentare nel quale sono immersi i semi più o meno numerosi. Il seme, discoidale e schiacciato, ha un tegumento provvisto di numerosi peli e contiene un embrione ricurvo, circondato da poco endosperma. Il processo germinativo avviene in un tempo più o meno lungo che può variare dai 6 ai 12 giorni e oltre, in dipendenza, oltre che dei fattori pedoclimatici, dal vigore del seme. La germinazione è epigea, i cotiledoni liberi dal tegumento seminale si accrescono in lunghezza e larghezza ed inizia la fase autotrofa della pianta; la fase cotiledonare dura dai sette a oltre quindici giorni. Il fusto è costituito da nodi ingrossati, dai quali si dipartono le foglie ed i getti ascellari, da internodi più o meno lunghi su cui si inseriscono le infiorescenze. I getti laterali primari si accrescono con la formazione di foglie e infiorescenze, dando luogo a getti ascellari secondari e successivi in relazione alle condizioni di vigore della pianta. Se non intervengono cause avverse, l'accrescimento continua fino a che perdurano le condizioni climatiche favorevoli ad eccezione delle cultivar ad accrescimento determinato che terminano il loro accrescimento differenziando una infiorescenza. La



fioritura è scalare, con la formazione delle infiorescenze in tempi diversi e su internodi successivi. Il miglioramento genetico si è indirizzato verso la selezione di varietà con tempo di formazione delle infiorescenze ridotto, allo scopo di ottenere contemporaneità di maturazione. Le infiorescenze possono essere racemi semplici o ramificati, i primi nella parte più bassa della pianta, i secondi in quella superiore. Anche sulla stessa infiorescenza la fioritura non è strettamente contemporanea, in essa si possono notare, dall'inserzione verso l'apice, frutticini, fiori aperti e fiori ancora chiusi. Il pomodoro coltivato è altamente autogamo. Infatti la conformazione del cono staminale, la deiscenza delle antere dalla parte interna verso lo stigma, che frequentemente non sporge dal cono staminale sono fattori che favoriscono l'autofecondazione. La deiscenza delle antere avviene 24-48 ore dopo l'antesi, prima nei fiori più vicini all'inserzione dell'infiorescenza sullo stelo poi gradualmente negli altri. Tuttavia si può verificare la fecondazione incrociata, ad opera di insetti pronubi, nei tipi a fiori longistili quando lo stigma fuoriesce dal cono staminale o nei casi di proteroginia. A fecondazione avvenuta inizia l'ingrossamento del frutto, che in pien'aria impiega dai quaranta ai sessanta giorni per raggiungere il massimo accrescimento, secondo il tipo di cultivar. La bacca matura assume colorazione diverse dal giallo chiaro a rosso di tonalità diverse. Nel corso della maturazione si riscontra un graduale aumento degli zuccheri e dell'acidità; la vitamina C aumenta in modo rilevante nella maturazione piena della bacca.

Il termine italiano pomodoro è riconducibile, secondo alcuni, al colore giallo dei primi frutti importati in Europa, all'inizio del sedicesimo secolo, soppiantati poco dopo da varietà a bacche rosse. Inizialmente la specie fu introdotta a scopo prevalentemente ornamentale. Intorno alla quarta decade del sedicesimo secolo, si hanno le prime notizie sulla possibile utilizzazione dei frutti di questa pianta. Mattioli, nel Dioscoride, fa il primo riferimento sulla introduzione del pomodoro nel vecchio mondo. Nel 1544 segnala la presenza in Italia di una specie, che produceva frutti schiacciati e costolati, dapprima verdi poi giallo oro, che potevano essere consumati con olio sale e pepe (Rick 1978). Nel sedicesimo e nel diciassettesimo secolo le notizie sul consumo dei frutti di pomodoro diventano sempre più frequenti, ma luminari ancora esprimono le loro perplessità sul consumo di questi frutti da molti ritenuti malsani se non velenosi. Durante, nel suo Herbario Novo, scrive che tali frutti : “....danno poco e cattivo nutrimento”. I pregiudizi circa l'utilizzazione del

pomodoro restarono radicati per quasi tutto il diciottesimo secolo, e la pianta venne presa in considerazione come curiosità botanica. La definitiva affermazione del pomodoro come pianta alimentare può farsi risalire alla fine del diciottesimo secolo, quando si avviò in Italia e contemporaneamente in altre parti del mondo, la coltivazione della specie per la produzione di bacche. Negli U.S.A. la prima coltivazione di pomodoro di cui si hanno notizie certe, risale al 1782 in Virginia, anche qui però il consumo di questo nuovo ortaggio destava qualche perplessità. Nel 1820 per suffragarne il valore alimentare, Gibbon Johnson ne consumò alcuni sulla scalinata del palazzo di giustizia di Salem presso New York. In Italia, fin dal 1812, il pomodoro veniva estesamente coltivato in Sicilia, in Campania e nel Lazio, ma fino alla prima metà del diciottesimo secolo i frutti erano destinati al consumo diretto, successivamente furono individuate forme di utilizzazione alternative suggerite dalla relativa facilità di lavorazione delle bacche. Infatti, nel 1809, Nicolas Appert pubblicò l'opera "L'art de conserver les substances alimentaires d'origine animale et végétale pour plusieurs années", mentre nel 1810 Peter Durand brevettò la scatola di latta, che venne poi utilizzata da Bryan Donkin e dall'americano Woodhull Crosby che nel 1847 preparò le prime scatole di pomodori conservati. Fu probabilmente nello stabilimento piemontese di Francesco Cirio che in Italia cominciò la produzione industriale dei pomodori conservati nell'ultimo quarto del diciannovesimo secolo. La prima produzione di un derivato del pomodoro stabilizzato si fa risalire al 1888 quando il Cavaliere Brandino Vignali attivò a Basilicanova (Pr) uno stabilimento per produrre "estratto di pomodoro", sfruttando una tecnica, che riprendeva quella della "conserva nera" ottenuta dalle famiglie contadine parmensi, facendo essiccare al sole il succo di pomodoro precedentemente concentrato in grandi pentoloni di rame. Nel 1910, le fabbriche di conserva censite nella provincia di Parma erano 36, ancora oggi tale zona rappresenta una delle più importanti realtà italiane dell'industria della trasformazione del pomodoro. Nello stesso periodo nell'agronocerino sarnese si sviluppava una tecnica per la produzione di pomodori pelati, molto più adatta al tipo di pomodoro lungo e liscio coltivato ai piedi del Vesuvio.

Lo sviluppo dell'industria alimentare in Italia naturalmente favorì lo sviluppo della coltura di pomodoro, la quale già negli anni antecedenti la prima guerra mondiale occupava oltre 20.000 ettari e determinò inoltre una progressiva differenziazione delle cultivar e delle tecniche produttive, in rapporto alla destinazione finale dei

frutti: da industria e da mensa. Tale differenziazione non è però rigorosa, quote più o meno rilevanti di prodotto delle coltivazioni per l'industria vanno ad alimentare annualmente il pomodoro da mensa; d'altra parte in rapporto alle condizioni del mercato, una quota della produzione di pomodoro da mensa può essere destinata all'industria di trasformazione. Una sicura discriminazione dei due indirizzi produttivi non può essere agevolmente fatta nemmeno sotto il profilo varietale. Varietà come il S.Marzano con bacche allungate sono indifferentemente utilizzate per il consumo fresco o indirizzate all'industria conserviera. In ogni caso il pomodoro da mensa presenta in Italia una più ampia articolazione colturale e le coltivazioni si possono dividere:

- in pien'aria per produzione di piena stagione
- in pien'aria per produzioni extrastagionali
- protette

Le coltivazioni in pien'aria per produzioni di piena stagione sono presenti in tutte le regioni d'Italia localizzandosi sia negli orti suburbani sia in pieno campo. Il prodotto è prevalentemente indirizzato ai mercati locali e il quadro delle cultivar è molto articolato e spesso espressione delle preferenze locali, per quanto concerne le caratteristiche delle bacche.

Le coltivazioni in pien'aria per produzioni extrastagionali viene attuata mediante l'uso di semplici apprestamenti temporanei delle piante. Infatti, grazie a queste mezzi di difesa dalle avversità climatiche, è possibile ottenere cicli colturali anticipati o posticipati nelle fasce costiere delle regioni del centro e del sud. L'obiettivo della extrastagionalità è spesso preminente a quello delle stesse rese.

Le coltivazioni protette, realizzate per tutta la durata del ciclo, sotto un apprestamento di protezione rappresentano l'espressione più moderna e intensiva della pomicoltura, garantendo trasferimenti temporali dei cicli da una stagione all'altra (serre condizionate), svincolandosi dal terreno (idroponica).

Il pomodoro da industria non presenta questa varietà di tecniche colturali ed è coltivato esclusivamente in pieno campo.

Grazie alle seminatrici pneumatiche di precisione ed alle tecnologie per il confettamento del seme, è possibile seminare il pomodoro in pieno campo senza provvedere al diradamento manuale. La semina diretta ha il vantaggio di ridurre i costi colturali, può condurre ad una buona uniformità delle piantine se il terreno è ben

preparato, consente l'ottenimento di piante con un buon apparato radicale e più robuste. Il trapianto può essere effettuato ottenendo le piantine da un semenzaio, allestito con vasetti di carta o di torba pressata, oppure con vassoi alveolari di polistirolo, che hanno avuto il maggior successo nei vivai orticoli e tra i coltivatori. I vantaggi del trapianto sono una migliore uniformità della coltura, un leggero anticipo nella raccolta, l'eliminazione d'alcune operazioni colturali per l'allestimento del letto di semina, maggior competizione con le infestanti. Inoltre le moderne macchine operatrici per il trapianto non provocano lesioni alle piantine. Il trapianto si effettua con piantine di 3-5 foglie vere con le radici protette dal panetto di substrato che le ha ospitate nel semenzaio.

### 1.3.2 La coltivazione del melone

Il melone appartiene alla famiglia delle *Cucurbitaceae*, sottofamiglia *Cucurbitoidae*, tribù *Melothriaceae*, sottotribù *Melothriinae*, genere *Cucumis*, specie *Cucumis melo L.*. La classificazione infraspecifica del melone è stata studiata nel 1859 da Naudin che individuò all'interno della specie numerose varietà botaniche tra queste quelle coltivate in Italia sono :

- var. *cantalupensis*, ( meloni cantalupi)
- var. *reticulatus*, ( meloni retati)
- var. *inodorus*, ( meloni invernali)

Il melone è una pianta annuale con radici cordiformi e fibrose, che possono raggiungere la profondità di due metri e possono estendersi altrettanto lateralmente; normalmente le più attive sono nei primi 30 cm di profondità. Il fusto è angoloso, quadrangolare e tormentoso, presenta ramificazioni ,che possono estendersi anche fino a cinque metri. Inoltre, la pianta presenta cirri dalla parte opposta delle foglie, che le permettono di aggrapparsi ai sostegni. Le foglie sono scabre alterne, picciolate, reniformi e palminervie con margine seghettato. La loro lunghezza varia dai 5 ai 20 centimetri e possono essere larghe dai 10 ai 30 centimetri. Il picciolo è lungo quasi quanto la lamina, ricurvo e succulento. Il *Cucumis melo L.* è comunemente una pianta andromonoica, (presenta contemporaneamente fiori ermafroditi e fiori con il solo organo maschile), ma esistono anche cultivar, che presentano fiori ermafroditi. I fiori sono ascellari con corolla gialla a cinque lobi; quelli maschili sono portati da

peduncoli corti e tormentosi riuniti in infiorescenze e ciascuno ha cinque stami (due a coppia e uno solitario). I fiori perfetti sono più grandi dei maschili, sono isolati o raramente accoppiati, portati da peduncoli più lunghi di quelli maschili. L'ovario ovoidale o sferoidale è infero triloculare a placentazione parietale ed ovuli anatropi (gli ovuli sono pendenti sul funicolo per cui il micropilo si trova adiacente ad esso, e la calaza si trova dalla parte opposta). Lo stigma è composto da 3-5 setti ed è portato da uno stilo corto e grosso. I fiori maschili compaiono per primi, quelli ermafroditi otto o dieci giorni dopo e sono disposti su ramificazioni di secondo ordine. Verso la fine della fioritura la percentuale di fiori ermafroditi è più alta di quelli maschili. I fiori maschili hanno la durata di un giorno, quelli ermafroditi se non fecondati possono rimanere ricettivi per due o tre giorni. L'apertura avviene la mattina presto e dura dalle sei alle quattro ore. Se mancano gli insetti pronubi, gli stigmi ricevono pochi granuli pollinici, infatti le antere dei fiori ermafroditi si aprono verso l'esterno, i fiori non fecondati dopo pochi giorni cadono. Per garantire un buon accrescimento dei frutti è necessario che venga fecondato un buon numero di ovuli, l'allegagione avviene dopo numerose visite degli agenti impollinatori. Una singola pianta di melone può portare da 25-70 fiori pistillati, ma solo il 10% circa allega correttamente e diventa frutto. La percentuale di allegazione varia però notevolmente tra le diverse cultivar. Il periodo antesi-maturazione dura dai 30 ai 60 giorni. Il frutto è una bacca corticata detto peponide unita alla pianta mediante un peduncolo; presenta esternamente l'epicarpo, che insieme alla parte più esterna del mesocarpo costituisce la scorza, il mesocarpo più interno, che costituisce la polpa, e l'endocarpo. La porzione centrale del frutto è costituita da tessuto placentare in cui sono inseriti i semi, che è spugnosa e riempie tutta la cavità ovarica quando è piccolo. Man mano che il frutto si accresce aumenta lo spazio libero e il tessuto diventa più flaccido, per poi disfarsi completamente, divenendo acquoso. I semi sono gialli o bianchi, con apici che possono essere appuntiti o arrotondati. Il peso di mille semi varia dai 20 ai 70 grammi.

Le cultivar coltivate in Italia possono essere raggruppate nelle tre seguenti varietà botaniche:

- var. *cantalupensis*, che presentano frutti di forma sferica o subsferica, con peso variabile tra i 600-1500 g, con superficie liscia di colore grigio verde tendente al giallo con la maturazione fisiologica. In qualche cultivar, alla

completa maturazione del frutto compare una leggera retatura. Le vecchie cultivar avevano pesi più elevati e la superficie verrucosa, presentavano inoltre solchi evidenti sulla superficie, che permettevano di individuare 9-12 costole. La polpa dei frutti è di colore rosa arancio fino al salmone. Hanno un periodo di conservazione post raccolta piuttosto breve. Le cultivar più conosciute sono la vedrantaïs e l'alpha

- var. *inodorus*, sono detti meloni d'inverno, per la possibilità di essere conservati per lunghi periodi, infatti possono realmente arrivare all'inverno se la raccolta avviene prima della completa maturazione. I frutti sono ovoidali e il peso si aggira tra i 1500-4000 g. l'epicarpo può assumere diverse colorazioni: dal bianco latte, al giallo o verde con tutte le tonalità intermedie, la colorazione può essere omogenea o striata. La polpa può arrivare ai 5 cm di spessore e può essere bianca, verde chiaro o giallastra. Il periodo che intercorre tra la semina e la raccolta, è generalmente più lungo di quello delle altre due varietà. Esempi di cultivar sono honey dew, tendral, giallo canaria, gialletto brindisino, rugoso napoletano.
- var. *reticulatus*, il peso dei frutti oscilla tra 1000-2500 g. e si presentano esternamente da una evidente reticolatura, formata da un elaborato sistema di lenticelle, che facilita gli scambi gassosi. A causa di tale caratteristica tali meloni vengono definiti comunemente "retati". La maggior parte di queste cultivar proviene dagli U.S.A.

Il centro di origine del melone sembra essere situato nell'Africa tropicale o subtropicale, mentre centri secondari vengono considerati l'Iran, India, Russia meridionale, Cina. In Italia giunse all'inizio dell'era cristiana. In Francia pare sia stato introdotto nel quindicesimo secolo proveniente dalla città di Napoli. I meloni appartenenti alla varietà *cantalupensis* pare siano stati portati dall'Asia da missionari nel quindicesimo secolo a Cantalupo, castello papale vicino Roma. Questa varietà di melone è stata successivamente migliorata notevolmente: nel 1516 era già coltivato nell'America centrale, nel 1609 in Virginia e nel 1629 lungo il fiume Hudson.

Le coltivazioni di melone nel mondo occupano una superficie di 1.281.918 ha con una produzione di 28 milioni di tonnellate (FAOSTAT 2005). I primi sei produttori mondiali sono la Cina, la Turchia, l'Iran, la Spagna, gli U.S.A., la Romania.

(FAOSTAT 2005). In europa la superficie interessata dalla coltivazione di melone è di 142.000 ha per una produzione di circa 3 milioni di tonnellate, i maggior produttori europei sono in ordine d'importanza : Spagna, Romania, Italia, Francia e Grecia (FAOSTAT 2005).

Tabella 1.6 Coltivazione di melone nel mondo superfici FAO 2005

N°	Nazioni	Ha
1	<b>Cina</b>	578.500
2	<b>Turchia</b>	103.000
3	<b>Iran</b>	80.000
4	<b>U.S.A.</b>	45.180
5	<b>Romania</b>	36.000
6	<b>Spagna</b>	35.200
7	<b>India</b>	31.500
8	<b>Messico</b>	31.500
9	<b>Italia</b>	28.254
10	<b>Marocco</b>	24.810
11	<b>Egitto</b>	24.000
12	<b>Pakistan</b>	17.318
13	<b>Panama</b>	15.000
14	<b>Arabia Saudita</b>	14.923
15	<b>Francia</b>	14.900
16	<b>Brasile</b>	14.500
17	<b>Giappone</b>	12.000
18	<b>Venezuela</b>	11.500
19	<b>Korea Rep. Dem. Pop</b>	11.000
20	<b>Ucraina</b>	11.000

Tabella 1.7 Coltivazione di melone nel mondo produzioni FAO 2005

N°	Nazioni	Tonn
1	<b>Cina</b>	15.138.000
2	<b>Turchia</b>	1.700.000
3	<b>Iran</b>	1.230.000
4	<b>Spagna</b>	1.176.900
5	<b>U. S.A.</b>	1.150.440
6	<b>Romania</b>	755.000
7	<b>Italia</b>	665.398
8	<b>Marocco</b>	665.000
9	<b>India</b>	645.000
10	<b>Egitto</b>	565.000
11	<b>Messico</b>	510.000
12	<b>Francia</b>	295.500
13	<b>Giappone</b>	270.000
14	<b>Pakistan</b>	258.004
15	<b>Korea Rep. Dem. Pop</b>	250.000
16	<b>Arabia Saudita</b>	245.564
17	<b>Venezuela</b>	230.000
18	<b>Costa Rica</b>	215.000
19	<b>Giappone</b>	190.230
20	<b>Guatemala</b>	188.163

Tabella 1.8 Europa coltivazione melone superfici FAO 2005

N°	Nazioni	Ha
1	<b>Romania</b>	36.000
2	<b>Spagna</b>	35.200
3	<b>Italia</b>	28.254
4	<b>Francia</b>	14.900
5	<b>Ucraina</b>	11.000
6	<b>Grecia</b>	8.500
7	<b>Portogallo</b>	3.000
8	<b>Malta</b>	2.500
9	<b>Moldova</b>	1.600
10	<b>Ungheria</b>	900
11	<b>Paesi bassi</b>	60

Tabella 1.9 Europa coltivazione melone produzioni FAO 2005

N°	Nazioni	Tonn
1	<b>Spagna</b>	1.176.900
2	<b>Romania</b>	755.000
3	<b>Italia</b>	665.398
4	<b>Francia</b>	295.500
5	<b>Grecia</b>	166.500
6	<b>Ucraina</b>	65.000
7	<b>Portogallo</b>	20.000
8	<b>Ungheria</b>	13.000
9	<b>Malta</b>	12.800
10	<b>Moldova,</b>	3.000
11	<b>Paesi bassi</b>	2.000

Le rese medie in Italia sono di 24 tonnellate ad ettaro e la superficie investita è di 28.000 ettari. Per la coltura in pien'aria la Sicilia assume notevole importanza con 4000 ha investiti, seguono poi: l'Emilia Romagna con 1.800 ha, la Puglia 1700 ha , il Lazio 1600 ha e la Lombardia 1400 ha. Le produzioni unitarie più elevate in Italia si riscontrano in Campania con 32 tonnellate ad ettaro, Lazio ed Emilia Romagna di 27 tonnellate ad ettaro. La coltivazione del melone in serra si aggira sui 1551 ha localizzati soprattutto in Lombardia, Emilia Romagna e Sicilia; la resa media unitaria

di questa coltura protetta è più elevata e si attesta intorno a 40 tonnellate ad ettaro con una punta di circa 68 tonnellate ad ettaro nel Lazio.

A causa della grande sensibilità della stragrande maggioranza delle cultivar alle fusariosi e alle verticilliosi, sarebbe consigliabile non coltivare il melone sullo stesso terreno per almeno un decennio. Se ciò non è possibile si potrebbe pensare a metodi biologici: l'impiego di alcune cultivar resistenti, il ricorso all'innesto erbaceo, l'inoculazione di antagonisti del patogeno; oppure a metodi che prevedano la sterilizzazione del terreno per via chimica o fisica. Le specie utilizzate come portainnesto sono la *Benincasa hispida* (Thumb.) Cogn. e la *Cucurbita ficifolia* Bouchè. La semina diretta si effettua quando la temperatura del terreno si è stabilizzata sui 12-15 °C generalmente viene eseguita a file. Per le colture pacciamate, sotto tunnel o in serra si fa ricorso al trapianto. Le radici, quando si rompono, emettono sostanze ad azione cicatrizzante che però non consentono un rapido assorbimento dell'acqua, questo è uno dei motivi per cui si ricorre esclusivamente a tutte quelle tecniche di trapianto che prevedono la conservazione del panetto di substrato attorno alle radici. In serra dove è necessario sfruttare al massimo la superficie disponibile, si raggiungono investimenti di 4-5 piante al m<sup>2</sup> impiegando apposite reti di sostegno. Il melone si adatta bene alla coltivazione idroponica, che abbinata ad una corretta filtrazione della soluzione circolante, permette di controllare bene molti dei patogeni che prediligono l'apparato radicale come corte di infezione.

### 1.3.3 *Fusarium oxysporum* e le tracheofusariosi.

#### *Fusarium oxysporum* Schlect: Fr.

Il genere *Fusarium* Link: Fr rappresenta un gruppo di funghi anamorfici ubiquitario ed eterogeneo, frequentemente isolati come saprofiti in acqua, suolo e in substrato organico in decomposizione (Luque *et al.* 1995) e patogeni responsabili di numerose malattie di piante, agenti di marciumi in numerosi ospiti e di micosi in uomini ed animali (Liddell, 1991). Molti dei funghi appartenenti a questo genere, a causa della produzione di micotossine, hanno una considerevole importanza come contaminanti degli alimenti. Le specie patogene per l'uomo, esplicano la loro azione in pazienti che presentano un apparato immunitario già indebolito e possono provocare: ulcere



infettive della cornea, infezioni cutanee, meningioencefaliti, onicomicosi, tumori e peritoniti (Thomas et Geraldine 1992 ; Godoy *et al.* 2004). Il genere *Fusarium* è conosciuto in tutto il mondo dai micologi come uno dei generi più difficili da distinguere in specie (Snyder e Hansen, 1939) per la elevata instabilità dei caratteri morfologici e fisiologici influenzati dall'ambiente e della scarsa corrispondenza tra caratteristiche morfologiche e patogenetiche (Goidanich, 1964). La prima pubblicazione riguardante *Fusarium* risale al 1809 (Link) e da allora le classificazioni sono state molte. La prima classificazione prevedeva la divisione delle circa sessantacinque specie di *Fusarium* allora conosciute, in 16 sezioni (Wollenweber e Reinking, 1935). I criteri di classificazione usati per suddividere le sezioni riguardano la presenza o assenza dei microconidi e la loro forma, la presenza o assenza di clamidospore, la loro disposizione sull'ifa (intercalare o terminale), la forma dei macroconidi e la forma della cellula basale dei macroconidi. Inoltre, in ogni sezione, si distinguono: specie, varietà e forme sulla base del colore dello stroma, dell'assenza o presenza di sclerozi, del numero di setti nei macroconidi, e delle dimensioni dei macroconidi. Il sistema di Wollenweber e Reinking (1935) risulta oltremodo complesso se si pensa che vengono considerati anche le differenti modalità di crescita su differenti substrati (pura influenza ambientale) come fattore per evidenziare differenze significative. Sono stati successivamente sviluppati dei sistemi tassonomici alternativi quali quello di Snyder e Hansen (1940, 9 specie), di Raillo (1950, 55 specie), di Gordon (1952, 26 specie), di Bilai (1955, 26 specie), Messiaen e Cassini (1968, 9 specie), Booth (1971, 44 specie), Matuo (1972, 10 specie), di Joffe (1974, 33 specie), Gerlach e Nirenberg (1982, 78 specie), di Nelson *et al.* (1983, 30 specie). Attualmente, si fa riferimento al sistema tassonomico proposto da Snyder e Hansen ed illustrato da Toussoun e Nelson (1976) basato sulla suddivisione in una decina di specie. In ogni specie, la varietà rappresenta l'entità morfologicamente distinta e in ogni specie vengono raggruppati insieme in forme speciali, gli individui che hanno una capacità comune di aggredire il medesimo ospite. Nell'ambito delle forme speciali si possono ancora distinguere le razze fisiologiche o patotipi distinguibili per la selettività cultivarietale. I *Fusaria*, di cui sia nota la forma perfetta, appartengono alla sottodivisione *Ascomycotina* e all'ordine *Hypocreales*. Possiedono dei periteci a parete soffice, flessibile o membranosa, e di solito brillantemente colorata. I periteci hanno, inoltre, un ostiolo ben definito (*Pyrenomycetes*). Sono

assenti vere parafisi libere, ma parafisi apicali che crescono verso il basso dal centro sono state osservate in varie specie nei primi stadi di sviluppo; gli aschi sono unitunicati, tipicamente clavati e monoamiloidi; le ascospore sono di solito mono- o trisetate. Le specie hanno spesso due stati conidici, conosciuti come microconidi e macroconidi; le loro modalità di formazione sono prevalentemente enteroblastiche (o fialidiche), ma i macroconidi possono essere generati anche in modo oloblastico. Una terza forma conidica è rappresentata dalla clamidospora: una spora tallica dalla parete poco ispessita, presente in molte specie e avente funzione di resistenza nell'ambiente. Tutti questi tipi di spore sono prodotte dal fungo in cultura e probabilmente nel suolo, sebbene solo le clamidospore possono sopravvivere a lungo nel terreno (Beckman 1987 ; Agrios 1997). Il micelio, inizialmente incolore, diviene più scuro con il passare del tempo e può assumere colorazioni che vanno dal: giallo chiaro, rosa chiaro, o viola.

Nella classificazione di Wollenweber e Reinking (1935) una delle 16 divisioni è la *Elegans* in cui si ritrova la specie chiamata *F. oxysporum* Schlecht: Fr. (Snyder e Hansen, 1939). Il concetto di specie generalmente include il concetto di fertilità sessuale; infatti due specie sono considerate diverse se non è possibile il loro incrocio o se la progenie a cui danno origine con la riproduzione sessuale è sterile. Tuttavia c'è un problema semantico, se si applica questo termine a forme, che si riproducono solo agamicamente. Una "specie asessuale" definizione coniata da Gordon (1993) "...è un raggruppamento senza significato biologico che viene caratterizzato da un complesso di ceppi unificati solo da caratteri morfologici". Tuttavia indagini molecolari accurate basate sull'analisi del DNA mitocondriale ottenuto dalla digestione dell'intero DNA con enzimi di restrizione confermano che fino ad ora tutti i ceppi di *F. oxysporum* esaminati (sia patogeni che non patogeni) sono strettamente correlati. Inoltre, le variazioni osservate possono essere ricondotte ad un unico ceppo grazie a semplici cambiamenti (Gordon & Okamoto 1992 a,b; Gordon 1993). La necessità di classificare tassonomicamente le diverse specie di *Fusarium* sulla base delle loro caratteristiche morfologiche, scaturisce dal fatto che lo stato teleomorfo della maggior parte dei casi non si conosce. Gli schemi tassonomici proposti raggruppano le diverse specie in sezioni, basandosi quindi su criteri morfologici. Tuttavia talvolta è veramente difficile distinguere la specie *Fusarium oxysporum* dalle differenti specie appartenenti alle sezioni *Elegans* o *Liseola*. Il quadro si complica se si considera che

molti ceppi di *Fusarium oxysporum* saprofiti e non patogeni, che sono utilizzati come agenti di biocontrollo, sono morfologicamente indistinguibili dai ceppi patogenetici. Il *F. oxysporum* è presente in natura come saprofita e come agente di fitopatie (tracheomicosi). Tra i *F. oxysporum* sono state descritte più di 120 *formae speciales*, ognuna delle quali è specifica per una specie vegetale. Nell'ambito delle diverse forme speciali si distinguono numerose razze fisiologiche o patotipi (Armstrong e Armstrong, 1981). La divisione in forme speciali e patotipi (Snyder e Hansen, 1940) ha un'origine fisiologica basata su criteri patogenetici e non evidenzia in modo corretto i rapporti genetici tra isolati patogeni diversi. Per distinguere le diverse *formae speciales* e le razze fisiologiche si utilizzano i biosaggi. Questi però, anche se molto utili, non possono stabilire che un ceppo sia non patogeno. Per avere questo tipo di risposta sarebbe necessario inoculare il ceppo da testare su un numero elevatissimo di ospiti di specie coltivate diverse e delle loro diverse cultivar. Ciò ovviamente è impossibile. Bisogna inoltre considerare il fatto che le prove sarebbero con le specie di piante maggiormente coltivate, e non con tutte le piante che compongono un dato ecosistema. Pertanto, i ceppi non patogeni di *F. oxysporum* sono ceppi che hanno fallito nell'indurre uno stato infettivo in un limitato numero di specie di piante sulle quali sono stati inoculati. (Fravel 2003). Sono entrambe valide le teorie secondo cui un patogeno si evolva da una precedente forma speciale patogena o da un insieme di funghi ad attività saprofitica. In natura si possono trovare isolati che possiedono la medesima specificità d'ospite anche se distanti geneticamente. E' il caso di un ceppo di *Fusarium oxysporum* f.s. *cubense* patogeno del banano, che potendo infettare il pomodoro, causerebbe una malattia che presenta molte similitudini con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*: la patogenicità verso l'ospite acquisita dai due isolati indipendentemente, evidenzerebbe la loro origine polifiletica (Gordon e Martyn, 1997). Diversamente nel caso dei *Fusaria* patogeni delle *Cucurbitaceae* si sarebbe mostrata la discendenza da un unico progenitore (Gordon e Martyn, 1997). Per studiare l'origine monofiletica o polifiletica di una forma specializzata o di una nuova razza, si devono valutare i diversi casi con metodiche differenti. La comparsa di una nuova infezione in una nuova area, o di un nuovo patotipo (razza fisiologica), può essere spiegata con il fatto che il patogeno sia stato introdotto o che si sia generato localmente. L'introduzione, non deliberata, di un patogeno in una nuova area è disciplinata da regole di quarantena severe che in un

momento di libero scambio come quello odierno spesso vengono superate. Spesso, l'ampia distribuzione di un isolato patogeno è da ricondurre alla dispersione clonale di un singolo genotipo, accidentalmente introdotto; tale ipotesi è facilmente verificabile tramite l'analisi comparativa dei VCGs: se il nuovo patogeno è stato introdotto accidentalmente o deriva da uno preesistente in quell'area allora, verosimilmente, non sarà compatibile con le specie indigene. La seconda ipotesi, invece, trova la sua spiegazione nella derivazione da una forma preesistente nella selezione di un individuo proveniente dalle popolazioni di isolati non patogeni di *F. oxysporum*. Le analisi filogenetiche condotte con tecniche di ibridazione dimostrano, a questo riguardo, che le varie razze di *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* possono essere ricondotte ad un comune antenato (Kistler *et al.*, 1991). Le razze fisiologiche 1, 2 e 3 di *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, tutte appartenenti al VCG 0030 (Elias e Schneider, 1991), sottoposte ad analisi con RFLP sul DNA nucleare permettono di confermare l'associazione al VCG 0030 e di ipotizzare una derivazione delle diverse razze, l'una dall'altra. Per *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* l'applicazione delle diverse tecniche di caratterizzazione molecolare (VCG, RFLP, cariotipi elettroforetici, distribuzione degli elementi trasponibili *impala* e *Fot1*, PCR) ha permesso di ipotizzare l'evoluzione della razza 8 a partire dalle razza 1 per la perdita di un fattore di avirulenza (Chiocchetti *et al.*, 1999).

### Tracheofusariosi

Sotto il nome di tracheomicosi si annoverano malattie caratterizzate dalla prevalente localizzazione del patogeno di natura fungina nel sistema vascolare legnoso delle piante. Molte forme speciali di *F. oxysporum* sono i più comuni e diffusi agenti di tracheomicosi delle piante (tracheofusariosi). Le forme speciali di *F. oxysporum* diffondono i loro propaguli per via aerea e penetrano nell'ospite di solito attraverso il sistema radicale. *F. oxysporum* non presenta la forma perfetta, ma produce tre tipi di spore asessuate: macroconidi, microconidi e clamidospore. Queste ultime sono la forma di resistenza del patogeno che, in presenza degli essudati radicali delle piante ospiti e delle condizioni ottimali, rompono la quiescenza e germinano. I sintomi tipici delle malattie vascolari includono: nanismo, appassimento, clorosi, scolorimento vascolare, necrosi e morte della pianta. I diversi sintomi possono comparire

## Introduzione

contemporaneamente, in successione o prevalere gli uni sugli altri in funzione dell'ospite, del patotipo del parassita e delle condizioni ambientali. La caratteristica più evidente e costante è l'imbrunimento dell'apparato vascolare legnoso, che deve essere assunto come indizio diagnostico di primo ordine (Matta A. 1996). Possono essere interessate da tracheofusariosi piante in qualsiasi stadio di sviluppo, ma sono le infezioni contratte precocemente quelle che causano danni economici più rilevanti. Il patogeno penetra nell'ospite attraverso le micro-ferite dell'apparato radicale, provocate da nematodi o nelle operazioni di trapianto, dalle lesioni che si verificano nei meristemi apicali in accrescimento e nella zona di formazione delle radici laterali, dove la suberificazione dell'epidermide è ancora incompleta, e la sua diffusione è di tipo intercellulare (Brandes, 1919; Smith e Walker, 1930; Ullstrup, 1937). Durante la colonizzazione dei tessuti il patogeno si sposta verso i vasi legnosi e una volta raggiunto l'interno del sistema vascolare, il patogeno rimane confinato negli elementi dei vasi xilematici, e si diffonde verticalmente nella pianta in queste cellule (Brandes, 1919; Pennypacker e Nelson, 1972; Tisdale, 1917). In un secondo momento, il fungo penetra nelle cellule del parenchima xilematico circostante, attraversando le punteggiature areolate sulla parete dei vasi stessi (Pennypacker e Nelson, 1972; Phipps e Stipes, 1976).



Foto 1.3 Sintomi di imbrunimento del tessuto xilematico in una pianta di melone infetta da *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (T.A Zitter)



Foto 1.4 Sintomi di imbrunimento del tessuto vascolare legnoso in una pianta di pomodoro infetta da *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Franci Cellar)

La colonizzazione del sistema vascolare dell'ospite da parte del fungo è rapida e si osserva la produzione di conidi liberi di muoversi nella corrente xilematica, fino a che non incontrano i setti trasversi punteggiati, posti fra due elementi dei vasi. Non potendo superare l'ostacolo a causa delle loro dimensioni, i conidi germinano, superando il setto con i sottili tubuli germinativi. Oltre l'elemento xilematico il fungo produce conidiofori e conidi che vengono trasportati al setto successivo dal flusso xilematico. Il processo di colonizzazione dell'ospite verso l'alto procede "a salti". I *Fusaria* agenti di tracheomicosi, nel processo di colonizzazione dell'ospite producono enzimi degradativi (Deese e Stahmann, 1962, Gothoskar *et al.*, 1953). Gli enzimi prodotti da questi patogeni sono in prevalenza di tipo pectolitico con effetti di macerazione cellulare e di ostruzione dei vasi. Le piante ospiti generalmente hanno approntato sistemi di difesa nei riguardi della maggior parte delle forme speciali di *F. oxysporum* patogene. Sono in grado di produrre gel, gomme e tulle all'interno degli elementi dei vasi xilematici (Pennypacker, 1981) e nelle cellule dell'epidermide, ipodermide e cortex delle radici, la presenza del patogeno stimola l'ispessimento della parete in corrispondenza dei punti di penetrazione, che possono evolvere in papille, caratteristiche formazioni coniche, con base poggiante sull'interno della parete cellulare, che crescono tra parete e plasmalemma in seguito a deposito di

calloso ( $\beta$ -1,3-glucano) e di lignina attorno all'ifa del patogeno. Il deposito di gel e gomme di natura pectica ed emicellulosica, che accompagna la colonizzazione dello xilema, inizia dapprima a livello dei setti trasversi e procede, quindi, sulle pareti laterali dei vasi. La produzione di tillo nei vasi legnosi da parte delle cellule parenchimatiche annesse ai vasi stessi, è un ulteriore ostacolo alla diffusione del parassita vascolare.

La loro formazione sembra essere ospite-dipendente, ed è stata rilevata solamente durante l'infezione del banano (Beckman, 1969; Beckman e Zarogian, 1967), melone e patata dolce (Matta 1996). Nel caso del banano la formazione delle sostanze gelatinose incomincia dalla superficie superiore dei setti trasversi ed è causata dall'ingrossamento degli stessi setti e della porzione terminale della parete dei vasi. Le gomme, le tille e le pareti dei vasi possono essere impregnate sia da composti antibiotici, come i tannini, sia da altri composti fenolici rapidamente ossidati in chinoni: questi ultimi, rilasciati dalle cellule associate ai vasi, rendono i vasi impermeabili all'acqua e, frapponendosi negli spazi intercellulari, impediscono gli scambi di tossine e nutrienti tra il patogeno ed i tessuti circostanti (Matta 1996). La formazione di gomme può dipendere da gelificazione dei prodotti di degradazione della parete di vasi, operata dagli stessi enzimi pectolitici del patogeno, o da enzimi della stessa pianta, attivati in risposta all'infezione. Si ritiene che possano giocare un ruolo importante nel contenimento del patogeno le cellule annesse ai vasi xilematici con ipertrofie, che si traducono in tillosi, con ipertrofie, in grado di delimitare e sostituire vasi o interi gruppi di vasi infetti e tramite fenomeni degenerativi irreversibili come imbrunimenti e gommificazioni (Matta 1996). Nella comparsa della malattia è fondamentale la velocità relativa con cui avvengono i fenomeni di colonizzazione del patogeno e di difesa della pianta. Se le difese sono attivate rapidamente e in modo persistente, i conidi si ritrovano confinati in "sacche d'invasione". Gel e gomme rilevate nel: garofano (Pennypacker e Nelson, 1972), nella mimosa (Phipps e Stipes, 1976), nella patata dolce (McClure, 1950), e nell'anguria (Nishimura, 1971), giocano un importante ruolo nel limitare la diffusione del patogeno, intrappolando i conidi fra gli elementi dei vasi. Tuttavia se il gel persiste solamente per un limitato lasso di tempo, se le tille ritardano a formarsi o se non si formano affatto, i conidi sono liberi di diffondere oltre l'occlusione vascolare, e l'infezione si traduce in blocchi via via più estesi del trasporto xilematico (Beckman,

1966). In virtù delle molteplici anastomosi tra vasi, che consentono il facile aggiramento delle occlusioni, la disfunzione di una parte anche rilevante dell'apparato vascolare del fusto non necessariamente è seguita da sintomi esterni evidenti di appassimento e di avvizzimento. Essi diventano irrimediabili ed evidenti quando il patogeno colonizza il sistema xilematico dei piccioli e delle nervature fogliari, non ridondante e privo di anastomosi laterali (Matta 1996).

### *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

La tracheofusariosi del pomodoro causata dal fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht Fr. f.sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hans, fu descritta per la prima volta da Masee nel 1895 (Booth 1971). La malattia ha una rilevanza di portata mondiale, la sua presenza è stata riscontrata in almeno 32 stati (Jones *et al.* 1991). La malattia trova il suo optimum in terreni acidi e sabbiosi, con temperature del suolo e dell'aria di 28°C. Se la temperatura del terreno è troppo alta (34°C) o troppo bassa (17-20°C) lo sviluppo del patogeno viene rallentato.

Quando la temperatura del terreno è a livello ottimale, ma quella dell'aria ne è al di sotto, il patogeno colonizza la parte bassa dello stelo e la pianta non mostra sintomi evidenti. (Clayton 1923). Il patogeno può essere propagato a lunga distanza per mezzo di: semi infetti, terreni o acque contaminate e con il trapianto di piantine infette (Booth 1971). Tre razze fisiologiche di *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* sono state fino ad ora classificate, e si distinguono per la diversa virulenza verso le cultivar di pomodoro, che contengono i geni per la resistenza ( Stall 1961; McGrath *et al.* 1987). La razza 1 del *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* è stata quella inizialmente descritta nel 1886 (Booth 1971) . Successivamente, Bohn e Tucker (1939-1940) scoprirono un alto livello di resistenza alla malattia nel *Lycopersicon pimpinellifolium*. Il carattere era governato da un singolo gene dominante, denominato geneI. Negli anni successivi questo gene fu incorporato in tutte le cultivar commerciali, che in campo non mostravano alcun sintomo della malattia.





Foto 1.5 Attacchi di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* su diversi tipi di coltivazione di Pomodoro

Poco dopo la scoperta del geneI, Alexander, della stazione sperimentale per l'agricoltura dell'Ohio, volendo creare una nuova linea di pomodoro che avesse la resistenza alla tracheofusariosi acquistò le linee che avevano il geneI da Tucker e cominciò ad effettuare gli incroci. Ottenuta la progenie, volle testarla con un ceppo isolato da una pianta infetta in una serra nel nord dell'Ohio, il risultato fu che tutte le piante inoculate morirono. Alexander informò Tucker che le linee da lui fornite non erano resistenti al *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Per risolvere la differenza di risultati ottenuti, i due ricercatori si scambiarono gli isolati del fungo e le linee varietali. Dopo aver effettuato i test, entrambi arrivarono alla conclusione che l'isolato di Alexander era una nuova forma del patogeno, che denominarono razza 2 (Alexander & Tucker

1945). Poichè la nuova razza non era ancora diffusa, i costitutori varietali non erano interessati a creare nuove linee resistenti, quindi tutte le cultivar disponibili sul mercato erano suscettibili alla razza 2, incluse naturalmente, quelle con il gene I. La nuova razza tuttavia fu segnalata per aver provocato seri danni in Florida nel 1961 e successivamente in molti altri stati del mondo: Australia, Brasile, Gran Bretagna, Israele, Messico, Marocco e Olanda. Ma Alexander (1955 ;1959) ha avuto la lungimiranza di iniziare uno screening su varietà botaniche selvatiche del *Lycopersicon esculentum* e su specie selvatiche per cercare una fonte di resistenza alla nuova razza del patogeno già dal 1955, trovandola in un ibrido (*L.esculentum* x *L.pimpinellifolium*). La resistenza alla razza 2 sembra essere regolata da due singoli geni dominanti uno conferisce la resistenza alla razza 1 ed l'altro alla razza 2. Il gene che conferisce la resistenza alla razza 2 fu denominato gene I-2. La razza 3 è stata per la prima volta individuata in Australia nel 1978 (Grattidge e O'Brien 1982) poi fu successivamente rinvenuta in California Arkansas e North Carolina (Marlatt 1996). Attualmente sono disponibili solo poche cultivar con la resistenza alla razza 3. (Jones *et al.* 1991).

Fino ad ora sono state riportate 4 forme di compatibilità vegetativa per il *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* : 0030-0033 (Katan 1999). I ceppi testati della razza 1 e della razza 2 ricadono nei VCGs: 0030,0031,0032,(Elias & Snider 1991) quelli della razza 3 ricadono nei VCCs 0030 e 0033 (Elias & Snider 1991; Marlatt 1996).

### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.**

L'agente eziologico della tracheofusariosi del melone é il *Fusarium oxysporum* Schlecht Fr. f.sp. *melonis* (Leach & Currence) W.C. Snyder & H.N. Hans. , la malattia è diffusa in tutto il mondo, si presenta in : Italia (Corazza 1998 ;Belisario *et al.* 1999, 2000 ), Spagna (Gomez & Tello), America del Nord e America centrale (Zuniga *et al.* 1999), Asia (Abou-Jawdah & Al-Khoury 1996; Erzurum *et al.* 1999; Namiky *et al.* 1998) e Africa (Shreuder *et al.* 2000). Le epidemie di questa tracheofusariosi possono essere devastanti e portare a perdite di produzione che possono arrivare al 100% (Wechter *et al.* 1995). Una volta introdotto in campo, il patogeno *F. oxysporum* f. sp. *melonis* può sopravvivere anche dopo lunghe rotazioni con specie non ospiti (Banihashemi *et al.* 1975 ; Gordon *et al.* 1989). Infatti il fungo

## Introduzione

può vivere saprofiticamente sui residui colturali di piante non ospiti e inoltre può sopravvivere nel suolo sotto forma di clamidospore (Banihashemi *et al.* 1975 ; Gordon & Okamoto 1990; Gordon *et al.* 1989; Zuniga *et al.* 1997). A causa della grande persistenza del patogeno nel suolo la malattia può essere controllata con l'uso di cultivar resistenti (Zuniga *et al.* 1997).



Foto 1.6 Danni alla coltivazione di melone in pieno campo provocati dal *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (T.A Zitter)



Foto 1.7 Sintomi su melone indotti dal patogeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (T.A Zitter)

Risser *et al.* (1976) hanno designato le seguenti razze fisiologiche basandosi sul superamento della resistenza genetica di alcune cultivar dell'ospite da parte di alcuni ceppi del patogeno: Razza 0, Razza 1, Razza 2, Razza 1,2. La razza 1-2 è stata ulteriormente suddivisa in Razza 1-2w e Razza 1-2y che conducono rispettivamente alle precipue sintomatologie di avvizzimento (wilt) e ingiallimento (yellow).

La razza 0 induce malattia su quei genotipi di melone che non presentano nessun tipo di geni di resistenza. I geni per la resistenza al *F. oxysporum* f. sp. *Melonis* sono stati individuati nel genoma del melone e sono stati denominati Fom-1 e Fom-2. Questi caratteri sono monogenici ed ereditati indipendentemente; sono, inoltre, entrambi dominanti. Il gene Fom-1 conferisce la resistenza alle razze 0 e 1, il gene Fom-2 conferisce resistenza alle razze 0 e 2 (Risser *et al.* 1976; Zink 1992; Zuniga *et al.* 1997). La presenza di entrambi i geni in una singola pianta conferisce la resistenza alla razza 0, 1 e 2, ma non alle 1,2y e 1,2w di cui non sono ancora stati individuati geni per la resistenza (Messiaen *et al.* 1962; Risser *et al.* 1976; Zink 1990, 1992;

Wechter 1995). Dei geni recessivi che conferiscono resistenza alla razza 1-2 sono stati trovati in alcuni genotipi. Tuttavia il carattere è poligenico, per cui un buon grado di resistenza viene espresso dalle linee omozigoti recessive, che possono essere ottenute da individui doppio-aploidi ottenuti partogeneticamente da polline irradiato (Ficcadenti 1995; Sestili 1994). I gruppi di compatibilità vegetativa del *F. oxysporum* f. sp. *melonis* identificati sono 8: 0130-0136, 0138, tuttavia ci sono degli isolati aggiuntivi, che non mostrano alcuna compatibilità. (Katan 1999).

### **Lotta alle tracheofusariosi**

Le strategie di lotta contro le tracheomicosi comprendono interventi di profilassi e la ricerca di ospiti resistenti. La profilassi consiste nella prevenzione della malattia, che si ottiene proteggendo la pianta, ovvero impedendo che il patogeno inizi il processo patogenetico. Questo può essere conseguito con trattamenti chimici o fisici indirizzati al suolo (specialmente nelle colture in serra).

I trattamenti con fumiganti chimici al terreno hanno scarsa selettività e provocano un vero e proprio vuoto biologico nel suolo che, in un secondo tempo, potrebbe essere interamente colonizzato da un nuovo patogeno allo sviluppo del quale non si opporrebbe alcun microrganismo antagonista.

I trattamenti fisici al terreno prevedono l'utilizzo del calore per la devitalizzazione dei propaguli dei patogeni, questi si effettuano mediante l'insufflazione nel terreno di vapore d'acqua ad elevata temperatura, o mediante la solarizzazione. La prevenzione della malattia può essere attuata anche con mezzi agrotecnici come le rotazioni. Queste sono efficaci se si alternano piante non ospiti del patogeno, è evidente quindi che le probabilità di successo in questo caso sono maggiori quanto è minore la polifagia del patogeno.

Ospiti resistenti sono disponibili sotto forma di varietà o di ibridi F1. C'è anche la possibilità di innestare le varietà commerciali su varietà o ibridi selezionati esclusivamente in base alla resistenza, senza riguardo alle caratteristiche produttive.

## **2 Scopi del lavoro**



### 2 Scopi del lavoro

Lo scopo principale del presente lavoro è stato quello di esaminare diversi ceppi di *Trichoderma* spp. per valutarne:

- la capacità di biocontrollo verso un ceppo di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, agente causale della tracheofusariosi del pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e verso un ceppo *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, agente causale della tracheofusariosi del melone (*Cucumis melo* L.)
- L'attività di promozione di crescita eventualmente esercitata sulle piantine di pomodoro e melone.

La prova è stata basata su un sistema che ha previsto la contemporanea presenza della pianta ospite, del patogeno e del potenziale antagonista. Le piante ospiti sono state seminate in vassoi alveolari, la presenza dell'antagonista è stata garantita iniettando una sospensione conidica acquosa nel substrato contenuto nell'alveolo. Successivamente le piantine sono state trapiantate in vasi contenenti terreno precedentemente contaminato con un inoculo del patogeno e in vasi contenenti terreno non inoculato per ottenere gli opportuni controlli. Proprio sulle piante contenute in questi ultimi sono state effettuate le misurazioni per valutare l'attività di promozione di crescita.

La fase successiva del lavoro è stata incentrata nell'effettuare ulteriori indagini in vivo sui 4 isolati di *Trichoderma* spp., che si sono rivelati migliori nel controllo della malattia, al fine di indagarne la competenza rizosferica e l'endofitismo in piante di pomodoro. Inoltre i quattro isolati selezionati sono stati utilizzati, in vitro in prove di antagonismo e micoparassitismo nei confronti di alcuni isolati di *Fusarium oxysporum* formae speciales *lycopersici* e *melonis* al fine di indagarne i meccanismi d'azione quali agenti di lotta biologica.

# **3 Materiali e metodi**



### 3.1 Materiali

#### 3.1.1 Substrati utilizzati per la crescita degli isolati fungini

##### **Potato Dextrose Agar (PDA)**

PDA (Difco) 39 gL<sup>-1</sup> in acqua distillata.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20'.

##### **Agar Acqua (WA)**

Agar (Difco Bacto Agar) 20 gL<sup>-1</sup> in acqua distillata.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20'.

##### **P190 : substrato selettivo per *Trichoderma* spp.**

PDA (Difco) 30 gL<sup>-1</sup>

Streptomicina 50 ppm

Bacitracina 7500 U.I.

Hymexazolo 0,3 gL<sup>-1</sup>

Plantwax 190 ppm

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20'.

##### **Komada: substrato selettivo per *Fusarium* spp.**

Pentacloronitrobenzene 75% p.p.

Oxgall 0,5 gL<sup>-1</sup>

Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O 1 gL<sup>-1</sup>

Streptomicinasolfato 0,3 gL<sup>-1</sup>

pH 3,8 ±0,2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20'.

### 3.1.2 Substrati utilizzati per la crescita e lo sviluppo delle piante

#### Klasman Potgrond H ®

Substrato specifico per la semina in vassoi alveolati di colture orticole, a base di torba neutra ottenuta da torbe nere e bionde di sfagno.

Elementi in percentuale in peso sulla sostanza secca:

Tabella 3.1 composizione Klasman Potgrond H

Carbonio di origine biologica	35%
Azoto organico	0,8%
Sostanza organica	90%
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,0-6,0
pH (H <sub>2</sub> O)	5,5-6,5
C.E.	40mS/m (± 25%)
Ammontare del fertilizzante aggiunto	NPK 14:16:18 1,5Kg/m <sup>3</sup>

#### Terreno per invaso

1/3 Terreno naturale

2/3 di substrato a base di torba Klasman Potgrond H ®

Fertilizzante a lento rilascio Osmocote® Exact 1 Kg/m<sup>3</sup>

Tabella 3.2 composizione Osmocote® Exact della Scotts®

Azoto totale (N)	16%
Anidride fosforica (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	11%
Ossido di potassio (K <sub>2</sub> O)	11%
Ossido di magnesio (MgO)	3%
Boro	0,01%
Rame	0,170%
Ferro	0,40%
Manganese	0,05%
Molibdeno	0,014%
Zinco	0,015%

### 3.1.3 Isolati fungini

Tredici diversi isolati di *Trichoderma* spp sono stati saggiati per il controllo delle tracheofusariosi del pomodoro e del melone, causate rispettivamente da *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* e da *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis*. Dei medesimi isolati è stata valutata l'attività di promozione di crescita esercitata su piante di pomodoro e melone . Gli isolati provengono dalla collezione del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose, Facoltà di Agraria (Università di Pisa),

## Materiali e metodi

dove vengono conservati in tubi di coltura contenenti PDA, sott'olio minerale a 4 °C. In tabella 3.3 sono riportati gli isolati di *Trichoderma* spp. utilizzati nei test di controllo della malattia in vivo

Tabella 3.3 Isolati di *Trichoderma* spp

Specie	N° Isolato	Matrice
<i>Trichoderma</i> sp.	372	Terreno S.Rossore (Pisa, Italia)
<i>Trichoderma virens</i>	1058 (I10)	
<i>Trichoderma koningii</i>	2046	
<i>Trichoderma asperellum</i>	4207	
<i>Trichoderma asperellum</i>	4603	
<i>Trichoderma minutisporum</i>	4839	Mapple suolo foresta (Quebec, Canada)
<i>Trichoderma fasciculatum</i>	4876	Corteccia di <i>Betula</i> sp. (Netherland, Vaals)
<i>Trichoderma erinaceum</i>	5234	Thailand, Coral island (Kohn Lann) Pattaya
<i>Trichoderma harzianum</i>	5871	
<i>Trichoderma</i> sp.	6421	Leccio
<i>Trichoderma harzianum</i>	6755	Colignola (Pisa, Italia)
<i>Trichoderma harzianum</i>	6776	Colignola (Pisa, Italia)
<i>Trichoderma viride</i>	8209	Legno Australia

Di seguito sono riportati i due isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e f.sp. *melonis* utilizzati per la prova di controllo biologico *in vivo* ( tabella 3.4) e nello screening *in vitro* (tabella 3.5)

Tabella 3.4 isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *melonis*

Specie	Forma specialis	Razza fisiologica	N° ceppo
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R1	4360
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R1-2	4424

Tabella 3.5 isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *melonis*

Specie	Forma speciale	Razza fisiologica	N° ceppo
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R1	4427
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R1	4360
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R2	4288
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R2	4375
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R1	4427
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R1	4408
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R1-2	4424
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R0	4425
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R0	4426
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R2	4287

I microrganismi fungini sono stati allevati su piastre petri contenenti PDA

### 3.1.4 Colture vegetali

*Cucumis melo* L. var. *inodorus* C.V. Rugoso di Cosenza giallo

*Lycopersicon esculentum* Mill. 2810 lotto AH 638

### 3.1.5 Macchinari impiegati

**Impellettatrice per semi (seed dresser) Hege 11<sup>®</sup> della Hans Ulrich Hege.**

Si tratta di un macchinario progettato per il trattamento dei semi con materiale liquido. E' costituito da un telaio ed un motore elettrico un dischetto scanalato rotante e un contenitore semisferico per l'impellettamento (anch'esso) rotante, della capacità di un litro. Il seme deve essere posto all'interno del contenitore che viene fatto girare dal motore ad una velocità di 3000 giri al minuto. I semi spinti dalla forza centrifuga aderiscono alle pareti del contenitore mentre avviene la miscelazione con il prodotto, che deve essere immesso sul dischetto rotante scanalato, per essere omogeneamente distribuito sulla superficie del seme.

## 3.2 Metodi

### 3.2.1 Test “*in vivo*” di controllo delle tracheofusariosi di pomodoro e melone e di promozione di crescita delle piante.

#### Allestimento delle colture

La prova di controllo biologico della tracheofusariosi del pomodoro e del melone è stata condotta nel periodo tra aprile e luglio 2005, presso i laboratori di San Piero a Grado ( Sezione di Patologia Vegetale , Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose , Facoltà di Agraria Università di Pisa). Sono stati saggiati gli effetti dovuti all'inoculo nel terreno di sospensioni conidiche di tredici ceppi di *Trichoderma*, in cui sono state allevate plantule di melone e pomodoro, che sono poi state trapiantate in vasetti contenenti una miscela di terreno naturale e torba precedentemente contaminata rispettivamente con un ceppo di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e uno *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Nella prova, per ognuna delle due specie vegetali impiegate, sono state predisposte 28 tesi replicate 4 volte (a tempi diversi):

## Materiali e metodi

- 13 tesi con piantine sottoposte all'inoculazione con sospensione conidica dei 13 diversi isolati di *Trichoderma* e poi trapiantate in vasetti contenenti terreno non artificialmente contaminato con il patogeno.
- 13 tesi con piantine sottoposte all'inoculazione con sospensione conidica dei 13 diversi isolati di *Trichoderma* e trapiantate in vasetti contenenti terreno artificialmente contaminato con il patogeno
- 1 tesi di controllo con piantine non inoculate con sospensione conidica di *Trichoderma* e poi trapiantate in terreno non artificialmente contaminato con il patogeno
- 1 tesi di controllo con piantine non sottoposte all'inoculazione con sospensione conidica e poi trapiantate in terreno artificialmente contaminato con il patogeno.

Per ciascuna tesi sono state utilizzate tre piantine.

La semina di entrambe le specie vegetali è stata effettuata in vassoi di polistirolo composti da 104 alveoli, contenenti come substrato Klasman Potgrond H<sup>®</sup>. I vassoi sono stati posti in serra e collocati su bancali contenenti perlite.



Foto 3.1 Vassoi alveolati su bancali all'interno della serra in cui sono state seminate le piante delle diverse repliche.

## Materiali e metodi

Le sospensioni conidiche dei diversi ceppi di *Trichoderma* sono state ottenute da colonie di una settimana di età allevate su piastre Petri da 90 mm contenenti PDA, raschiandone leggermente la superficie con una spatola sterile monouso dopo l'aggiunta di 10 ml di acqua sterile. Le sospensioni così ottenute sono state filtrate con garza sterile e portate ad una concentrazione di  $10^6$  conidi  $\text{ml}^{-1}$  (previo conteggio di una frazione di ogni campione utilizzando una camera di Burcker).

L'inoculazione delle piante con i diversi isolati di *Trichoderma*, è stata eseguita a tre settimane dalla semina, iniettando, con una siringa, direttamente nel substrato 2 ml di sospensione conidica.



Foto 3.2 Vassoi alveolati contenenti le piantine subito dopo l'inoculazione con la sospensione conidica

Al momento del trapianto trascorsi 12 giorni dall'inoculo di *Trichoderma*, è stata posta particolare cura nel far coincidere la superficie del panetto di terreno in cui sono state fatte sviluppare le piantine con la superficie libera del substrato del vasetto. Questo per avere un riferimento valido per tutti i vasi al momento dei rilievi dell'altezza delle piante.

L'apporto di acqua necessario per la crescita delle piantine è stato fornito con subirrigazione, questo per evitare eventuali contaminazioni tra le diverse tesi dovute



## Materiali e metodi

alla percolazione. Per ogni replica sono stati contaminati 18 Kg di miscela di terreno per invasi con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 1 (n° collezione 4360) e 18 Kg con *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1-2 (n° collezione 4424). Per avere una contaminazione più omogenea i 18 Kg di terreno sono stati suddivisi in 3 aliquote da 6 Kg ciascuno: per ogni porzione di 6 Kg sono state utilizzate 2 piastre di PDA, contenenti colonie del patogeno di una settimana di età. Le piastre sono state incubate a luce bianca/ N.U.V con fotoperiodo 12h/12h ad una temperatura di 20°C. Le colonie del patogeno sono state potterizzate in mortaio con terreno (circa 3 cucchiaini ogni piastra) con l'aggiunta di 30 ml di acqua; successivamente il materiale potterizzato è stato mescolato con altro terreno in un becker da 1000 ml. Il contenuto del becker è stato unito ai 6 Kg di terreno contenuti in un sacchetto, aggiungendo l'acqua rimanente e mescolando energicamente. Per ottenere i 18 kg necessari per ogni replica l'operazione è stata ripetuta 3 volte. I sacchi sono stati svuotati in una bacinella e rimescolati. Per assicurare il tenore di umidità sufficiente e necessario al patogeno per la buona colonizzazione del terreno, sono stati aggiunti 320 ml di acqua della rete idrica per ogni aliquota di 6 kg di terreno. Il terreno inoculato è stato incubato in cella climatica a 24°C per sette giorni avendo cura di conservare le bacinelle in un sacco nero e rimescolando ogni 48 ore. I 56 vasetti di ogni replica, appartenenti alle diverse tesi, sono stati disposti ogni volta in due blocchi randomizzati da 28 vasetti ciascuno, differenziati in base all'ospite vegetale in essi contenuto. Ogni vasetto è stato fornito del proprio sottovaso per evitare che l'eventuale acqua di percolazione potesse causare contaminazioni.



Foto 3.3 Trapianto delle piante di pomodoro.



Foto 3.4 Trapianto delle piante di melone.

La prova avrebbe previsto che i vasetti venissero conservati in serra, ma all'interno di questa le piante iniziavano a manifestare sintomi di filatura. Per ovviare a

## Materiali e metodi

quest'inconveniente è stato deciso in data 3/06/05 di spostare tutto all'esterno, mantenendo però inalterate le posizioni reciproche dei vasetti e dei vassoi. Poiché le quattro repliche sono state allestite in tempi diversi si sono venute a creare quattro diverse condizioni di allevamento, differenziate tra loro dal tempo di permanenza in serra delle piantine dopo l'inoculazione del substrato di crescita con la sospensione conidica dei diversi ceppi di *Trichoderma* (Tabella 3.6).

Tabella 3.6 Date delle principali operazioni compiute per ogni replica e tempo di permanenza in serra dopo l'inoculazione

	Semina	Inoculo con sospensione conidica	Trapianto	Termine della replica	Tempo di permanenza in serra dopo l'inoculazione (gg)
1^ Replica	27/04/05	18/05/05	30/05/05	28/06/05	16
2^ Replica	4/05/05	25/05/05	6/06/05	5/07/05	9
3^ Replica	6/05/05	27/05/05	8/06/05	7/07/05	7
4^ Replica	11/05/05	1/06/05	13/06/05	12/07/05	2



Foto 3.5 Collocazione esterna delle piante di pomodoro della prova



Foto 3.6 Collocazione esterna delle piante di melone della prova

Sono stati effettuati dei rilievi delle temperature a diverse cadenze, nel seguente grafico sono illustrati i valori della temperatura massima e minima rilevati durante il periodo dell'intera prova e le date delle principali operazioni effettuate per ogni replica



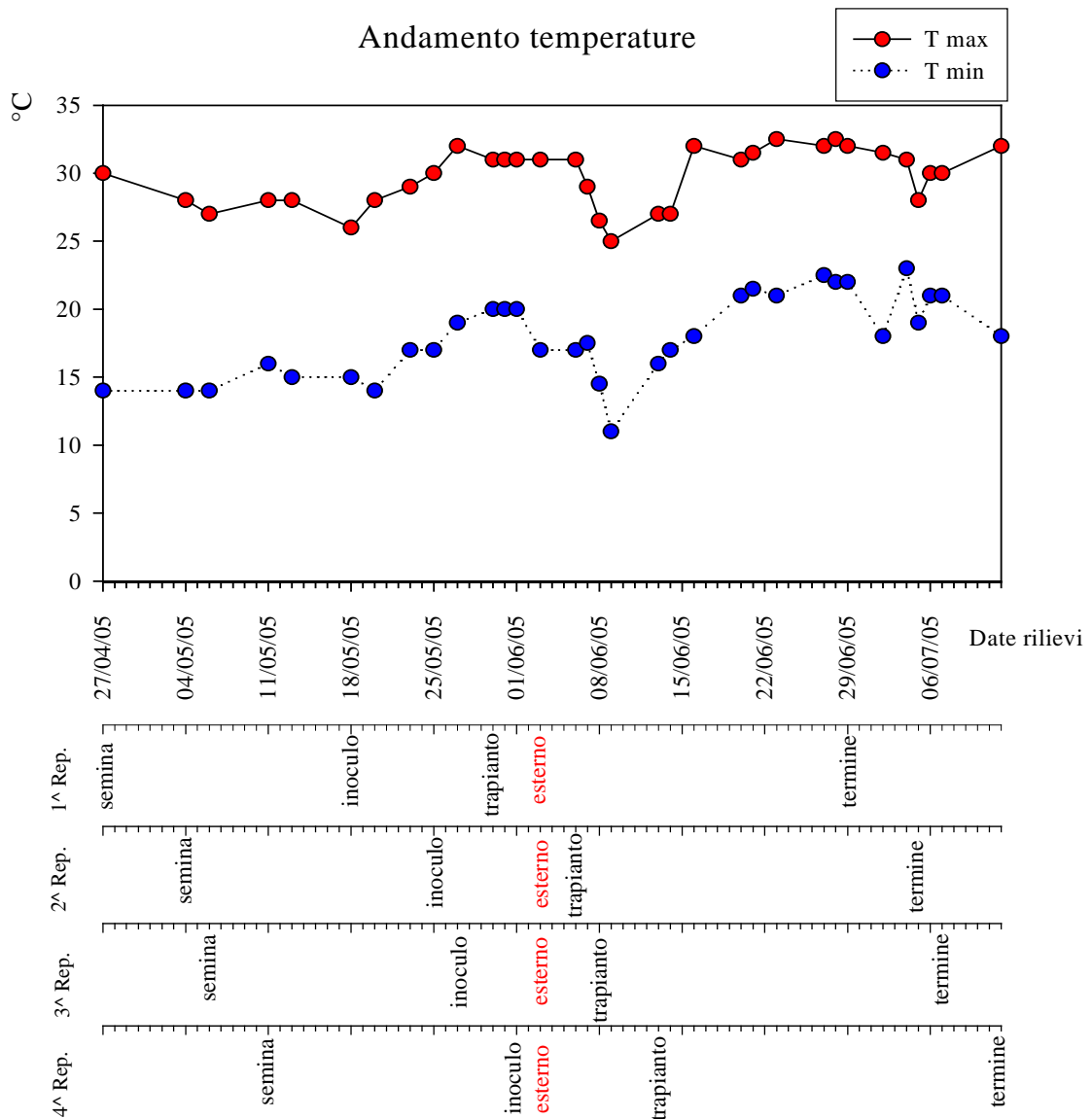


Figura 3.7 andamento delle temperature rilevate durante l'intera prova e date delle principali operazioni effettuate per ciascuna replica

### Valutazione dell'efficacia degli isolati di *Trichoderma spp.* nel controllo della malattia.

Al termine d'ogni replica, ovvero dopo 29 giorni dal trapianto in vaso, si è proceduto ad effettuare un rilievo degli eventuali sintomi di tracheofusariosi presentati dalle piante allevate nei vasetti con terreno artificialmente inoculato con le 2 *formae*

*speciales* di *Fusarium oxysporum*. Per verificare l'eventuale presenza del patogeno all'interno dei tessuti dell'ospite, sono stati prelevati campioni di fusto prossimi al colletto delle piante, che dopo essere stati sottoposti ad un trattamento di sterilizzazione esterna ed ad un risciacquo in acqua sterile, sono stati posti in piastre Petri contenenti Komada, terreno selettivo per *Fusarium* spp.

Il trattamento sterilizzante è stato effettuato immergendo le porzioni caulinari prelevate, in una soluzione di Ipoclorito di Sodio (all'1% di cloro attivo) in 50% di etanolo, per una durata di 5 minuti. Successivamente i campioni sono stati sottoposti a tre risciacqui in acqua sterile della durata di 2 minuti ciascuno. L'obbiettivo di questo trattamento è quello di eliminare eventuali contaminanti esterni presenti sulla superficie dei tessuti vegetali. Le piastre Petri da 90 mm contenenti substrato Komada in cui sono state inoculate le porzioni di fusto sterilizzate, sono state incubate a 20°C in condizioni di luce bianca/ N.U.V con fotoperiodo di 12 ore per due settimane, al termine delle quali è stato eseguito un rilievo delle colonie fungine eventualmente sviluppate.

### **Valutazione dell'efficacia degli isolati di *Trichoderma* spp nella promozione di crescita delle piante.**

Il secondo scopo di questa prova è stato la valutazione dell'attività di promozione della crescita, esercitata dagli isolati di *Trichoderma* spp. Le misurazioni sono state condotte su piante che dopo l'inoculazione sono state trapiantate in vasetti contenenti substrato non artificialmente contaminato. Per le piante di pomodoro sono stati rilevati l'altezza a cadenze settimanali e al termine della prova, il diametro del fusto ad un cm dal terreno. I diversi rilievi effettuati per misurare l'altezza sono stati utilizzati per calcolare i diversi accrescimenti ed un accrescimento totale ottenuto dalla differenza tra l'ultima misurazione e la prima misurazione. Le misurazioni dell'altezza e del diametro del fusto delle piante di melone sono state effettuate solo alla fine della prova. Inoltre, al termine di ogni singola replica, per entrambe le specie vegetali testate, è stato misurato il peso fresco e successivamente il peso secco dell'apparato epigeo e ipogeo delle tre piante allevate nel medesimo vasetto. Il peso secco è stato misurato ponendo le tre piante in un sacchetto di carta, che poi è stato

lasciato in stufa a 50°C (il periodo di permanenza in stufa dell'apparato radicale è stato di 6 giorni, quello dell'apparato epigeo di 8 giorni).

### **3.2.2 Prova di valutazione della competenza rizosferica e dell'endofitismo di isolati di *Trichoderma* spp.**

La rizosfera è definita come quella porzione di suolo, adesa alle radici di cui risente gli effetti e in cui avvengono importanti attività microbiche ( Hiltner 1904). La rizosfera è coinvolta in processi dinamici innescati dagli essudati radicali e dipendenti da fattori che riguardano l'ospite vegetale, da fattori edafici, condizioni ambientali, pratiche colturali e dalle interazioni tra i vari organismi del suolo (Bowen 1980).

La rizosfera competenza è l'abilità di un microrganismo, tra cui i funghi, di colonizzare e proliferare sopra e nelle vicinanze della superficie delle radici. La maggior parte dei funghi che vivono nella rizosfera possono crescere utilizzando come substrato i nutrienti rilasciati dalle radici. Tuttavia questi differiscono tra loro nella abilità a competere per queste fonti di nutrimento (Harman e Björkman 1998). All'interno di queste comunità fungine esiste una variabilità nella capacità di colonizzare le varie porzioni dell'apparato radicale tra cui le zone di attivo allungamento dell'apice, le zone di attivo assorbimento del capillizio radicale e le zone delle radici mature e ben suberificate. L'endofitismo è la capacità di un organismo di crescere e svilupparsi all'interno dei tessuti di un vegetale.

La prova di seguito descritta è stata eseguita per saggiare la rizosfera competenza e la capacità di sviluppo endofitico dei quattro isolati di *Trichoderma*, scelti sulla base dei risultati ottenuti nel precedente test di controllo biologico condotto su piante di pomodoro. Per ciascuno dei 4 isolati è stata preparata una sospensione conidica, con cui sono stati trattati semi di pomodoro , seminati in vassoi contenenti un substrato sterilizzato.

La prova è stata condotta al fine di rilevare la eventuale colonizzazione della rizosfera e l'eventuale presenza degli isolati all'interno dei tessuti delle piante.

### Trattamento dei semi

I quattro isolati di *Trichoderma* spp che sono stati oggetto di esame nella prova sono elencati nella tabella sottostante.

Genere	Specie	N° collezione	Matrice di provenienza
<i>Trichoderma</i>	<i>koningii</i>	2046	
<i>Trichoderma</i>	<i>erinaceum</i>	5234	Thailand, Coral island (Kohn Lann) Pattaya
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	6755	Colignola (Pisa, Italia)
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	6776	Colignola (Pisa, Italia)

Piastre di PDA contenenti colonie di una settimana di età di ognuno dei quattro ceppi, sono state utilizzate per preparare la sospensione conidica. Le piastre sono state raschiate delicatamente con una spatola monouso dopo aver aggiunto 10 ml di acqua sterile. Le sospensioni sono state contate e opportunamente aggiunte ad una soluzione di alginato di sodio in modo da ottenere una concentrazione finale di  $10^6$  Conidi  $\text{ml}^{-1}$  in una soluzione all'1% di alginato di sodio.

2 ml di alginato di sodio inoculato con la sospensione conidica sono stati usati per impellettare 6 g di seme di pomodoro. Altri 6 g di seme sono stati trattati con 2 ml di una soluzione di solo alginato di sodio all'1%, come controllo. Il trattamento è stato eseguito con l'impellettatrice Hege 11.

### Allestimento delle colture

Per questa prova sono state disposte 6 tesi:

- seme non trattato
- seme trattato con la soluzione di alginato di sodio all 1%
- seme trattato con alginato di sodio all' 1% inoculato con *Trichoderma koningii* 2046
- seme trattato con alginato di sodio all' 1% inoculato con *Trichoderma erinaceum* 5234
- seme trattato con alginato di sodio all' 1% inoculato con *Trichoderma harzianum* 6755

## Materiali e metodi

- seme trattato con alginato di sodio all' 1% inoculato con *Trichoderma harzianum* 6776

Sono state allestite 4 replicazioni spazialmente e temporalmente divise,utilizzando il disegno sperimentale a blocchi randomizzati.



Foto 3.8 Prova per la rizosfera competenza e l'endofitismo: vassoi contenenti le diverse repliche all'interno della cella climatica.

Per ogni tesi sono stati seminati 6 semi. La semina è stata effettuata in vassoi alveolati contenenti, come substrato, la miscela di terreno per invasi preparata a S.Piero, che è stata precedentemente setacciata e successivamente sterilizzata due volte, a distanza di 24, ore a 121°C per 60 minuti.

I vassoi sono stati collocati nelle cella climatica ad una temperatura di 24°C con illuminazione a luce bianca e fotoperiodo 12h/12h. Ogni vassoio è stato provvisto di sottovaso rettangolare. Le irrigazioni sono state effettuate immettendo l'acqua in questi ultimi, per evitare che l'acqua di percolazione potesse distribuire i conidi presenti sulla superficie del seme nella rizosfera, influenzando sulla effettiva capacità dei nostri ceppi di colonizzarla. Sono stati eseguiti tre rilievi, per valutare la germinazione e lo sviluppo delle plantule, a cadenze settimanale.

Dopo tre settimane dalla semina, per ogni replica, sono state condotte indagini volte ad isolare colonie degli isolati di *Trichoderma* spp dal terreno, costituente la rizosfera, e dai tessuti dell'apparato radicale delle piantine di pomodoro.

### **Rizosfera competenza ed endofitismo.**

Per avere una buona stima della rizosfera, ovvero prelevare un quantitativo di terreno adeguato ben aderente alle radici, si è interrotto l'irrigazione delle piante sei giorni prima del termine della prova, in modo da avere terreno in condizioni di tempera. Le piantine sono state estratte con l'intero panetto di terreno, successivamente sgretolato, prestando attenzione a non danneggiare l'apparato radicale che alla fine dell'operazione presentava le radici avvolte da un "manicotto" di particelle terrose.

Successivamente l'apparato radicale con le radici avvolte da questo leggero strato di terreno è stato posto in una piastra Petri di 90 mm di diametro contenente 10 ml di acqua sterile, avendo cura di distaccare il più possibile il terreno. In seguito, agitando leggermente la medesima piastra, si sono prelevati 100 µl di sospensione acquosa delle particelle terrose, che sono stati piastrati su P190 e incubati a 24 °C con luce bianca/N.U.V. con fotoperiodo 12h/12h.

Per valutare la capacità di sviluppo endofitico dei ceppi di *Trichoderma* spp. in esame, l'apparato radicale è stato sciacquato accuratamente con acqua della rete idrica, in modo da allontanare i residui terrosi. Successivamente le radici sono state divise in sei porzioni. I campioni di tessuto radicale così ottenuti, sono stati trattati, in una soluzione di sodio ipoclorito ( all'1% di cloro attivo) in 50% di etanolo. Le porzioni di radice sono state immerse in un becker contenente acqua sterile per circa 2 minuti. Questa operazione di risciacquo volta ad allontanare i residui della soluzione di sodio ipoclorito ed etanolo è stata ripetuta 3 volte.

Tutti i campioni sono stati piastrati su P190 e incubati 24°C con illuminazione luce bianca/NUV 12h/12h. Successivamente sono stati effettuati dei rilievi per valutare lo sviluppo delle colonie di *Trichoderma* eventualmente sviluppatesi.

### 3.2.3 Prova di antagonismo “*in vitro*” e micoparassitismo.

I quattro isolati di *Trichoderma* (*Trichoderma koningii* N°2046, *Trichoderma erinaceum* N°5234, *Trichoderma harzianum* N° 6755, *Trichoderma harzianum* N°6776) selezionati sulla base dei risultati ottenuti dalla prova di lotta biologica su piante di pomodoro e valutati per la rizosfera competenza e l’endofitismo, sono stati sottoposti ad un test *in vitro* volto ad indagare la capacità di inibire lo sviluppo di *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* , mediante l’allestimento di colture duali su substrato PDA, sulla base del lavoro di Gambogi e Durante (1985). I ceppi dei patogeni utilizzati per la prova sono elencati nella tabella sottostante.

Tabella 3.8 Isolati di *Fusarium oxysporum* utilizzati per la prova di antagonismo *in vitro* e micoparassitismo.

Specie		Forma specialis	Razza fisiologica	N° collezione
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R1	4427
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R1	4360
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R2	4288
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>lycopersici</i>	R2	4375
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R1	4427
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R1	4408
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R1-2	4424
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R0	4425
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R0	4426
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>melonis</i>	R2	4287

I ceppi dei patogeni e dei potenziali antagonisti sono stati allevati in piastre Petri del diametro di 90 mm, contenenti PDA. Dal bordo delle colonie in attivo accrescimento sviluppatasi, sono stati preparati dischetti con un foratappi del diametro di 6 mm con i quali sono state inoculate le piastre impiegate nella prova. I dischetti di micelio preparati dalle colonie di ciascuno degli isolati di *Trichoderma* e del ceppo patogeno, sono stati posti a 6 cm di distanza (Figura 3.9). A causa della minor velocità di accrescimento di *Fusarium oxysporum*, il dischetto del patogeno è stato inoculato 48 h prima di quello dell’antagonista. Le piastre sono state incubate alla temperatura di 24 °C, ed illuminazione luce bianca/ N.U.V. con fotoperiodo 12h/12h. Sono stati eseguiti rilievi sull’accrescimento radiale delle colonie dei patogeni ogni 24 ore. Le misurazioni sono state effettuate sui raggi delle colonie dei patogeni misurando le distanze di accrescimento laterali utilizzati come controllo (Rc1 e Rc2) e quella frontale alla colonia del potenziale antagonista (Rt).

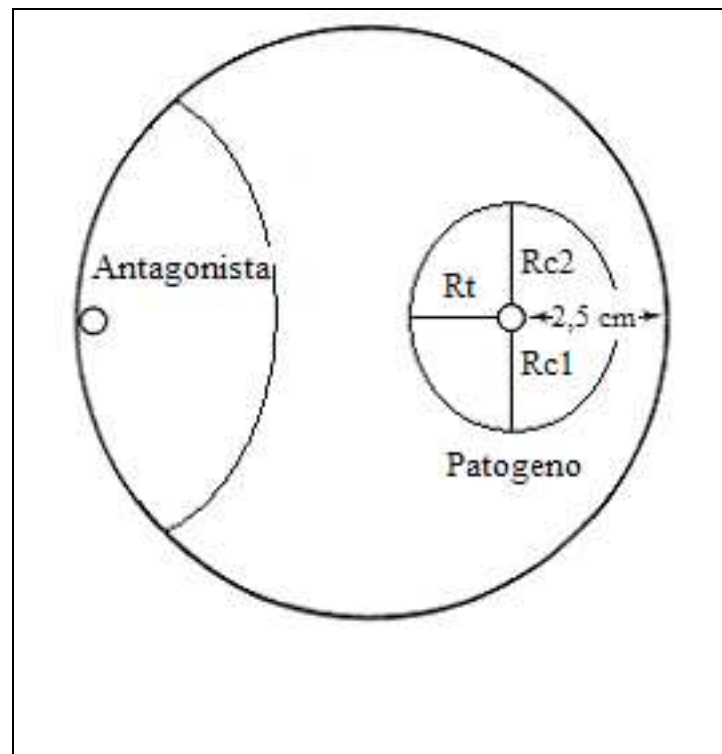


Figura 3.9 Schema delle distanze di inoculo utilizzate per la prova di antagonismo in vitro e delle misurazioni effettuate sulla colonia del patogeno.

### Produzione di coilings

Al fine di valutare le capacità micoparassitarie dei quattro ceppi di *Trichoderma* in esame ( *Trichoderma koningii* N°2046, *Trichoderma erinaceum* N°5234, *Trichoderma harzianum* N° 6755, *Trichoderma harzianum* N°6776 ), è stata allestita una ulteriore prova, volta a osservarne l'eventuale produzione di avvolgimenti ifali (noti come coilings) attorno alle ife dei due isolati di *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* utilizzati nella prova di controllo biologico. La prova è stata allestita sulla base del precedente lavoro di Gambogi e Durante (1985), su substrato WA, in piastre Petri (ø 10 cm). In ciascuna piastra, è stato steso un disco di cellophan (ø 9 cm) sterile (dischi autoclavati per 2 volte a 121 °C per 40 minuti in acqua). Dischetti di micelio di *Trichoderma* e di *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e f. sp. *melonis* ottenuti con un foratappi del diametro di 6 mm e prelevati dal bordo di colonie in attivo accrescimento su terreno PDA, sono stati posti ad una distanza di 5 cm l'uno dall'altro, dando al *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e f. sp. *melonis* un vantaggio di 48 ore. Le piastre sono



## Materiali e metodi

state incubate alla temperatura di 24 °C, e con illuminazione luce bianca/N.U.V. con fotoperiodo 12h /12h. Quando le colonie hanno raggiunto una dimensione tale da confluire, nella zona di contatto tra le due colonie, sono state asportate porzioni di cellophan (circa 3 cm per 1 cm), trasferite su un vetrino portaoggetto e montate a freddo con colorante Cotton blue (0,5%) aggiunto di Sudan III in eccesso ed osservate al microscopio composto. Presenza di coilings, di corte ramificazioni di *Trichoderma* verso *Fusarium* (lacci) e svuotamento delle ife del patogeno sono stati considerati come indizi di micoparassitismo.

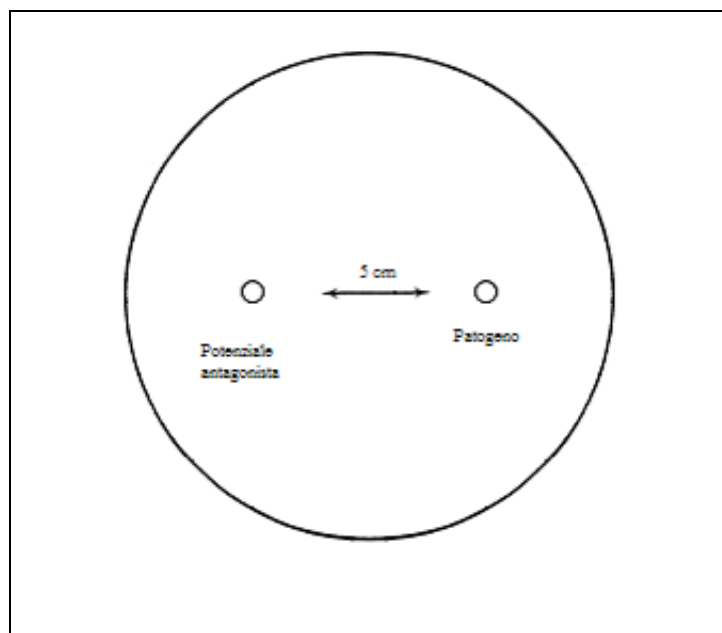


Figura 3.10 Schema illustrante le distanze di inoculo utilizzate per la prova volta all'osservazione dei coilings

### Cotton blue con Sudan III

Per la preparazione della soluzione base mischiare: acido lattico, glicerina e acqua (1:2:1). A 100 ml della soluzione base aggiungere Sudan III in eccesso e far bollire in matraccio. Lasciare raffreddare e filtrare la soluzione ottenuta con carta. Aggiungere Cotton blue (0,5%) ed agitare fino a soluzione completa.

### 3. 2.4 Analisi dei dati

Sui dati ottenuti dallo screening in vivo è stata eseguita l'analisi della varianza, a due vie e successivamente per quelle differenze che si sono attestate ad un livello di significatività inferiore al 5 % sono stati condotti i confronti *post hoc* secondo le procedure HSD di Tukey (*Honestly Significant Difference*, differenze onestamente significative) e LSD di Fisher (*Least Significant Difference* differenza minima significativa) L'analisi della varianza a due vie è stata condotta anche per i dati ottenuti dalla prova per la rizosfera competenza e l'endofitismo. I dati dei rilievi sulla germinazione e sulle successive fasi fenologiche effettuati sulle piante di questa prova sono stati trasformati in una scala ordinale e sottoposti ad una analisi della varianza per ranghi a 2 criteri di classificazione. Il software di analisi statistica che è stato utilizzato per tutte le prove è Systat 10 © della SPSS Inc.

Dalle misurazioni effettuate per la prova di antagonismo in vitro, sono stati calcolati gli accrescimenti della colonia del patogeno nella direzione laterale di controllo e nella direzione del fronte della colonia del potenziale antagonista. i dati così elaborati sono stati sottoposti ad analisi della varianza volta ad individuare le differenze significative tra i due raggi inoltre sono stati elaborati dei grafici con il programma SigmaPlot9 © della SPSS Inc.

## 4 Risultati

### **4.1 Test in vivo di controllo delle tracheofusariosi di pomodoro e melone e di promozione di crescita delle piante**

#### **4.1.1 La prova di controllo biologico.**

Al fine di individuare isolati di *Trichoderma* spp. in grado di contenere le tracheofusariosi del melone e del pomodoro è stata allestita la prova descritta nel paragrafo 3.2.1. Al termine di ciascuna prova (ciascuna corrispondente ad una replica) è stato eseguito un rilievo dei sintomi manifestati dalle piante per quelle tesi che prevedevano la presenza del patogeno. Successivamente, campioni di tessuto caulinare dei diversi ospiti vegetali delle succitate tesi sono stati sterilizzati e inoculati in piastre Petri contenenti substrato Komada (selettivo per *Fusarium*) e quindi incubate. Dopo due settimane, è stato eseguito un rilievo per verificare la presenza delle colonie del patogeno eventualmente sviluppate dalle porzioni di tessuto vegetale. Questo ci ha permesso di calcolare, per ogni replica e per ogni tesi, la percentuale di infezione.

#### **Pomodoro**

Per quanto riguarda il pomodoro in tutti i vasetti delle diverse tesi non si sono notati evidenti sintomi esterni sull'ospite. Dai rilievi condotti sulle piastre Petri contenenti Komada e inoculate con le porzioni caulinari delle piante, sono state calcolate le percentuali di infezione di ogni tesi che sono state poi sottoposte ad analisi statistica. Nella tabella 4.1 sono indicati i sintomi riscontrati sulle piante delle diverse tesi e l'esito dei rilievi condotti sulle piastre, si può notare che l'assenza dei sintomi non corrisponde ad un'assenza di infezione.

## Risultati

Tabella 4.1 Piante di pomodoro inoculate con una sospensione conidica di *Trichoderma* spp e trapiantate in terreno contaminato artificialmente con Fol. Nelle colonne sono indicate le tipologie dei sintomi e i risultati della inoculazione di porzioni di tessuto caulinare su piastre con komada ( substrato selettivo per Fox)

tesi	Pianta	1^ Replica		2^ Replica		3^ Replica		4^ Replica	
		sintomi	Risultato komada	sintomi	Risultato komada	sintomi	Risultato komada	sintomi	Risultato komada
Controllo	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 3	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Trichoderma</i> sp. 372	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 3	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Trichoderma virens</i> 1058 (I10)	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	-	-	+	-	-	-	+
	Pianta 3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	Pianta 1	-	+	-	-	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	-	-	-	-	-
	Pianta 3	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	-	-	-	-	-	-	+
	Pianta 3	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	-	-	+
	Pianta 3	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 3	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 3	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	Pianta 1	-	-	-	+	-	-	-	+
	Pianta 2	-	-	-	+	-	-	-	+
	Pianta 3	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	Pianta 1	-	+	-	-	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	-	-	-	-	+
	Pianta 3	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Trichoderma</i> sp. 6421	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 3	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	Pianta 1	-	+	-	+	-	-	-	+
	Pianta 2	-	-	-	+	-	-	-	-
	Pianta 3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	Pianta 1	-	+	-	-	-	+	-	+
	Pianta 2	-	+	-	-	-	+	-	+
	Pianta 3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma viride</i> 8209	Pianta 1	-	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 2	-	-	-	+	-	-	-	+
	Pianta 3	-	-	-	+	-	-	-	+

### Legenda

- nessun sintomo esterno o assenza di colonie del patogeno sulle piastre di komada
- + presenza di colonie del patogeno sulle piastre di komada
- A ingiallimento fogliare
- B striature brunastre sul fusto
- C avvizzimento
- D nanismo

Per effettuare l'analisi della varianza i dati sono stati convertiti secondo la trasformazione angolare (o in gradi), applicando la funzione:

$$f_x = \text{Arcsen} \sqrt{\frac{P}{100}}$$

dove P indica la percentuale di infezione che divisa per 100 da la proporzione dei valori da 0 a 1.

E' stata condotta un'analisi della varianza a due vie, prendendo in considerazione le 4 repliche e le 14 tesi. I risultati sono indicati nella tabella 4.2.

Tabella 4.2 Analisi della varianza a 2 vie sui valori della percentuale di piante di pomodoro infette sottoposti a trasformazione angolare (P= 0,05)

Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
BLOCCHI	1,264	3	0,421	2,152	0,109
TESI	6,208	13	0,478	2,439	0,016
Error	7,634	39	0,196		

I valori medi relativi alle diverse tesi mostrano una differenza altamente significativa (P = 0,016). Per avere una visione più specifica sono stati effettuati dei confronti multipli (HSD di Tukey e LSD di Fisher) usando tutte le combinazioni, in modo da evidenziare eventuali differenze alla base della significatività generale. I risultati ottenuti dai confronti *post hoc* sono mostrati in tabella 4.3, dove, per ogni colonna sono indicati il tipo di test utilizzato e il livello di significatività e dove a ogni lettera uguale corrispondono tesi le cui medie non differiscono significativamente.

Tabella 4.3 risultati dei confronti *post hoc* a diversi livelli di significatività

Tesi	Media Arcsen √% p.infette	Media % p. infette	Tukey HSD P=0,1	Tukey HSD P=0,05	Fisher LSD P=0,05	Fisher LSD P=0,01
Controllo	1,571	100	A	A	A	A
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	1,571	100	A	A	A	A
<i>Trichoderma</i> sp 6421	1,417	97,7	AB	A	AB	AB
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	1,263	90,8	AB	A	ABC	ABC
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	1,178	85,3	AB	A	ABCD	ABC
<i>Trichoderma</i> sp 372	1,108	80,1	AB	A	ABCD	ABC
<i>Trichoderma viride</i> 8209	1,093	78,9	AB	A	ABCD	ABC
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	0,855	56,9	AB	A	BCD	ABC
<i>Trichoderma virens</i> 1058	0,786	50,1	AB	A	BCD	ABC
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	0,786	50,1	AB	A	BCD	ABC
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	0,717	43,2	AB	A	CD	BC
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	0,701	41,6	AB	A	CD	BC
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	0,632	34,9	AB	A	CD	BC
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	0,547	27,1	B	A	D	C

Dai confronti multilpli utilizzando Tukey HSD, procedimendo più conservativo, solo la tesi *Trichoderma harzianumi* isolato 6755 è apparsa diversa dal controllo, con una significatività  $P=0,1$ , mentre per  $P=0,05$  le medie delle varie tesi non mostrano differenze statisticamente significative.

Utilizzandi il Fischer LSD per i confronti multipli , procedimento meno conservativo, sette tesi hanno mostrato differenze significative con il controllo ( $P=0,05$ ), mentre per  $P=0,01$  solo, *Trichoderma harzianum* isolato 6776, *Trichoderma koningii* isolato 2046, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 e *Trichoderma harzianum* isolato 6755 hanno differenze significative con il controllo.

### Melone

Le piante di melone delle tesi che prevedevano il trapianto in terreno artificialmente contaminato con il patogeno hanno manifestato sintomi vari riconducibili a:

- Imbrunimenti del fusto
- Ingiallimenti fogliari
- Avvizzimento
- Nanismo

Alcuni di questi sintomi sono illustrati nelle seguenti foto (da 4.1 a 4.4)



Foto 4.1. Avvizzimento di una pianta di melone non trattata e piantata in terreno contaminato con *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Razza 1-2 isolato 4424, si può notare l'imbrunimento del fusto.



Foto 4.2. Imbrunimento del fusto di una pianta di melone trattata con una sospensione conidica di *Trichoderma fasciculatum* isolato 4876 e piantata in terreno contaminato con *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* Razza 1-2 isolato 4424



Foto 4.3 Nanismo di una pianta di melone trattata con una sospensione conidica di *Trichoderma viride* isolato 8209 e piantata in terreno contaminato con *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* Razza 1-2 isolato 4424





Foto 4.4 Completo avvizzimento di una pianta di melone trattata con una sospensione conidica di *Trichoderma asperellum* isolato 4207 e piantata in terreno contaminato con *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* Razza 1-2 isolato 4424

Nella tabella 4.4 sono indicati i sintomi riscontrati sulle piante delle diverse tesi e l'esito dei rilievi condotti sulle piastre, si può notare che la maggior parte delle piante che presentavano sintomi erano infette.

## Risultati

Tabella 4.4 Piante di melone inoculate con una sospensione conidica di *Trichoderma* spp e trapiantate in terreno contaminato artificialmente con Fom. Nelle colonne sono indicate le tipologie dei sintomi e i risultati della inoculazione di porzioni di tessuto caulinare su piastre con komada ( substrato selettivo per Fox)

tesi	Pianta	1^ Replica		2^ Replica		3^ Replica		4^ Replica	
		sintomi	Risultato komada	sintomi	Risultato komada	sintomi	Risultato komada	sintomi	Risultato komada
Controllo	Pianta 1	A	+	AB	+	-	+	AB	+
	Pianta 2	B	+	AB	+	-	+	AB	+
	Pianta 3	-	+	AD	+	-	+	AB	+
<i>Trichoderma</i> sp. 372	Pianta 1	A	-	-	+	D	+	BD	+
	Pianta 2	B	+	-	+	-	+	AD	+
	Pianta 3	B	+	-	+	-	+	-	+
<i>Trichoderma virens</i> 1058 (I10)	Pianta 1	A	+	C	+	A	+	-	+
	Pianta 2	C	+	D	+	A	+	-	+
	Pianta 3	AB	+	-	-	A	+	-	+
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	Pianta 1	C	+	AB	+	-	+	BD	+
	Pianta 2	C	+	AB	+	-	+	-	+
	Pianta 3	C	+	-	+	-	-	-	+
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	Pianta 1	C	+	C	+	-	+	BD	+
	Pianta 2	C	+	C	+	-	+	BD	+
	Pianta 3	C	+	BD	+	A	+	-	+
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	Pianta 1	C	+	-	+	AB	+	-	+
	Pianta 2	-	-	-	+	-	+	-	+
	Pianta 3	AB	+	B	+	-	+	C	+
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	Pianta 1	C	+	C	+	AD	+	BD	+
	Pianta 2	-	-	C	+	A	+	BD	+
	Pianta 3	-	-	C	+	A	+	C	+
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	Pianta 1	C	+	-	+	AB	+	BD	+
	Pianta 2	C	+	-	+	-	+	-	+
	Pianta 3	C	+	-	+	-	+	-	+
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	Pianta 1	-	+	-	+	B	+	AB	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	+	AB	+
	Pianta 3	-	+	C	+	-	+	AB	+
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	Pianta 1	D	+	BD	+	-	+	-	+
	Pianta 2	C	+	B	+	-	+	AD	+
	Pianta 3	-	-	B	+	-	+	D	+
<i>Trichoderma</i> sp. 6421	Pianta 1	C	+	-	+	AD	+	AD	+
	Pianta 2	-	+	-	+	-	+	AD	+
	Pianta 3	B	+	-	-	-	+	AD	+
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	Pianta 1	C	+	A	+	C	+	BD	+
	Pianta 2	C	+	A	+	AB	+	BD	+
	Pianta 3	C	+	A	+	-	+	C	+
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	Pianta 1	C	+	AB	+	C	+	B	+
	Pianta 2	C	+	AB	+	AB	+	-	+
	Pianta 3	-	-	AB	+	A	+	-	+
<i>Trichoderma viride</i> 8209	Pianta 1	A	+	C	+	D	+	BD	+
	Pianta 2	C	+	B	+	D	+	-	+
	Pianta 3	B	+	-	+	-	+	-	+

### Legenda

- nessun sintomo esterno o assenza di colonie del patogeno sulle piastre di komada
- + presenza di colonie del patogeno sulle piastre di komada
- A ingiallimento fogliare
- B striature brunastre sul fusto
- C avvizzimento
- D nanismo

Dai rilievi effettuati sulle porzioni caulinari in capsule Petri , contenenti substrato komada , sono state calcolate le percentuali medie di infezione delle diverse tesi, che sono indicate nella tabella 4.5

Tabella 4.5 percentuale media di infezione delle differenti tesi su piante di melone

Tesi	Media Arcsen $\sqrt{\text{proporzione}}$	Media % piante infette
Controllo	1,5707963	100
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	1,5707963	100
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	1,5707963	100
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	1,5707963	100
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	1,5707963	100
<i>Trichoderma viride</i> 8209	1,5707963	100
<i>Trichoderma</i> sp. 372	1,2780139	91,67
<i>Trichoderma virens</i> 1058	1,2780139	91,67
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	1,2780139	91,67
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	1,2780139	91,67
<i>Trichoderma</i> sp. 6421	1,2780139	91,67
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	1,2780139	91,67
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	1,2643609	91,67
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	1,1503514	83,34

Per effettuare l'analisi della varianza i dati sono stati convertiti secondo la trasformazione angolare (o in gradi), applicando la funzione:

$$f_x = \text{Arcsen} \sqrt{\frac{P}{100}}$$

dove P indica la percentuale di infezione, che divisa per 100 da la proporzione di infezione che va da 0 a 1, sui dati ottenuti dalle 4 repliche delle 14 tesi è stata condotta l'analisi della varianza a due vie i cui risultati sono indicati nella tabella 4.6

Tabella 4.6 Analisi della varianza a due vie sui valori di percentuale di piante infette sottoposti a trasformazione angolare P=0,05

Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
BLOCCHI	0,487	3	0,162	3	0,054
TESI	0,558	13	0,043	0,734	0,72
Error	2	39	0,058		

Poichè l'analisi della varianza ha indicato che non ci sono differenze significative tra le tesi, ( $P=0,72$ ) non è apparso opportuno eseguire i confronti multipli *post hoc*. Sono comunque riportati in tabella 4.3 i valori medi della percentuale di infezione (e relativa trasformazione angolare ) per ciascuna tesi.

### 4.1.2 Promozione di crescita

In questo test è stata eseguita una valutazione dell'attività di promozione di crescita degli isolati di *Trichoderma* in esame. Le piantine delle due specie vegetali utilizzate sono state sottoposte ad inoculazione con sospensione conidica di ognuno degli isolati e successivamente sono state trapiantate in vasetti contenenti una miscela di torba e terreno naturale, come descritto nel paragrafo 3.2.1.

## Pomodoro

Per il pomodoro, sono stati eseguiti con misurazioni distinte per ognuna delle tre piante presenti nei vasetti per ciascuna tesi, 5 rilievi relativi all'altezza con cadenze settimanali e un rilievo finale relativo al diametro del fusto all'altezza del colletto. Inoltre, alla fine di ogni prova (ad ogni prova corrisponde una replica) si è proceduto ad effettuare rilievi del peso fresco e del peso secco dell'apparato epigeo e dell'apparato ipogeo di tre piante per ogni singolo vasetto. I valori ottenuti sono stati divisi per il numero di piante per ottenere il peso medio di ciascuna pianta. I dati ottenuti per i 5 rilievi effettuati sull'altezza sono stati utilizzati per ricavare i valori di accrescimento di ciascuna pianta per i quattro intervalli di tempo e un accrescimento totale . I risultati dell'analisi della varianza sono illustrati nelle tabelle comprese da 4.7 a 4.16

Tabella 4.7 Analisi della varianza a due vie dei valori relativi al 1° accrescimento

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
1° Accrescimento	BLOCCHI	1404,75	3	468,25	44,027	0
	TESI	601,564	13	46,274	4,351	0
	Errore	1584,693	149	10,636		

Tabella 4.8 Analisi della varianza a due vie dei valori relativi al 2° accrescimento

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
2° Accrescimento	BLOCCHI	2565,506	3	855,169	33,481	0
	TESI	475,844	13	36,603	1,433	0,15
	Errore	3805,763	149	25,542		

Tabella 4.9 Analisi della varianza a due vie dei valori relativi al 3° accrescimento

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
3° Accrescimento	BLOCCHI	751,051	3	250,35	11,941	0
	TESI	322,427	13	24,802	1,183	0,297
	Errore	3123,919	149	20,966		

Tabella 4.10 Analisi della varianza a due vie dei valori relativi al 4° accrescimento

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
4° Accrescimento	BLOCCHI	59,044	3	19,681	0,986	0,401
	TESI	372,762	13	28,674	1,437	0,149
	Errore	2972,985	149	19,953		

Tabella 4.11 Analisi della varianza a due vie dei valori relativi all'accrescimento totale

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Accrescimento totale	BLOCCHI	1845,37	3	615,123	3,422	0,019
	TESI	4923,249	13	378,711	2,107	0,017
	Errore	26782,969	149	179,751		

Tabella 4.12 Analisi della varianza a due vie dei valori del diametro del fusto

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Diametro finale	BLOCCHI	13,857	3	4,619	19,802	0
	TESI	6,114	13	0,47	2,016	0,023
	Errore	34,754	149	0,233		

Tabella 4.13 Analisi della varianza a due vie dei valori di peso fresco dell'apparato epigeo

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Peso fresco dell'apparato epigeo	BLOCCHI	326,528	3	108,843	3,594	0,022
	TESI	434,178	13	33,398	1,103	0,385
	Errore	1181,022	39	30,283		

Tabella 4.14 Analisi della varianza a due vie dei valori di peso fresco dell'apparato ipogeo

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Peso fresco dell'apparato ipogeo	BLOCCHI	27,621	3	9,207	8,452	0
	TESI	21,843	13	1,68	1,542	0,146
	Errore	42,483	39	1,089		

Tabella 4.15 Analisi della varianza a due vie dei valori del peso secco dell'apparato epigeo

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Peso secco dell'apparato epigeo	BLOCCHI	2,657	3	0,886	1,392	0,26
	TESI	11,845	13	0,911	1,432	0,189
	Errore	24,822	39	0,636		

Tabella 4.16 Analisi della varianza a due vie dei valori del peso secco dell'apparato ipogeo

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Peso secco dell'apparato ipogeo	BLOCCHI	0,024	3	0,008	1,168	0,334
	TESI	0,19	13	0,015	2,109	0,036
	Errore	0,27	39	0,007		

Dai valori di P si evince che le medie delle diverse tesi sono differenti ( $P < 0,05$ ): per il 1° accrescimento e totale, per il diametro finale e per il peso secco dell'apparato ipogeo. I confronti multipli HSD di Tukey e LSD di Fisher, sono stati condotti per quelle misurazioni che hanno dato delle differenze tra le medie con una significatività inferiore allo 0,05. I risultati ottenuti dai confronti *post hoc* sono illustrati nelle tabelle numerate da 4.17 a 4.20, dove, per ogni colonna sono indicati il tipo di test e il livello di significatività utilizzato e dove a ogni lettera diversa corrispondono le tesi le cui medie differiscono significativamente.

Tabella 4.17 risultato dei confronti *post hoc* dei valori relativi al 1° accrescimento.

Tesi	Media 1° accrescimento cm	Tukey HSD P=0,1	Tukey HSD P=0,05	Fisher LSD P=0,05	Fisher LSD P=0,01
<i>Trichoderma virens</i> 1058	6,042	A	A	A	A
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	6,375	A	A	AB	AB
controllo	6,417	A	A	AB	AB
<i>Trichoderma sp</i> 372	8,458	AB	AB	ABCD	ABC
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	8,833	AB	AB	BCD	ABC
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	9,25	AB	AB	CDE	ABC
<i>Trichoderma sp.</i> 6421	9,292	AB	AB	CDE	ABC
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	9,562	AB	AB	CDE	ABCD
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	9,583	AB	AB	CDE	BCD
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	9,75	AB	AB	CDE	BCD
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	9,75	AB	AB	CDE	BCD
<i>Trichoderma viride</i> 8209	11,125	B	B	DEF	CD
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	11,625	B	B	EF	D
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	13,008	B	B	F	D

Dai confronti multipli ottenuti con Tukey HSD si evidenzia che tre tesi, *Trichoderma viride* isolato 8209, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 e *Trichoderma asperellum* isolato 4207 differiscono dal controllo per un livello di significatività  $P=0,05$ . Con il procedimento dei confronti multipli Fischer LSD si evidenzia che nove tesi differiscono dal controllo per un livello di significatività inferiore a  $P=0,05$  e che tre tesi, *Trichoderma viride* isolato 8209, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 e *Trichoderma asperellum* isolato 4207 differiscono dal controllo per un livello di significatività inferiore a  $P=0,01$

Tabella 4.18 risultato dei confronti *post hoc* dei valori di accrescimento totale.

Tesi	Media accrescimento totale cm	Tukey HSD $P=0,1$	Tukey HSD $P=0,05$	Fisher LSD $P=0,05$	Fisher LSD $P=0,01$
<i>Trichoderma virens</i> 1058	40,708	A	A	A	A
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	42,25	AB	A	AB	AB
controllo	42,792	AB	A	ABC	AB
<i>Trichoderma sp.</i> 372	47,417	AB	A	ABCD	ABC
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	49,042	AB	A	ABCDE	ABC
<i>Trichoderma sp.</i> 6421	49,375	AB	A	ABCDE	ABC
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	50,083	AB	A	ABCDE	ABC
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	50,792	AB	A	ABCDE	ABC
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	53,083	AB	A	BCDE	ABC
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	53,763	AB	A	CDE	ABC
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	54,083	AB	A	DE	ABC
<i>Trichoderma viride</i> 8209	56,625	AB	A	DE	BC
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	56,869	AB	A	DE	BC
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	58,875	B	A	E	C

Con il procedimento dei confronti multipli Tukey HSD si evidenzia che nessuna tesi differisce significativamente dal controllo. Con la metodologia Fisher LSD ci sono 4 tesi, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234, *Trichoderma viride* isolato 8209, *Trichoderma asperellum* isolato 4207 e *Trichoderma asperellum* isolato 4603 che differiscono dal controllo per un livello di significatività inferiore al 5% , di questi l'ultimo, *Trichoderma asperellum* isolato 4603, differisce dal controllo per un livello di significatività inferiore all' 1%.

Tabella 4.19 risultato dei confronti *post hoc* dei valori del diametro finale.

Tesi	Media diametro finale mm	Tukey HSD P=0,1	Tukey HSD P=0,05	Fisher LSD P=0,05	Fisher LSD P=0,01
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	3,442	A	A	A	A
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	3,525	A	A	AB	AB
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	3,583	A	A	ABC	AB
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	3,583	A	A	ABC	AB
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	3,592	A	A	ABC	AB
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	3,612	A	A	ABC	AB
<i>Trichoderma viride</i> 8209	3,642	A	A	ABCD	AB
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	3,783	A	A	ABCDE	AB
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	3,842	A	A	BCDE	AB
<i>Trichoderma sp.</i> 6421	3,875	A	A	BCDE	AB
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	3,92	A	A	BCDE	AB
<i>Trichoderma sp.</i> 372	3,967	A	A	CDE	B
controllo	4,025	A	A	DE	B
<i>Trichoderma virens</i> 1058	4,033	A	A	E	B

Con il procedimento dei confronti multipli Tukey HSD si evidenzia che nessuna tesi differisce significativamente dal controllo ( che insieme alla tesi *Trichoderma virens* isolato 1058 hanno raggiunto i valori maggiori ) . Con la metodologia Fisher LSD sei tesi risultano essere statisticamente inferiori al controllo con una significatività P=0,05 e una di queste, *Trichoderma fasciculatum* isolato 4876 risulta essere inferiore al controllo per una significatività inferiore a P= 0,01

Tabella 4.20 risultato dei confronti *post hoc* dei valori relativi al peso secco dell'apparato ipogeo.

Tesi	Media peso secco apparato ipogeo g	Tukey HSD P=0,1	Tukey HSD P=0,05	Fisher LSD P=0,05	Fisher LSD P=0,01
<i>Trichoderma minutisporum</i> 4839	0,121	A	A	A	A
<i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	0,134	A	A	AB	A
<i>Trichoderma viride</i> 8209	0,137	A	A	ABC	A
<i>Trichoderma fasciculatum</i> 4876	0,167	A	A	ABC	AB
<i>Trichoderma asperellum</i> 4603	0,187	A	A	ABCD	AB
<i>Trichoderma harzianum</i> 6776	0,192	A	A	ABCD	AB
<i>Trichoderma asperellum</i> 4207	0,215	A	A	ABCDE	AB
<i>Trichoderma harzianum</i> 6755	0,238	A	A	ABCDE	AB
<i>Trichoderma koningii</i> 2046	0,24	A	A	ABCDE	AB
<i>Trichoderma sp.</i> 372	0,24	A	A	ABCDE	AB
<i>Trichoderma sp.</i> 6421	0,249	A	A	BCDE	AB
<i>Trichoderma harzianum</i> 5871	0,255	A	A	CDE	AB
<i>Trichoderma virens</i> 1058	0,306	A	A	DE	B
controllo	0,313	A	A	E	B



Con il procedimento dei confronti multipli Tukey HSD si evidenzia che nessuna tesi differisce significativamente dal controllo ( che ha fatto registrare i valori medi più maggiori ). Con la metodologia Fisher LSD sei tesi risultano essere inferiori al controllo con una significatività inferiore a  $P=0,05$  e tre di queste, *Trichoderma minutisporum* isolato 4839, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 e *Trichoderma viride* isolato 8209 risultano essere inferiori al controllo per una significatività inferiore a  $P=0,01$

### Melone

Per il melone, è stato eseguito per ciascuna delle tre piante presenti nei vasetti di ciascuna tesi, un rilievo finale dell'altezza e un rilievo finale del diametro del fusto all'altezza del colletto. Inoltre, alla fine di ogni singola prova (corrispondente ad una replica) si è proceduto a rilevare complessivamente il peso fresco e il peso secco complessivo dell'apparato epigeo e dell'apparato ipogeo delle tre piante di ogni singolo vasetto. I valori ottenuti sono stati divisi per il numero di piantine per ottenere il peso medio di ciascuna pianta.

I risultati dell'analisi della varianza sono illustrati nelle tabelle da 4.21 a 4.26

Tabella 4.21 risultati analisi dell'analisi della varianza a due vie dei valori dell'altezza finale

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Altezza finale	BLOCCHI	6518,171	3	2172,724	7,456	0
	TESI	6753,009	13	519,462	1,783	0,051
	Errore	41088,384	141	291,407		

Tabella 4.22 risultati analisi dell'analisi della varianza a due vie dei valori del diametro finale

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Diametro finale	BLOCCHI	5,749	3	1,916	9,383	0
	TESI	3,949	13	0,304	1,488	0,129
	Errore	28,796	141	0,204		

Tabella 4.23 risultati analisi dell'analisi della varianza a due vie dei valori del peso fresco apparato epigeo

	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
Peso fresco dell'apparato epigeo	BLOCCHI	43459,175	3	14486,392	117,157	0
	TESI	2385,483	13	183,499	1,484	0,167
	Errore	4822,34	39	123,65		

Tabella 4.24 risultati analisi dell'analisi della varianza a due vie Peso fresco apparato ipogeo

Peso fresco dell'apparato ipogeo	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
	BLOCCHI	11,683	3	3,894	7,687	0
	TESI	6,478	13	0,498	0,984	0,484
	Errore	19,758	39	0,507		

Tabella 4.25 risultati analisi dell'analisi della varianza a due vie dei valori del peso secco apparato epigeo

Peso secco dell'apparato epigeo	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
	BLOCCHI	20,281	3	6,76	12,275	0
	TESI	11,101	13	0,854	1,551	0,143
	Errore	21,479	39	0,551		

Tabella 4.26 risultati analisi dell'analisi della varianza a due vie dei valori del peso secco apparato ipogeo

Peso secco dell'apparato ipogeo	Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
	BLOCCHI	0,019	3	0,006	1,587	0,208
	TESI	0,062	13	0,005	1,227	0,298
	Errore	0,152	39	0,004		

Per nessun parametro si riscontrano differenze tra le medie delle diverse tesi  $P < 0,05$  quindi non si è proceduto al confronto multiplo *post hoc*

## 4.2 Prova di valutazione della competenza rizosferica e dell'endofitismo di isolati di *Trichoderma* spp. su piante di pomodoro.

Per la prova di valutazione della rizosfera competenza e dell'endofitismo sono stati utilizzati gli isolati *Trichoderma harzianum* isolato 6776, *Trichoderma koningii* isolato 2046, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 e *Trichoderma harzianum* isolato 6755, ovvero quelli per i quali si sono state ottenute le percentuali di infezione più basse da parte del patogeno nella precedente prova di controllo biologico (paragrafo 4.1.)

### Effetto del trattamento

In primo luogo si è cercato di verificare quantomeno la presenza dei propaguli sulla superficie dei semi sottoposti all'impelettamento con le soluzioni di alginato inoculate con le sospensioni conidiche dei diversi isolati di *Trichoderma* spp. 10 semi sono stati

inoculati in piastre Petri da 90 mm con P190 e incubati a 24°C a luce bianca/N.U.V. con fotoperiodo di 12 ore, dal rilievo eseguito dopo 4 giorni e risultato che da tutti i semi delle differenti tesi in esame si erano sviluppate colonie.

Nelle foto da 4.5 a 4.8 sono mostrati semi di pomodoro, trattati con alginato di sodio inoculato con conidi di *Trichoderma* e incubati per 4 giorni in capsule Petri contenenti P190.

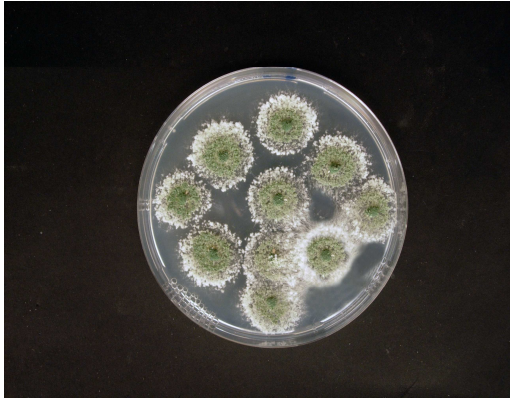


Foto 4.5 Semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma harzianum* isolato 6776

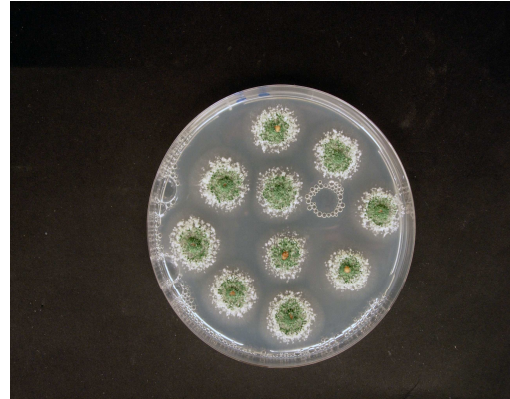


Foto 4.6 Semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma koningii* isolato 2046

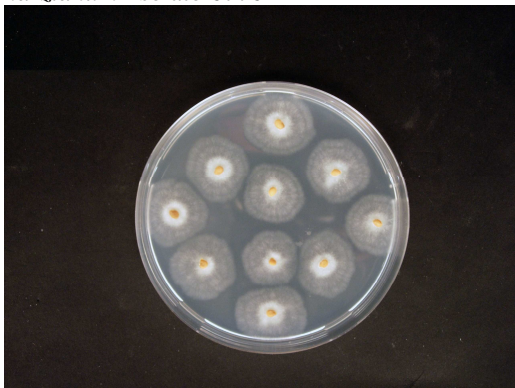


Foto 4.7 Semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma harzianum* isolato 6755

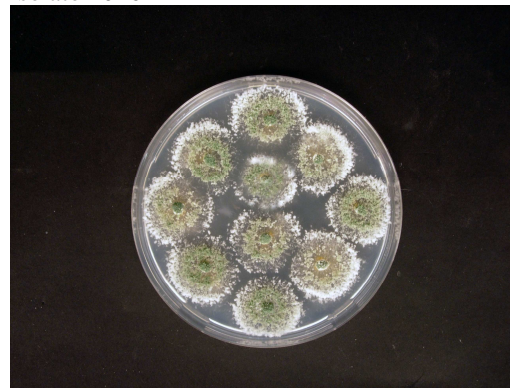


Foto 4.8 Semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma erinaceum* isolato 5234

La germinazione dei semi trattati è stata valutata ponendo 25 semi di ogni tesi in piastre Petri da 90 mm contenenti tre dischi di carta da filtro e 3 ml di acqua sterile. Sono stati eseguiti diversi rilievi e i risultati sono indicati nella tabella sottostante (4.27), mentre in tabella 4.28 sono indicate le percentuali di germinazione.

Tabella 4.27 Rilievi di germinazione di semi di pomodoro trattati con alginato di sodio inoculato con conidi di *Trichoderma* spp. effettuati dopo 5,6,7,9,12 giorni

Tesi	Rilievo dopo 5gg	Rilievo dopo 6 gg	Rilievo dopo 7 gg	Rilievo dopo 9 gg	Rilievo dopo 12 gg
Seme naturale	12 germinati	18 germinati	19 germinati	20 germinati	20 germinati
Seme + alginato	14 germinati	18 germinati	20 germinati	20 germinati	20 germinati
Seme + alginato & 6755	11 germinati	16 germinati	21 germinati	21 germinati	21 germinati
Seme + alginato & 6776	17 germinati	20 germinati	21 germinati	22 germinati	22 germinati
Seme + alginato & 5234	2 germinati	2 germinati	16 germinati	20 germinati	20 germinati
Seme + alginato & 2046	17 germinati	17 germinati	22 germinati	23 germinati	23 germinati

Tabella 4.28 percentuale di germinazione dei semi dopo 5,6,7,9,12 giorni di incubazione

Tesi	% germinazione dopo 5gg	% germinazione dopo 6gg	% germinazione dopo 7gg	% germinazione dopo 9gg	% germinazione dopo 12gg
Seme naturale	48	72	76	80	80
Seme + alginato	56	72	80	80	80
Seme + alginato & 6755	44	64	84	84	84
Seme + alginato & 6776	68	80	84	88	88
Seme + alginato & 5234	8	8	64	80	80
Seme + alginato & 2046	68	68	88	92	92

Nelle foto da 4.9 a 4.14 sono mostrati i diversi campioni di semi germinati dopo 12 giorni



Foto 4.9 Rilievo germinazione al 12° giorno semi non trattati



Foto 4.10 Rilievo germinazione al 12° giorno semi trattati con alginato di sodio





Foto 4.12 Rilievo germinazione al 12° giorno semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma harzianum* isolato 6776



Foto 4.11 Rilievo germinazione al 12° giorno semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma harzianum* isolato 6755

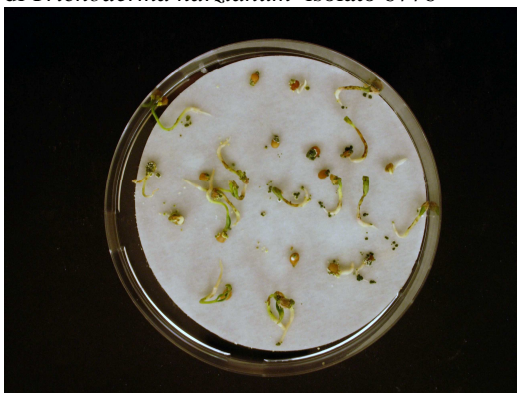


Foto 4.13 Rilievo germinazione al 12° giorno semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma harzianum* isolato 5234

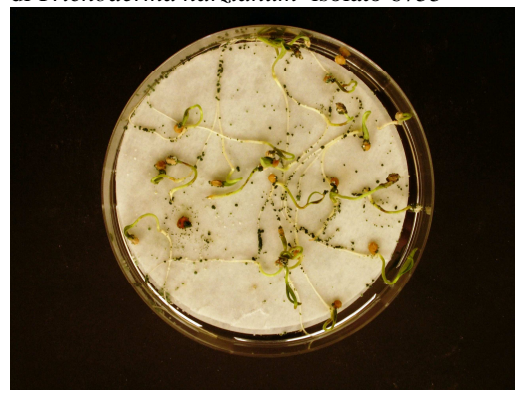


Foto 4.14 Rilievo germinazione al 12° giorno semi trattati con alginato di sodio e sospensione conidica di *Trichoderma harzianum* isolato 2046

Per valutare quantitativamente il numero dei conidi presenti sulla superficie di ogni seme trattato è stata effettuata una stima teorica. Il numero di semi utilizzati per ogni trattamento è stato calcolato in base al peso medio del singolo seme. Il peso della soluzione di alginato e sospensione conidica degli isolati fungini in esame è stato ottenuto per differenza tra il peso dei semi subito dopo e prima del trattamento. Conoscendo il peso specifico della soluzione di alginato di sodio all'1% utilizzata per l'impellettamento è stato possibile calcolarne il volume; da questo poiché la concentrazione della sospensione conidica era nota, è stato ottenuto il numero dei conidi presenti nel volume distribuito e successivamente, dividendo quest'ultimo per il numero dei semi trattati, si è ottenuto il numero teorico dei conidi distribuiti sulla superficie di ogni seme.

Tabella 4.29 Stima teorica dei conidi presenti sulla superficie dei semi trattati

Dati						
- Peso medio 1 seme pomodoro 0,0031 g						
- Peso specifico alg 1% 1,01635 g ml <sup>-1</sup>						
- Concentrazione della soluzione alginato 1% + sospensione conidica 10 <sup>6</sup> conidi ml <sup>-1</sup>						
Tesi	Peso semi prima del trattamento	N° semi	Peso semi dopo il trattamento	Peso soluzione distribuita	Volume soluzione distribuita	Conidi a seme
Seme + alginato & 6755	6,00057	1936	7,13542	1,13485	1,11659	577
Seme + alginato & 6776	6,00120	1936	7,31604	1,31484	1,29369	668
Seme + alginato & 5234	6,00053	1936	7,29575	1,29522	1,27438	658
Seme + alginato & 2046	6,00147	1936	7,30836	1,30689	1,28587	664

Questo calcolo teorico probabilmente rappresenta una sottostima del numero dei conidi effettivamente presente sulla superficie di ogni seme. Infatti non si può escludere che durante il trattamento ci sia stata una certa evaporazione dell'acqua della soluzione di alginato e quindi il peso di questa da noi calcolato è leggermente inferiore.

Sono state condotte ulteriori prove per valutare il numero di conidi effettivamente distribuito sulla superficie del seme. La prima prova prevedeva il risciacquo in acqua sterile dei semi trattati e il conteggio delle c.f.u. presenti nell'acqua di lavaggio a diverse pilastrate su PDA e incubate a 24°C. I risultati ottenuti da questa prova sono nettamente inferiori a quelli ottenuti dal calcolo teorico, probabilmente a causa della difficoltà nel ridisciogliere in acqua il film di alginato di sodio presente sui tegumenti seminali. La seconda prova prevedeva l'omoginizzazione di 5 semi con l'aggiunta di una piccola quantità di acqua e il successivo conteggio delle c.f.u. della sospensione ottenuta a diverse diluizioni, piastrate su P190. I risultati di questa prova sono stati maggiori della prova precedente ma ancora inferiori a quelli del calcolo teorico. Ciò può essere spiegato dal fatto che, anche se l'omoginizzazione dei semi ottenuta con il mortaio è stata eseguita accuratamente, non è stato possibile ottenere frammenti di tessuto seminale dimensionalmente paragonabili a quelli di un conidio di *Trichoderma*, quindi non si può escludere che sulla superficie di un singolo grosso frammento di tegumento seminale fossero presenti più conidi, che, una volta germinati, avrebbero dato origine ad un'unica colonia che al momento del conteggio sarebbe stata rilevata come una sola c.f.u.

### Rizosfera competenza

Al fine di valutare la rizosfera competenza degli isolati di *Trichoderma* spp. saggiati, sospensioni di particelle terrose della rizosfera sono state pilastrate su P190. Per ogni tesi è stata calcolata la percentuale di piastre in cui si sono sviluppate colonie fungine degli isolati in esame. Per effettuare l'analisi della varianza i dati sono stati convertiti secondo la trasformazione angolare (o in gradi), applicando la formula:

$$f_x = \text{Arcsen} \sqrt{\frac{P}{100}}$$

dove P indica la percentuale di infezione, che divisa per 100 da la proporzione di infezione che va da 0 a 1

Dai rilievi effettuati sulle piastre Petri con P190 contenenti 100 µl di sospensione acquosa di rizosfera si è riscontrata la presenza di colonie di *Trichoderma* spp anche nelle tesi Seme naturale e Seme+alginato, che rappresentavano i nostri controlli. Durante la prova quindi ci deve essere stata una contaminazione accidentale.

L'analisi della varianza ha dato i risultati indicati in tabella 4.30

Tabella 4.30 Analisi della varianza a due vie condotta sui valori medi della percentuale di piastre in cui si sono sviluppate colonie di *Trichoderma*, ( sottoposti a trasformazione angolare)

Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
BLOCCHI	0,2042	3	0,098	0,34027778	0,48194444
TESI	4,768	5	0,6625	4,773	0,008
Error	2,997	15	0,13888889		

Le medie delle diverse tesi differiscono tra loro per un livello di significatività inferiore al 5% (P = 0,008). Per avere una visione più specifica sono stati condotti i confronti multipli HSD di Tukey e LSD di Fisher tra tutte le tesi, in modo da ricercare le differenze che hanno determinato la significatività totale. I risultati ottenuti dai confronti multipli post hoc sono illustrati nella tabella 4.31, dove per ogni colonna sono indicati il tipo di test e il livello di significatività utilizzato e dove a lettera uguale corrispondono le tesi le cui medie non differiscono significativamente.

Tabella 4.31 risultato dei confronti *post hoc* per Media Arcsen  $\sqrt{\text{proporzione}}$  rizosfera competenza

Tesi	Media Arcsen $\sqrt{\text{proporzione}}$	Media Percentuale	Tukey HSD 10%	Tukey HSD 5%	Fisher LSD 5%	Fisher LSD 1%
Seme naturale	0,239	16,66667	A	A	A	A
Seme+alginato	0,262	18,75	A	A	A	A
Seme+alginato & <i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	0,695	45,92	AB	AB	AB	AB
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6776	1,105	74,17	AB	AB	B	AB
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6755	1,227	79,17	B	AB	B	B
Seme+alginato & <i>Trichoderma koningii</i> 2046	1,35	90,83	B	B	B	B

Dai confronti multipli ottenuti con Tukey HSD si evidenzia che due tesi , Seme+alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6755, Seme+alginato & *Trichoderma koningii* isolato 2046, differiscono dalle due tesi di controllo per un livello di significatività inferiore al 10%, ad un livello di significatività inferiore al 5% la sola tesi Seme + alginato & *Trichoderma koningii* isolato 2046 differisce dalle tesi di controllo. Con il procedimento dei confronti multipli Fisher LSD si evidenzia che tre tesi Seme+alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6776, Seme + alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6755, Seme+alginato & *Trichoderma koningii* isolato 2046 differiscono dai controlli per un livello di significatività inferiore al 5% , solo le ultime due differiscono dal controllo per un livello di significatività inferiore all'1%.

### Endofitismo

Lo scopo dei rilievi effettuati sulle piastre Petri contenenti P190, in cui sono state incubate frammenti di radice sterilizzati in superficie, delle piante di pomodoro , è stato quello di individuare gli isolati delle specie di *Trichoderma* eventualmente presenti all'interno dei tessuti radicali. Per ogni tesi è stata calcolata la percentuale di piastre in cui si sono sviluppate colonie fungine degli isolati in esame. Per effettuare l'analisi della varianza i dati sono stati sottoposti a trasformazione angolare (o in gradi), seguendo la funzione:

$$f_x = \text{Arcsen} \sqrt{\frac{P}{100}}$$



dove P indica la percentuale di infezione, che divisa per 100 da la proporzione di infezione che va da 0 a 1.

Dai rilievi effettuati sulle piastre Petri con P190 contenenti porzioni dell'apparato radicale si è riscontrata la presenza di colonie di *Trichoderma* spp anche nella tesi Seme+alginato della terza replica, che rappresentava un controllo pertanto i risultati di questa replica non sono stati presi in considerazione.

L'analisi della varianza effettuata sui valori delle tre repliche rimanenti ha dato i risultati indicati in tabella 4.32

Tabella 4.32 Analisi della varianza a due vie condotta sui valori di percentuale di endofitismo (sottoposti a trasformazione angolare).

Source	S.Q	DF	S <sup>2</sup>	F	P
BLOCCHI	0,175	2	0,087	3,2	0,084
TESI	1,017	5	0,203	7,456	0,004
Error	0,273	10	0,027		

Le differenze tra le diverse medie sono risultate significative (P=0,004).

Per avere una visione più specifica sono stati condotti i confronti multipli HSD di Tukey e LSD di Fisher tra tutte le tesi, in modo da ricercare le differenze che hanno determinato la significatività totale. I risultati ottenuti dai confronti multipli post hoc sono illustrati nella tabella 4.34, dove per ogni colonna sono indicati il tipo di test e il livello di significatività utilizzato e dove a lettera uguale corrispondono le tesi le cui medie non differiscono significativamente.

Tabella 4.31 risultato dei confronti *post hoc* per Media Arcsen  $\sqrt{\text{proporzione}}$  endofitismo

Tesi	Media Arcsen $\sqrt{\text{proporzione}}$	Media Percentuale	Tukey HSD 10%	Tukey HSD 5%	Fisher LSD 5%	Fisher LSD 1%
Seme naturale	0	0	A	A	A	A
Seme+alginato	0	0	A	A	A	A
Seme+alginato & <i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	0,501	0,23	AB	AB	AB	AB
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6776	0,743	0,458	B	AB	BC	B
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6755	0,802	0,516	B	B	BC	B
Seme+alginato & <i>Trichoderma koningii</i> 2046	0,873	0,587	B	B	C	B

Dai confronti multipli ottenuti con Tukey HSD si evidenzia che tre tesi , Seme+alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6776, Seme+alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6755, Seme+alginato & *Trichoderma koningii* isolato 2046, differiscono dalle due tesi di controllo per un livello di significatività inferiore al 10% , ad un livello di significatività inferiore al 5% solo le due tesi Seme+alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6755 e Seme+alginato & *Trichoderma koningii* isolato 2046 differiscono dalle tesi di controllo. Con il procedimento dei confronti multipli Fisher LSD si evidenzia che tre tesi Seme+alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6776, Seme+alginato & *Trichoderma harzianum* isolato 6755, Seme+alginato & *Trichoderma koningii* isolato 2046 differiscono dai controlli per un livello di significatività inferiore al 5%, e al 10%. La tesi Seme+alginato & *Trichoderma koningii* isolato 2046 differisce anche dalla tesi Seme+alginato & *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 , per un livello di significatività inferiore al 5%.

E' stata valutata la correlazione tra la capacità endofitica dei singoli isolati e la loro capacità di colonizzare la rizosfera. La regressione risultante (Figura 4.15), dimostra come esista una relazione lineare altamente significativa ( $P = 0.002$ ) tra i due parametri.

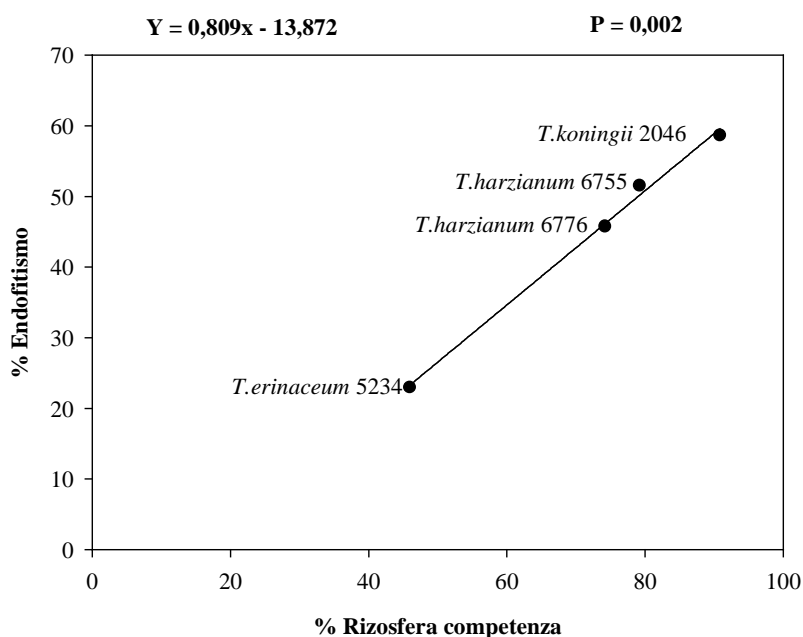


Figura 4.15 Grafico della regressione tra la capacità endofitica dei diversi isolati e la loro capacità di colonizzare la rizosfera

### Promozione della crescita.

Per ciascuna replica sono stati eseguiti tre rilievi sulle fasi fenologiche delle piante delle differenti tesi a cadenze settimanali. Ad ogni stato fenologico individuato è stato assegnato un punteggio progressivo come illustrato nella tabella 4.34.

Tabella 4.34 trasformazione dei giudizi qualitativi in una scala ordinale

Seme non germinato	0
Inizio della germinazione	1
Emersione cotiledoni	2
Cotiledoni ben distesi	3
1 <sup>a</sup> foglia vera	4
2 <sup>a</sup> foglie vera	5
3 <sup>a</sup> foglie vera	6

I dati così trasformati sono stati sottoposti ad un'analisi non parametrica della varianza per ranghi a due criteri di classificazione, utilizzando il test di Friedman. Questo, a differenza dell'analisi della varianza parametrica per due criteri di classificazione, utilizza come parametro della tendenza centrale la mediana e non la media. Inoltre, non consente di verificare l'ipotesi nulla sulla tendenza centrale per entrambi i fattori contemporaneamente, quindi, se si è interessati a verificare l'uguaglianza delle mediane per entrambi i fattori, si devono condurre due analisi in tempi successivi e in modo indipendente.

Prima di iniziare l'analisi è necessario che i dati siano trasformati in ranghi assegnando 1 al punteggio più basso e un numero  $n$  al punteggio più alto, dove con  $n$  viene indicato il numero di osservazioni sottoposte alla trasformazione. Nella prova condotta i fattori da analizzare indipendentemente sono le differenti repliche e le differenti tesi contenenti più osservazioni. Per le due analisi si deve procedere a trasformare i dati in ranghi rispettivamente all'interno delle differenti tesi e all'interno delle differenti repliche. I risultati dell'analisi così condotta sono illustrati nelle tabelle da seguenti 4.35 a 4.40 dove è stato riportato anche il coefficiente di concordanza di Kendall che rappresenta una stima della correlazione media tra le variabili.

## Risultati

Tabella 4.35 analisi della varianza non parametrica per ranghi a 2 criteri di classificazione ( 1° rilievo per le repliche )

Variabile	Somma dei ranghi	Friedman Test Statistics	Coefficiente di concordanza di Kendall	P Assumendo distribuzione $\chi^2$ con 3 gdl
1^Replica	94,0	3,542	0,033	0,315
2^Replica	78,5			
3^Replica	89,5			
4^Replica	98,0			

Tabella 4.36 analisi della varianza non parametrica per ranghi a 2 criteri di classificazione ( 1° rilievo per le tesi )

Variabile	Somma dei ranghi	Friedman Test Statistics	Coefficiente di concordanza di Kendall	P Assumendo distribuzione $\chi^2$ con 3 gdl
Seme naturale	83,0	0,744	0,006	0,980
Seme+alginato	78,0			
Seme+alginato & <i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	84,5			
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6776	83,5			
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6755	88,0			
Seme+alginato & <i>Trichoderma koningii</i> 2046	87,0			

Dal test di Friedman, per i dati del primo rilievo, risulta che le differenze tra le 4 repliche e le 6 tesi non risultano statisticamente significative ( $P > 0,05$ )

Tabella 4.37 analisi della varianza non parametrica per ranghi a 2 criteri di classificazione (2° rilievo per le repliche)

Variabile	Somma dei ranghi	Friedman Test Statistics	Coefficiente di concordanza di Kendall	P Assumendo distribuzione $\chi^2$ con 3 gdl
1^Replica	94,0	3,542	0,033	0,315
2^Replica	78,5			
3^Replica	89,5			
4^Replica	98,0			

Tabella 4.38 analisi della varianza non parametrica per ranghi a 2 criteri di classificazione (2° rilievo per le tesi)

Variabile	Somma dei ranghi	Friedman Test Statistics	Coefficiente di concordanza di Kendall	P Assumendo distribuzione $\chi^2$ con 3 gdl
Seme naturale	89,5	4,113	0,034	0,533
Seme+alginato	75,0			
Seme+alginato & <i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	87,0			
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6776	91,0			
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6755	89,0			
Seme+alginato & <i>Trichoderma koningii</i> 2046	72,0			

Dal test di Friedman, per i dati del secondo rilievo, risulta che le differenze tra le 4 repliche e le 6 tesi non risultano statisticamente significative ( $P > 0,05$ )

Tabella 4.39 analisi della varianza non parametrica per ranghi a 2 criteri di classificazione( 3° rilievo per le repliche)

Variabile	Somma dei ranghi	Friedman Test Statistics	Coefficiente di concordanza di Kendall	P Assumendo distribuzione $\chi^2$ con 3 gdl
1^Replica	120,5	21,217	0,196	0,000
2^Replica	77,5			
3^Replica	77,5			
4^Replica	84,5			

Tabella 4.40 analisi della varianza non parametrica per ranghi a 2 criteri di classificazione (3° rilievo per le tesi)

Variabile	Somma dei ranghi	Friedman Test Statistics	Coefficiente di concordanza di Kendall	P Assumendo distribuzione $\chi^2$ con 3 gdl
Seme naturale	93,0	6,048	0,050	0,302
Seme+alginato	72,5			
Seme+alginato & <i>Trichoderma erinaceum</i> 5234	78,5			
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6776	96,0			
Seme+alginato & <i>Trichoderma harzianum</i> 6755	89,5			
Seme+alginato & <i>Trichoderma koningii</i> 2046	74,5			

Dal test di Friedman, per i dati del terzo rilievo, risulta che le differenze tra le 4 repliche sono altamente significative ( $P= 0,000$ ) , al contrario le 6 tesi non risultano statisticamente significative  $P > 0,05$ .

### 4.3 Prova di antagonismo in vitro e micoparassitismo

Sulle piastre delle colture duali allestite come descritto nel paragrafo 3.3 sono stati effettuati dei rilievi sui due raggi delle colonie degli isolati del patogeno, uno nella direzione della colonia dell'antagonista e uno in direzione laterale rappresentante il controllo (Figura 3.9)

Poichè le colonie del patogeno si presentavano piuttosto irregolari, i valori di tutte le misurazioni effettuate per i due raggi di accrescimento sono stati standardizzati per differenza con i valori delle misurazioni del primo rilievo. Con questi dati sono stati costruiti i grafici riportati di seguito, dove sulle ascisse è stato posto il tempo e sulle ordinate i successivi valori di accrescimento rispetto all'inizio della prova, che corrisponde al momento in cui è stato trapiantato l'antagonista. Inoltre, i dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza per constatare a quale livello di significatività

il raggio di controllo (rc) e il raggio verso l'antagonista (rt) possono essere considerati diversi. Le lettere diverse riportate sui grafici indicano le misurazioni che differiscono per un livello di significatività inferiore a 0,05.

Nella figura 4.16 sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* in presenza di *T. harzianum* isolato 6776

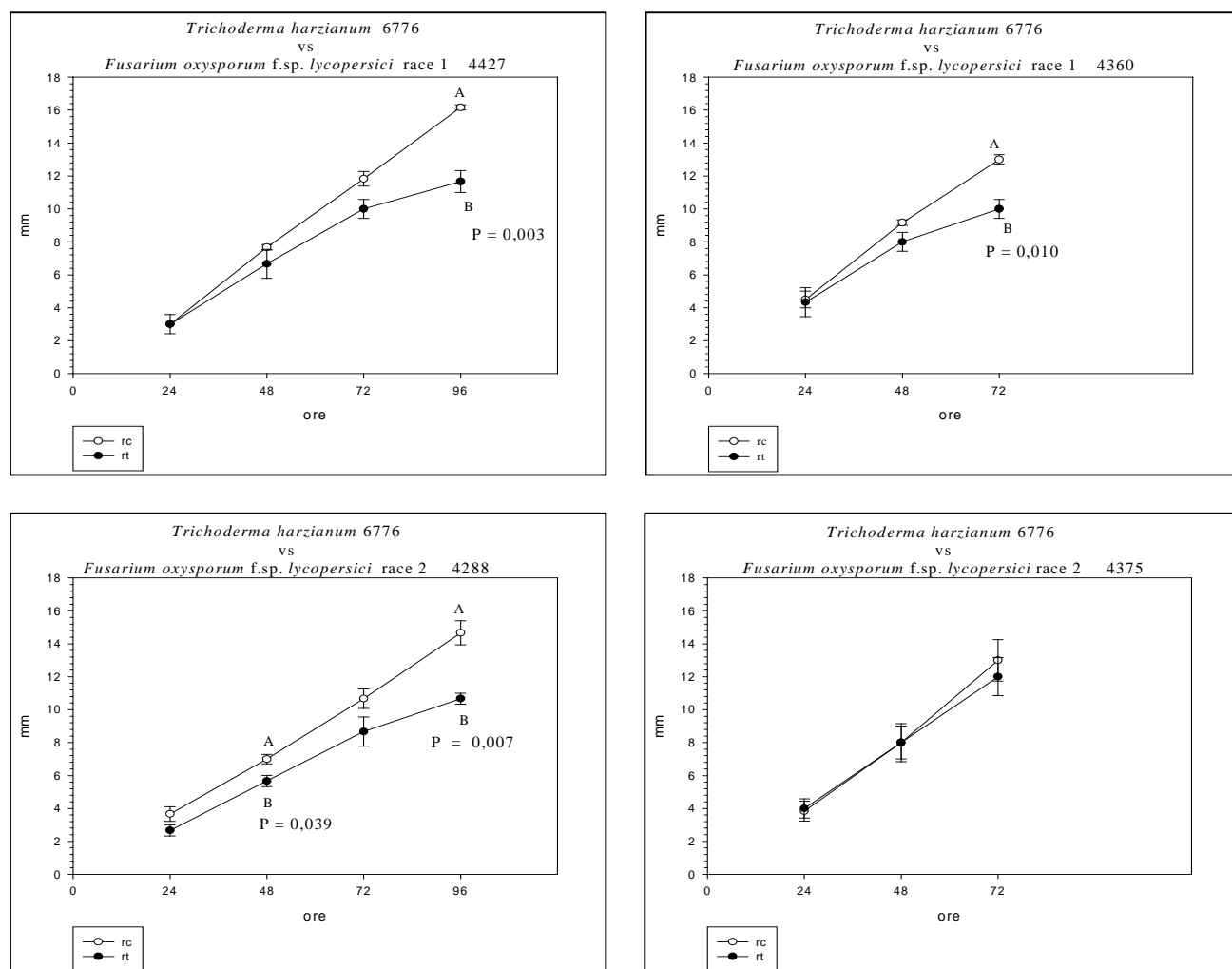


Figura 4.16 Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* in colture duali con *Trichoderma harzianum* 6776 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 1 isolato 4427, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 1 isolato 4360 e di *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 2 isolato 4288, nell'ultimo rilievo, presentano una media dell'accrescimento radiale verso l'antagonista (rt) inferiore alla media dell'accrescimento radiale laterale utilizzato come controllo. Inoltre, in tutti e tre i

casi, si può notare che l'andamento degli accrescimenti laterali (rc) manifesta una certa costanza. La colonia di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 2 isolato 4375, nei tre rilievi effettuati, non mostra differenze le medie dei due accrescimenti. Nelle figure 4.17a e 4.17b sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *melonis* in presenza di *T. harzianum* isolato 6776

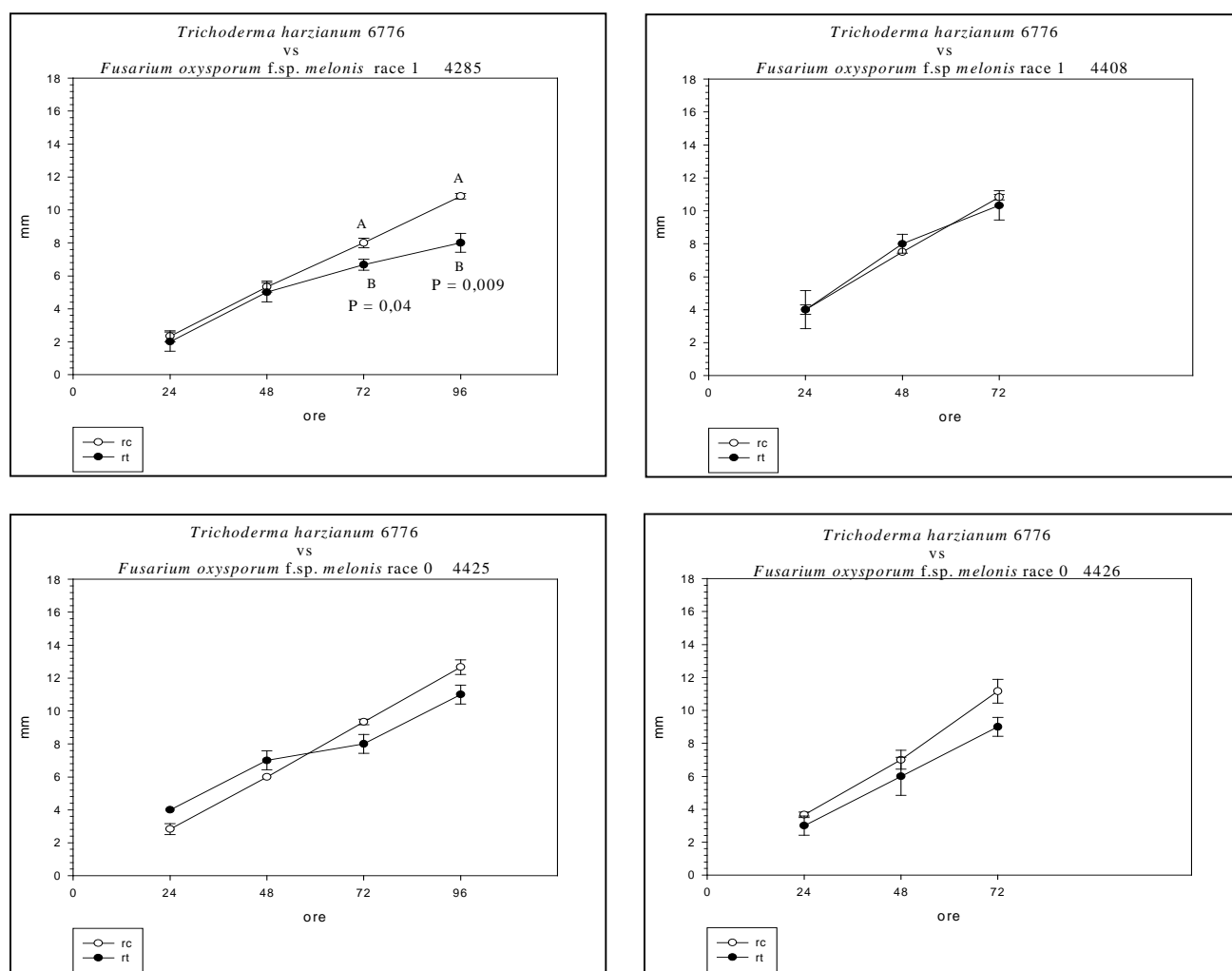


Figura 4.17a Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in colture duali con *Trichoderma harzianum* 6776 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

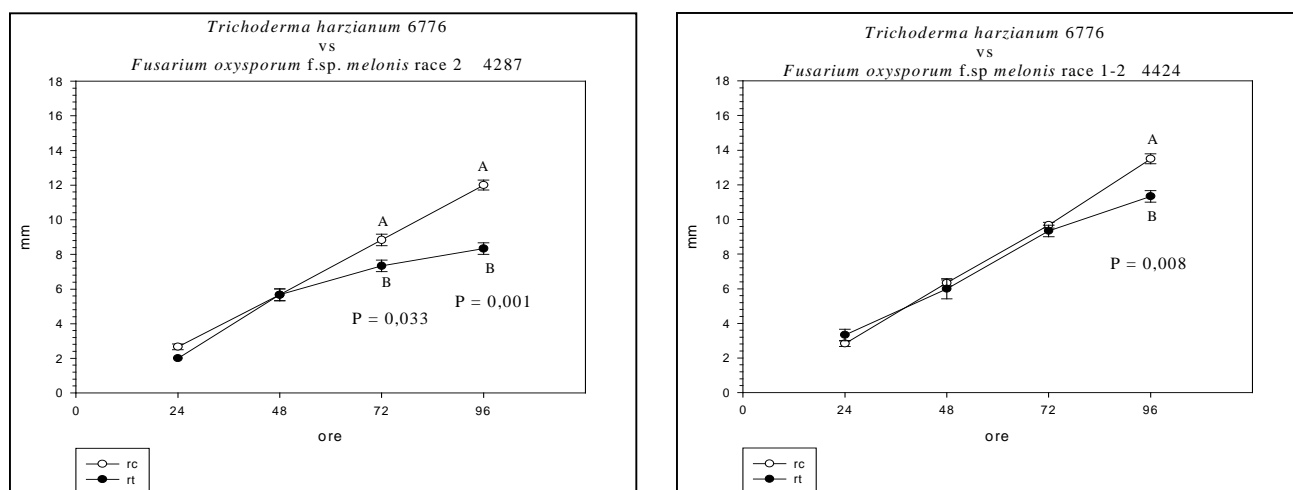


Figura 4.17b Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in colture duali con *Trichoderma harzianum* 6776 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4285, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 2 isolato 4287 presentano, al penultimo rilievo (72 ore), una media dell'accrescimento radiale verso l'antagonista inferiore a quella di controllo. Questa tendenza si conferma anche nell'ultimo rilievo. La colonia di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1-2 isolato 4424 presenta il medesimo comportamento ma sola all'ultimo rilievo delle 98 ore. Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4408, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 0 isolato 4425, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 0 isolato 4426, nei tre rilievi effettuati, non mostrano differenze statisticamente significative tra le medie dei due accrescimenti radiali.

Nella figura 4.18 sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* in presenza di *T. koningii* isolato 2046



## Risultati

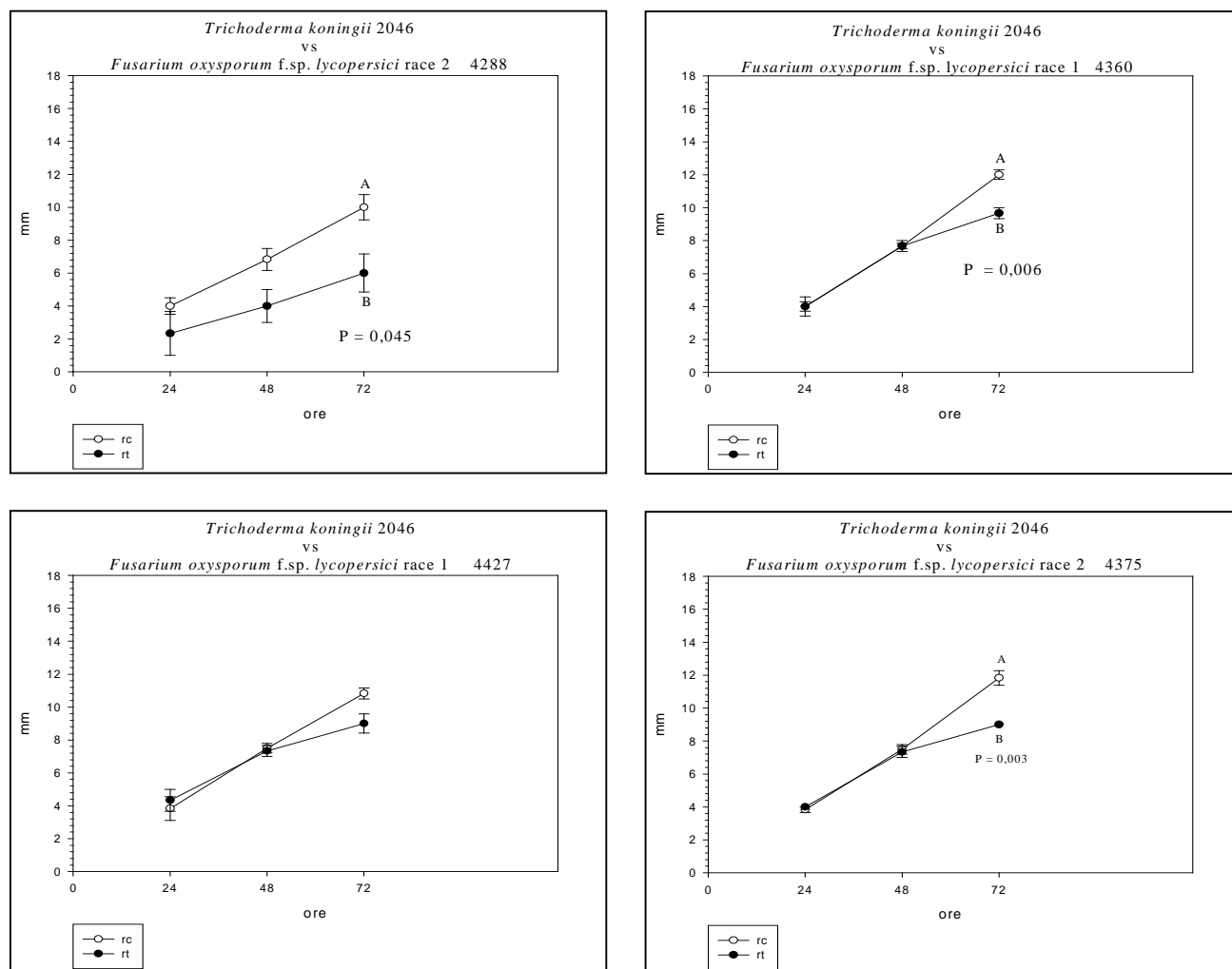


Figura 4.18 Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* in colture duali con *Trichoderma konigii* 2046 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 1 isolato 4360, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 2 isolato 4375 e di *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 2 isolato 4288, all'ultimo rilievo (72 ore), mostrano una media degli accrescimenti radiali verso l'antagonista inferiore a quella degli accrescimenti di controllo. Il *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 1 isolato 4427 non mostra differenze statisticamente significative tra le medie dei due accrescimenti radiali.

Nella Figura 4.19 sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *melonis* in presenza di *T. koningii* isolato 2046

# Risultati

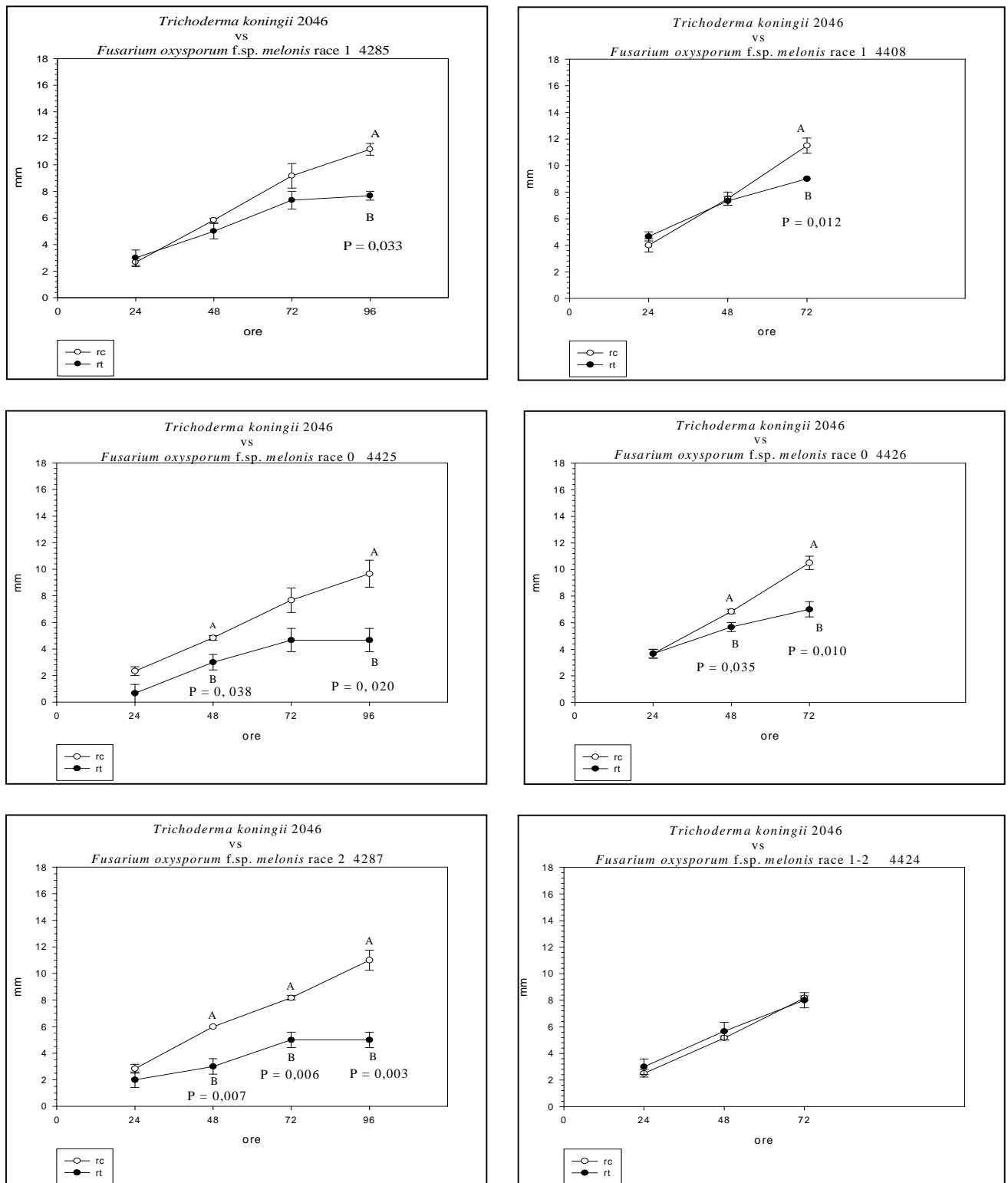


Figura 4.19 Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* in colture duali con *Trichoderma koningii* 2046 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

## Risultati

Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 2 isolato 4287 e di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 0 isolato 4426, già al secondo rilievo (48 ore) mostrano la media degli accrescimenti radiali verso la colonia dell'antagonista inferiore a quella degli accrescimenti laterali, e tale tendenza si conferma nei rilievi successivi. Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 0 isolato 4425, di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4285 e di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4408 evidenziano tale caratteristica solo all'ultimo rilievo. Il *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1-2 isolato 4424 non mostra differenze statisticamente significative tra i due accrescimenti radiali.

In Figura 4.20 sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* in presenza di *T. erinaceum* isolato 5234

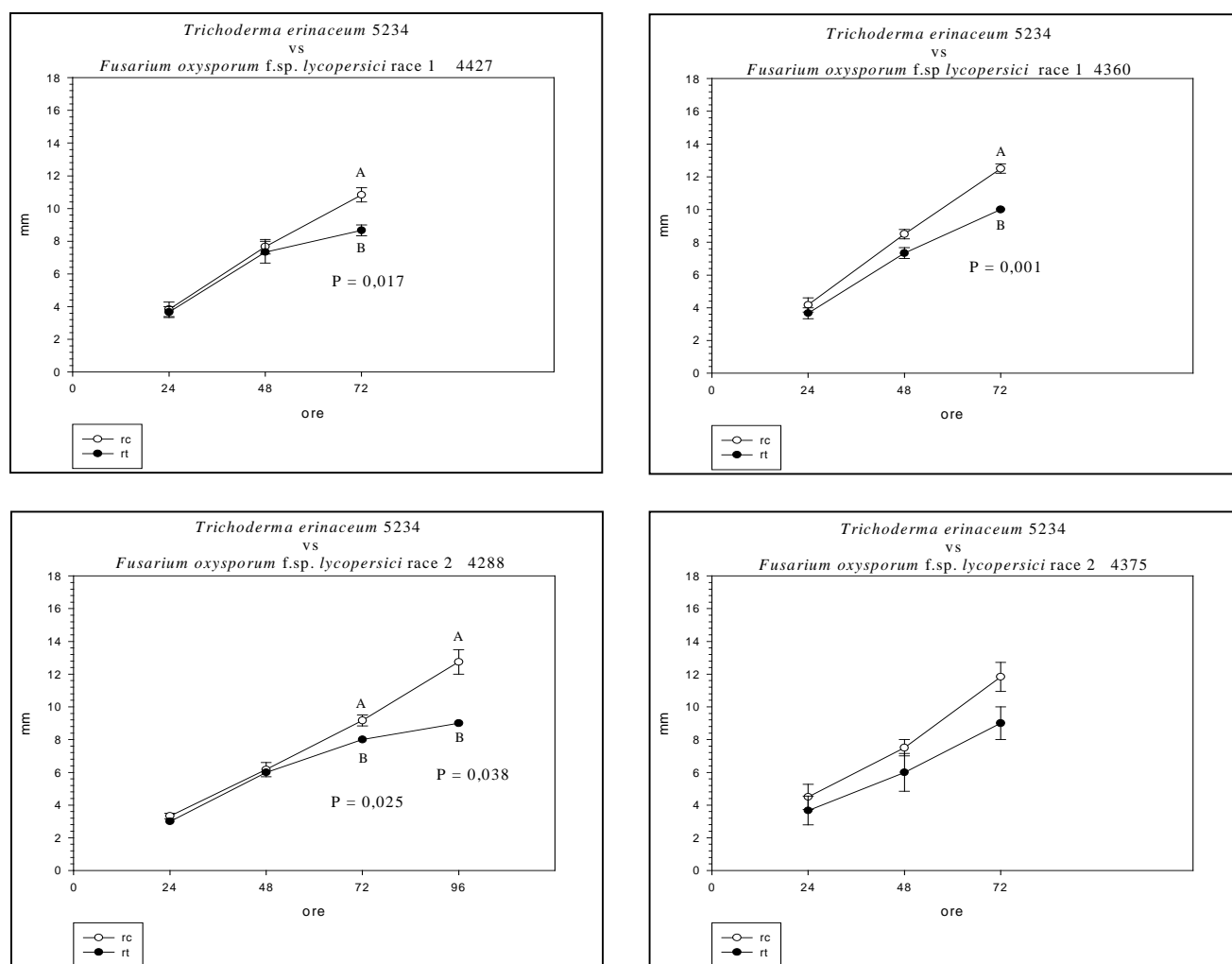


Figura 4.20 Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in colture duali con *Trichoderma erinaceum* 5234 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

Il *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 2 isolato 4288 al penultimo rilievo mostra la media degli accrescimenti radiali verso la colonia dell'antagonista inferiori a quella di quelli laterali di controllo e tale tendenza si accentua nell'ultimo rilievo (96 ore). Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 1 isolato 4427 e di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 1 isolato 4360 mostrano differenze tra gli accrescimenti radiali solo nell'ultimo rilievo, con una media degli accrescimenti verso la colonia dell'antagonista inferiore alla media degli accrescimenti di controllo. Il *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 2 isolato 4375 non mostra differenze statisticamente significative tra le medie dei due accrescimenti radiali.

Nelle Figure 4.21a e 4.21b sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *melonis* in presenza di *T. erinaceum* isolato 5234

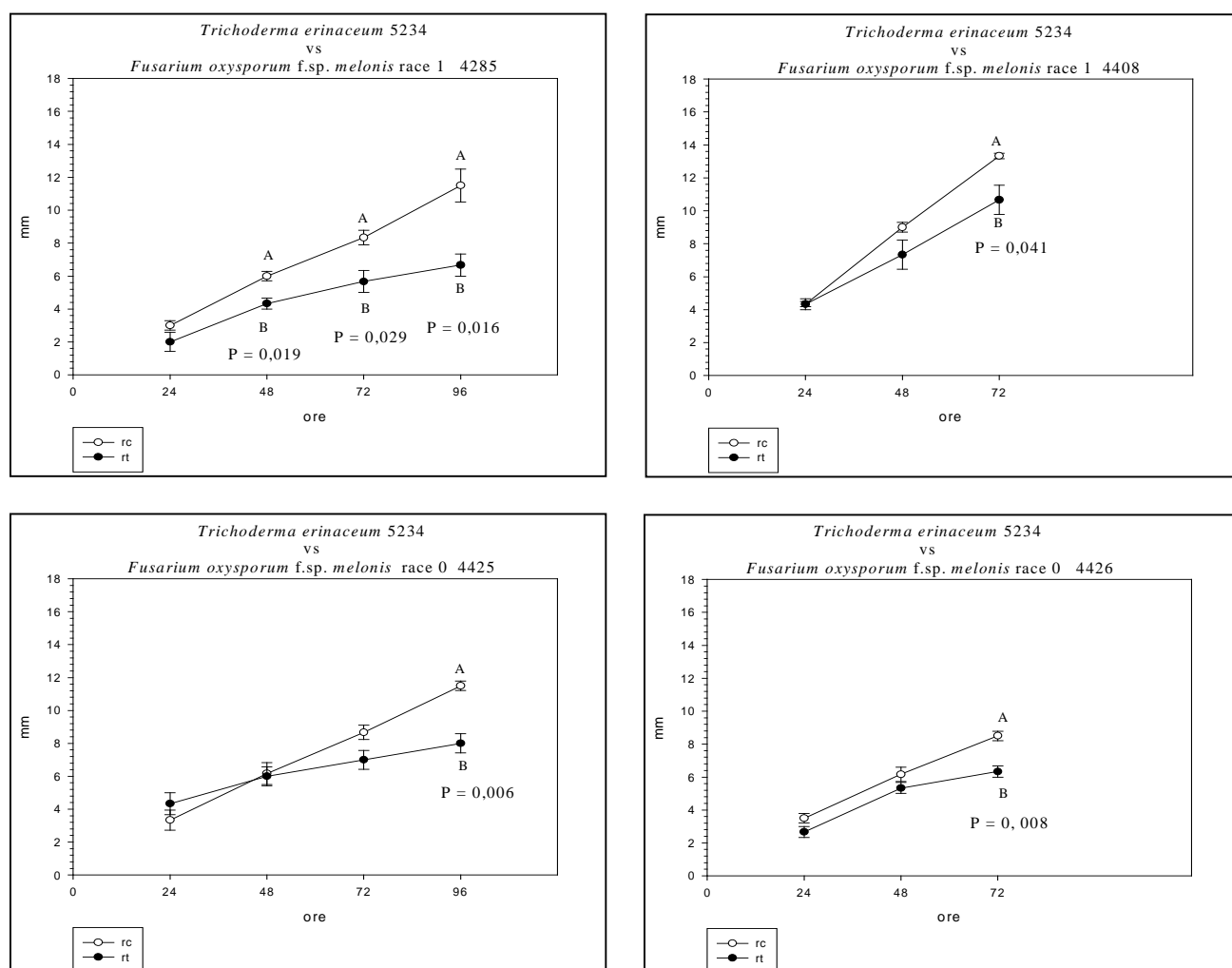


Figura 4.21a Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in colture duali con *Trichoderma erinaceum* 5234 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

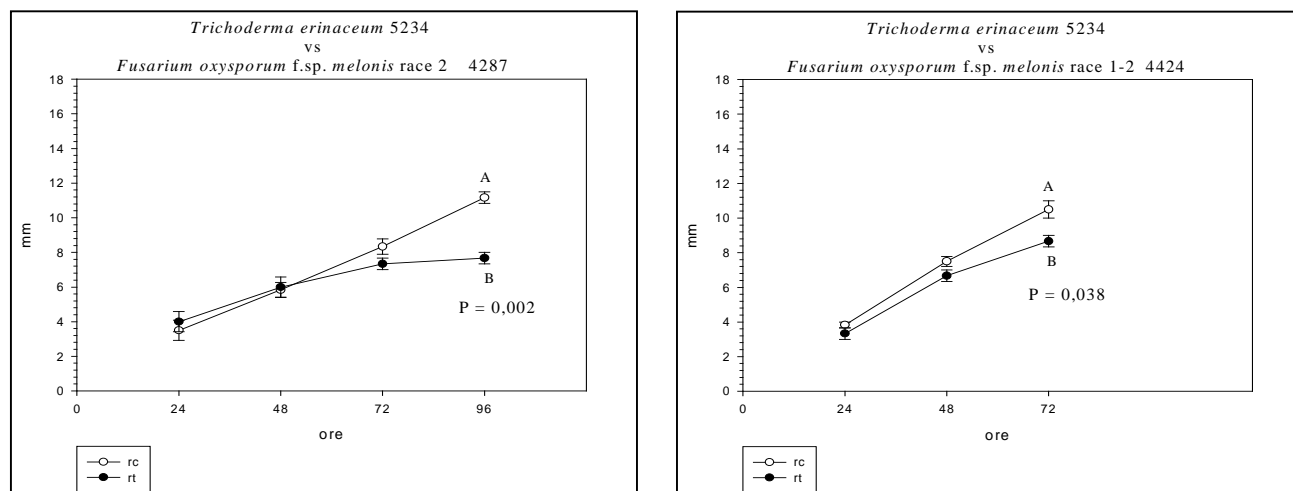


Figura 4.21b Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in colture duali con *Trichoderma erinaceum* 5234 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4285, a partire dal rilievo effettuato dopo 48 ore, mostrano una media degli accrescimenti radiali nella direzione dell'antagonista inferiore a quella degli accrescimenti di controllo. Tale tendenza si accentua nei rilievi successivi. Gli accrescimenti radiali verso l'antagonista delle colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4408, di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 0 isolato 4425 e isolato 4426, di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1-2 isolato 4424, risultano essere inferiori a quelli laterali di controllo solo nell'ultimo rilievo.

Nella Figura 4.22 sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* in presenza di *T. harzianum* isolato 6755.

## Risultati

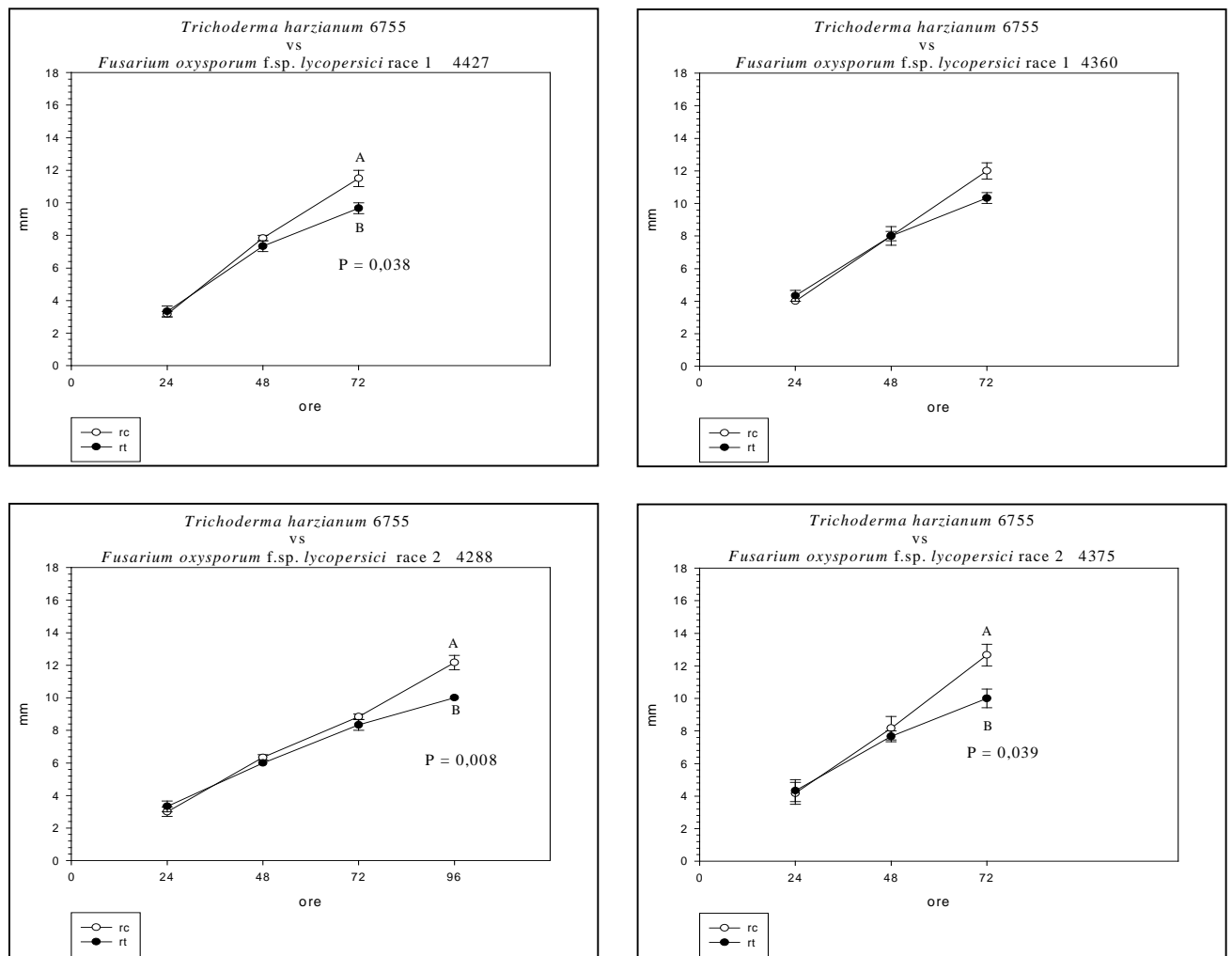


Figura 4.22 Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in colture duali con *Trichoderma harzianum* 6755 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

La media degli accrescimenti radiali verso l' antagonista delle colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 1 isolato 4427, di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 2 isolato 4288 e di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 2 isolato 4375, nell'ultimo rilievo, risulta essere inferiore a quella degli accrescimenti di controllo. Il *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 1 isolato 4360 ad ogni rilievo non mostra differenze statisticamente significative tra le medie dei due accrescimenti radiali.

Nella Figura 4.23 sono mostrati i grafici degli accrescimenti delle colonie degli isolati di *F.oxysporum* f.sp. *melonis* in presenza di *T. harzianum* isolato 6755

# Risultati

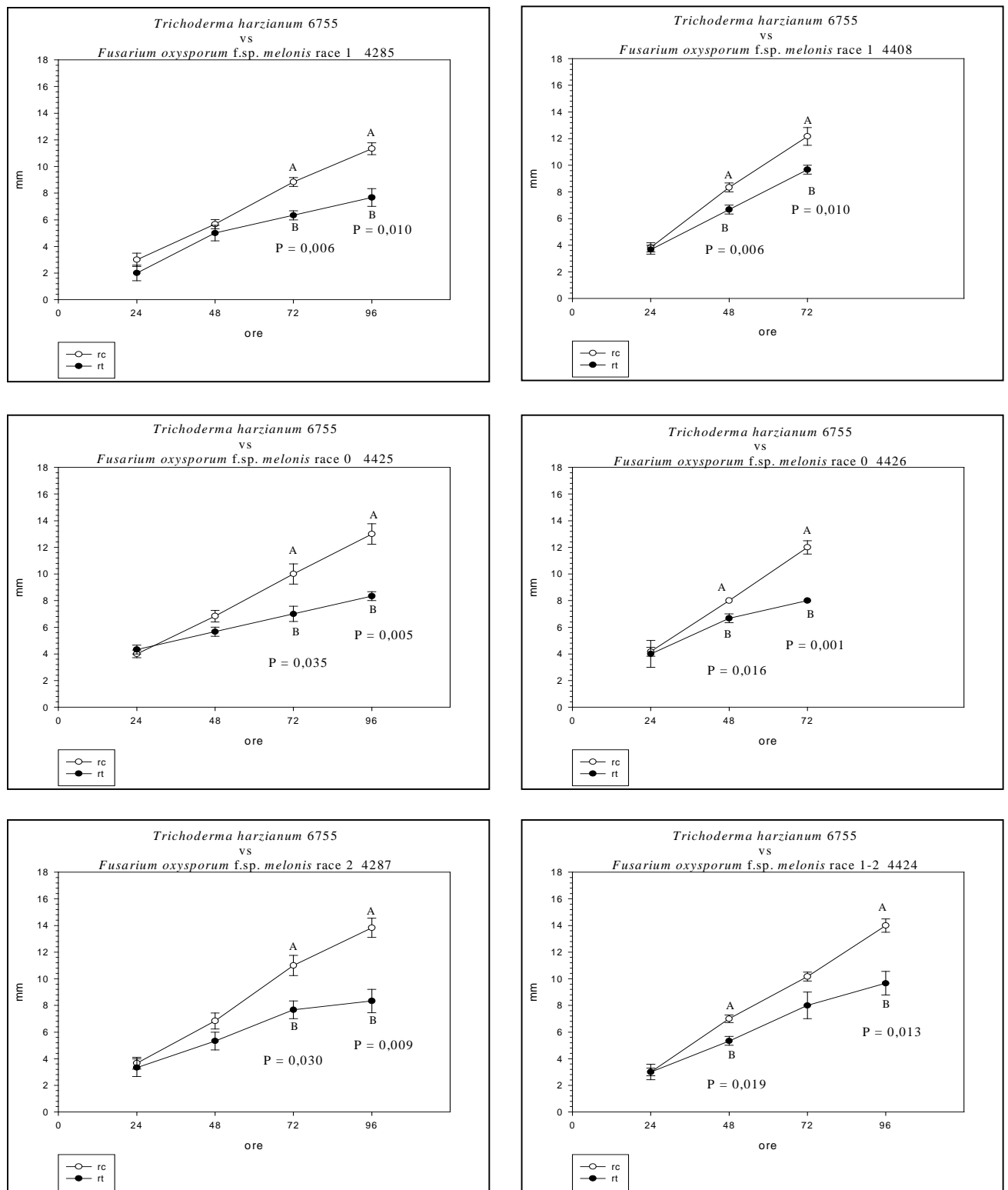


Figura 4.23 Grafici degli Accrescimenti radiali delle colonie dei vari isolati *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* in colture duali con *Trichoderma harzianum* 6755 Rc= Raggio controllo (in bianco) Rt= Raggio verso la colonia dell'antagonista (in nero) .

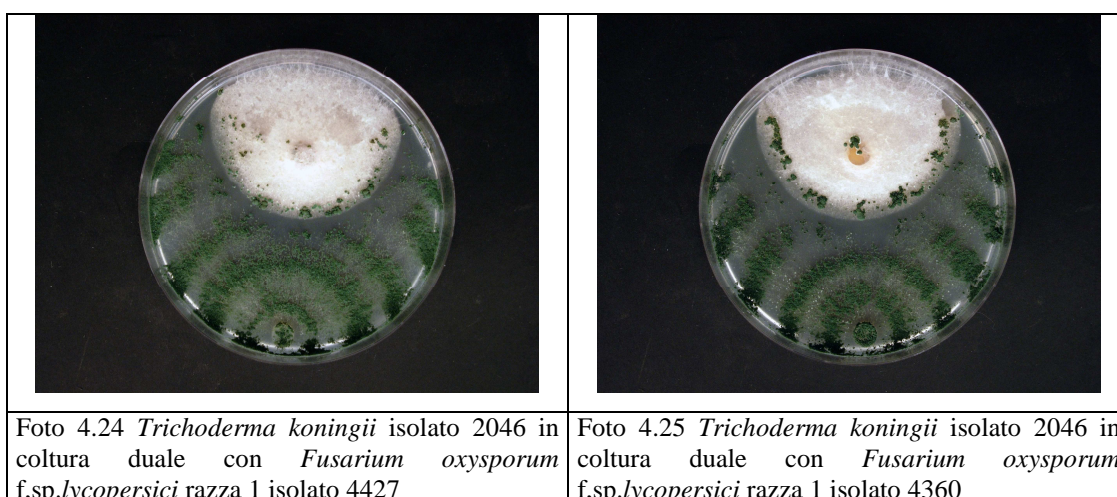
La media degli accrescimenti radiali verso l'antagonista delle colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4285 e isolato 4408, di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 0 isolato 4425 e isolato 4426, di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 2 isolato 4287, al penultimo e all'ultimo rilievo, risulta essere inferiore a quella degli accrescimenti radiali laterali di controllo.

Il *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1-2 isolato 4424 presenta una media degli accrescimenti radiali verso l'antagonista inferiore a quella degli accrescimenti laterali di controllo al rilievo delle 48 ore e delle 96 ore, ma non a quello delle 72 ore in cui le differenze non sono statisticamente significative.

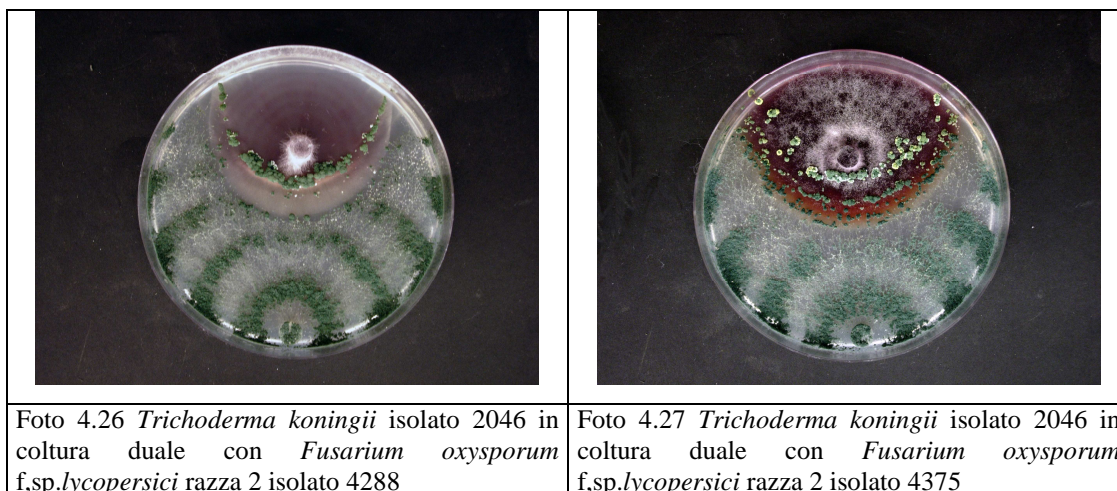
Dopo che le colonie del patogeno e del parassita sono entrate in contatto, le piastre delle colture duali sono state sottoposte ad ulteriori osservazioni, dopo che le colonie del patogeno e dell'antagonista sono entrate in contatto, volte a rilevare la capacità di sovracrescita e di sporulazione dell'antagonista sul patogeno, quali indici di micoparassitismo. Di seguito sono descritti i risultati ottenuti per ogni combinazione antagonista/patogeno.

### ***Trichoderma koningii* isolato 2046 vs *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici***

L'isolato di *Trichoderma koningii* sovracresce differenziando fruttificazioni agamiche sopra le colonie di tutti e quattro gli isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*, come mostrato nelle foto da 4.24 a 4.27.

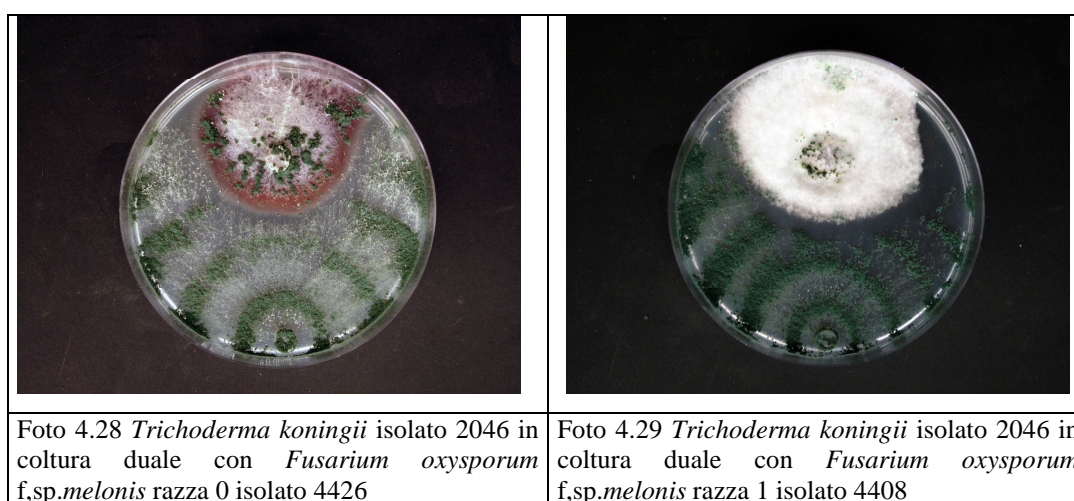


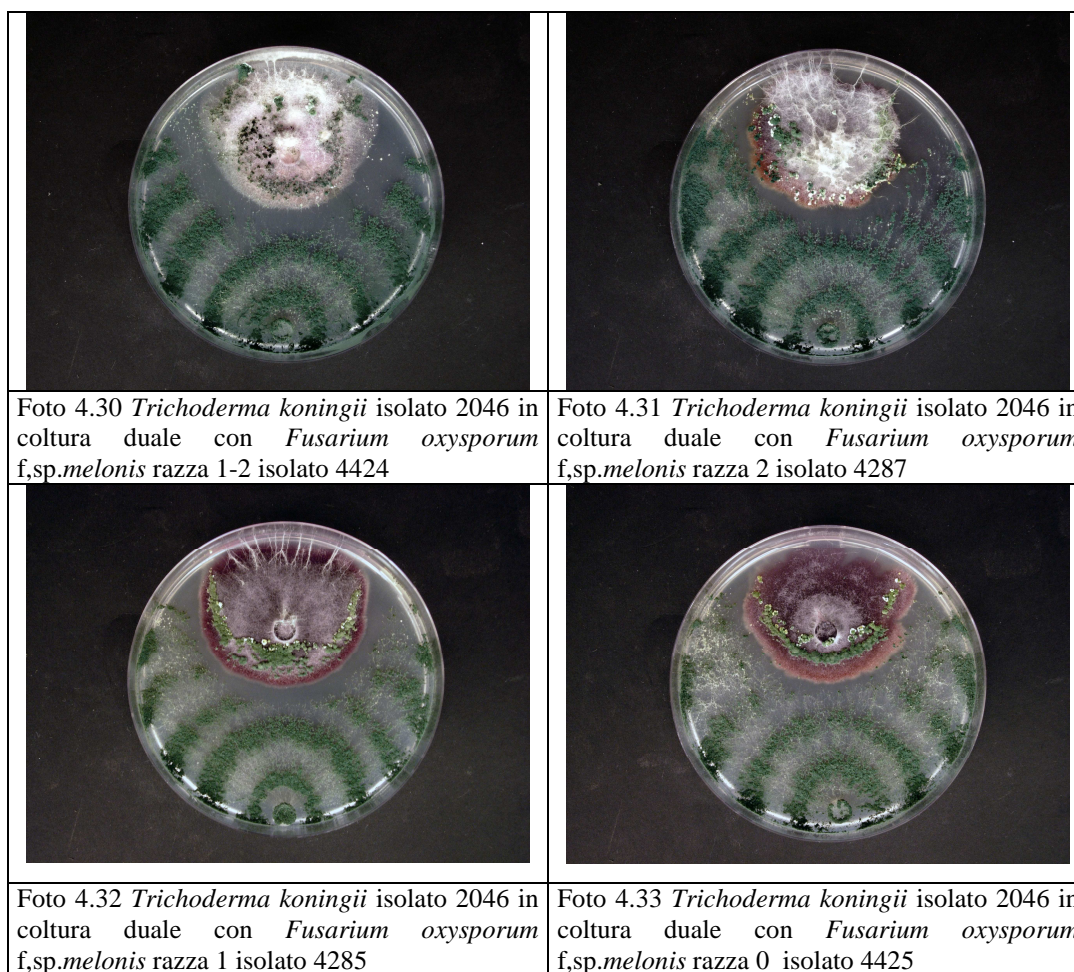




***Trichoderma koningii* isolato 2046 vs *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis***

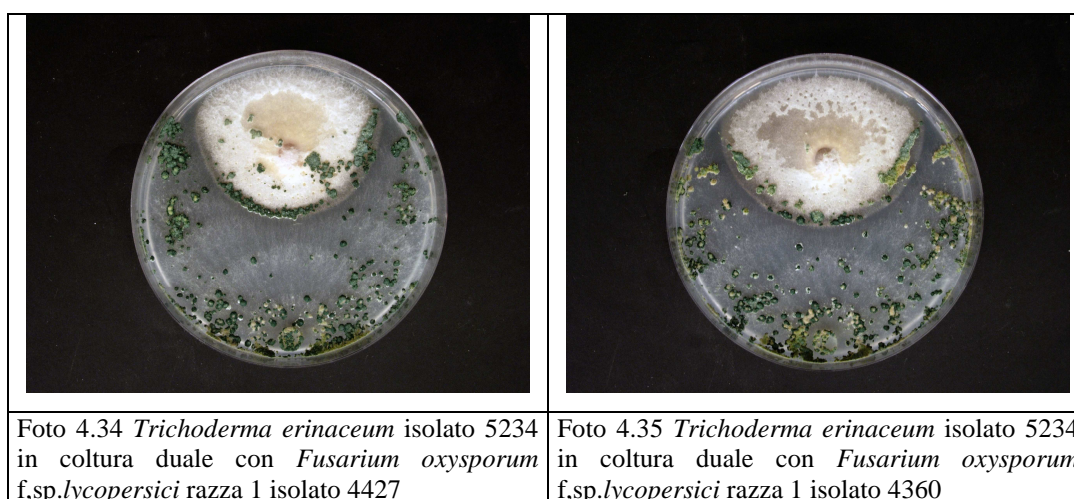
L'isolato di *Trichoderma koningii* sovracresce differenziando fruttificazioni agamiche sopra tutte le colonie di tutti e sei gli isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* , come mostrato nelle foto da 4.28 a 4.33.



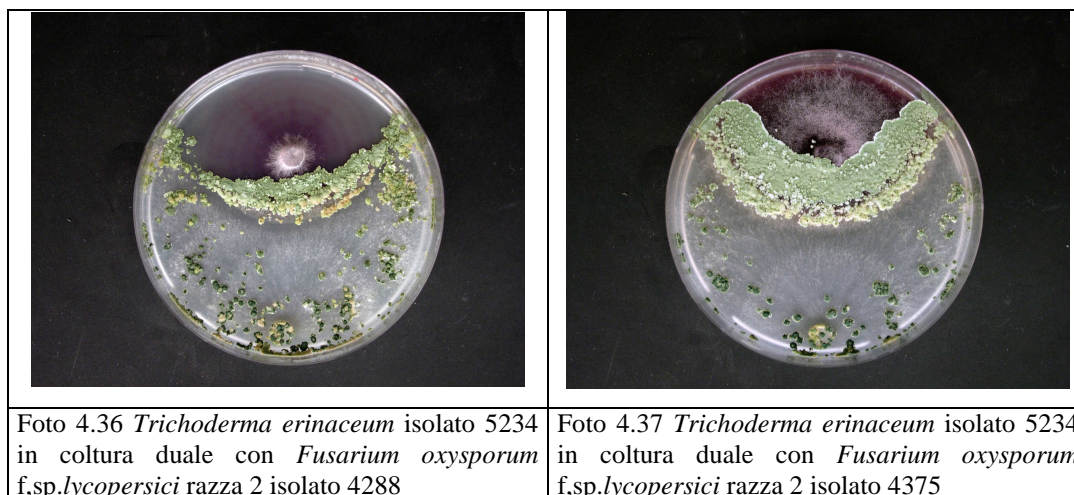


***Trichoderma erinaceum* isolato 5234 vs *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici***

L'isolato di *Trichoderma erinaceum* sovracresce differenziando fruttificazioni sopra le colonie di tutti e quattro gli isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* come mostrato nelle foto da 4.34 a 4.37.

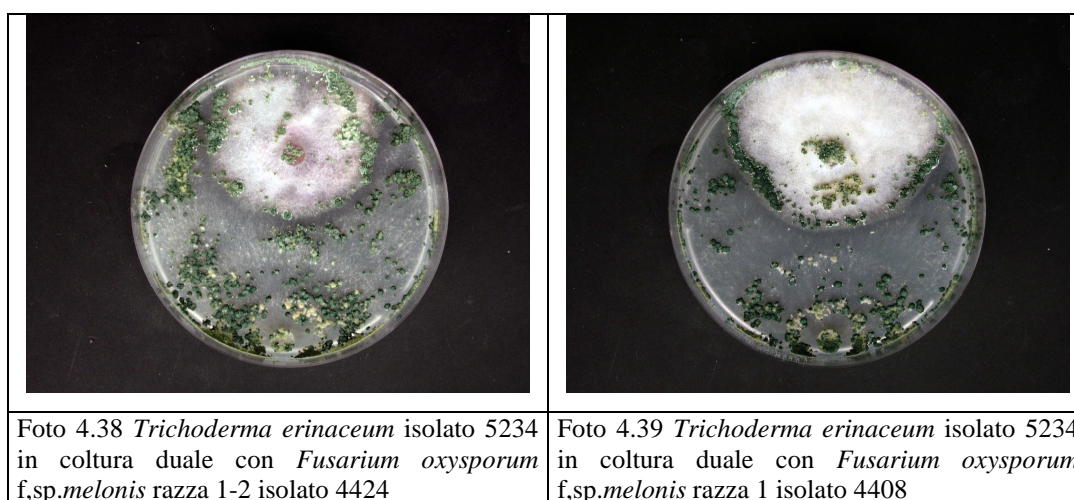


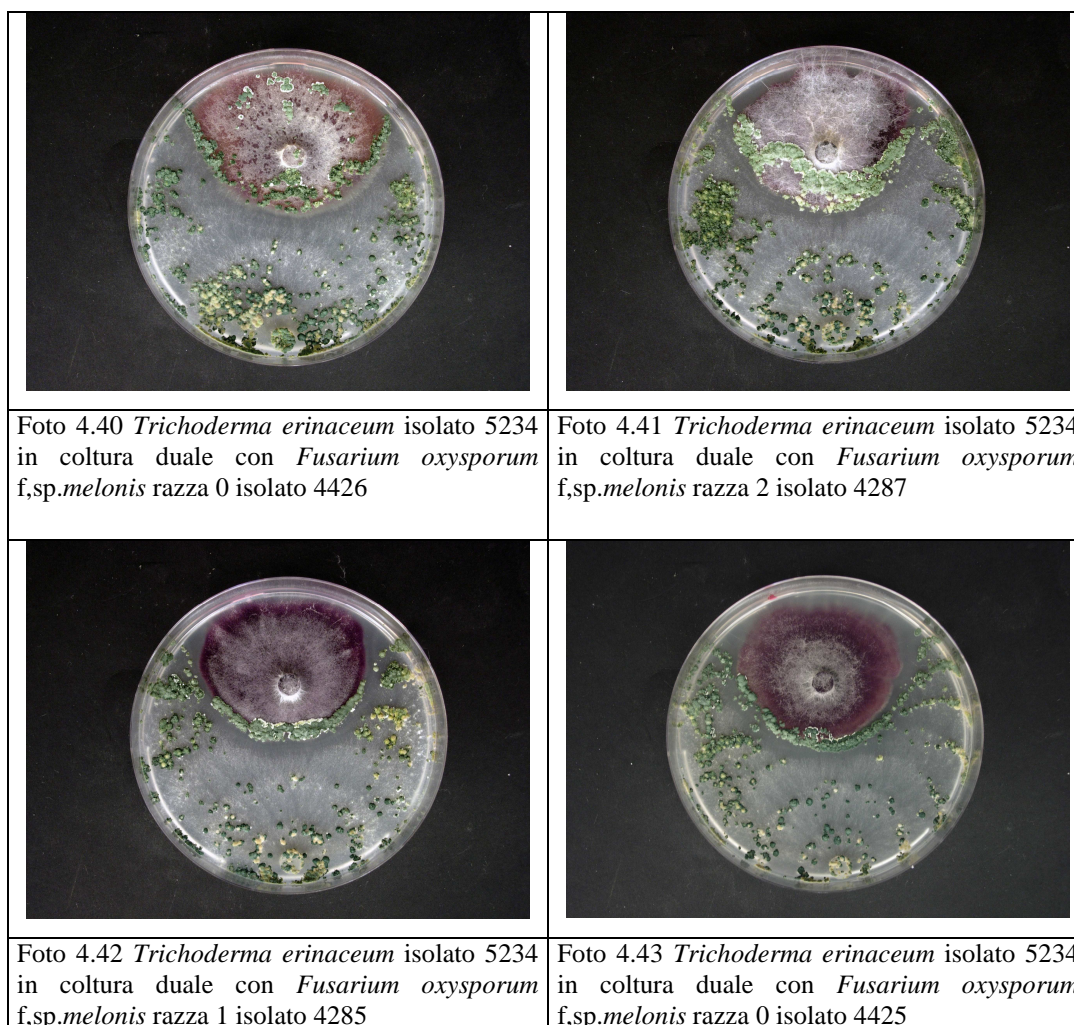




***Trichoderma erinaceum* isolato 5234 vs *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis***

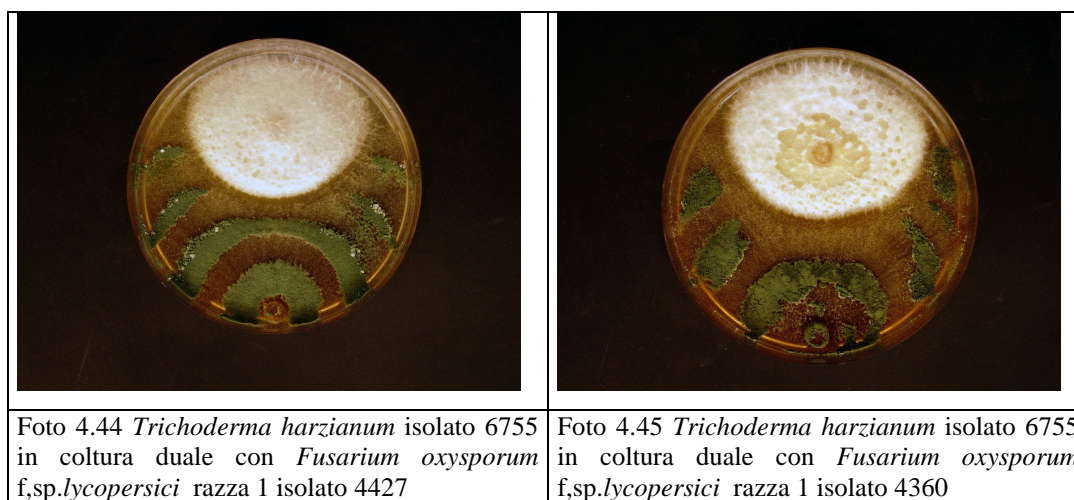
L'isolato di *Trichoderma erinaceum* sovracresce differenziando fruttificazioni sopra le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* razza 1-2 isolato 4424, di *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* razza 1 isolato 4408, di *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* razza 0 isolato 4426, di *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* razza 2 isolato 4287. Nelle colture duali con *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* razza 1 isolato 4285 e con *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* razza 0 isolato 4425 non si nota una sovraccrescita ne da parte della colonia dell'antagonista ne da parte della colonia dei patogeni ( foto da 4.38 a 4.43 )



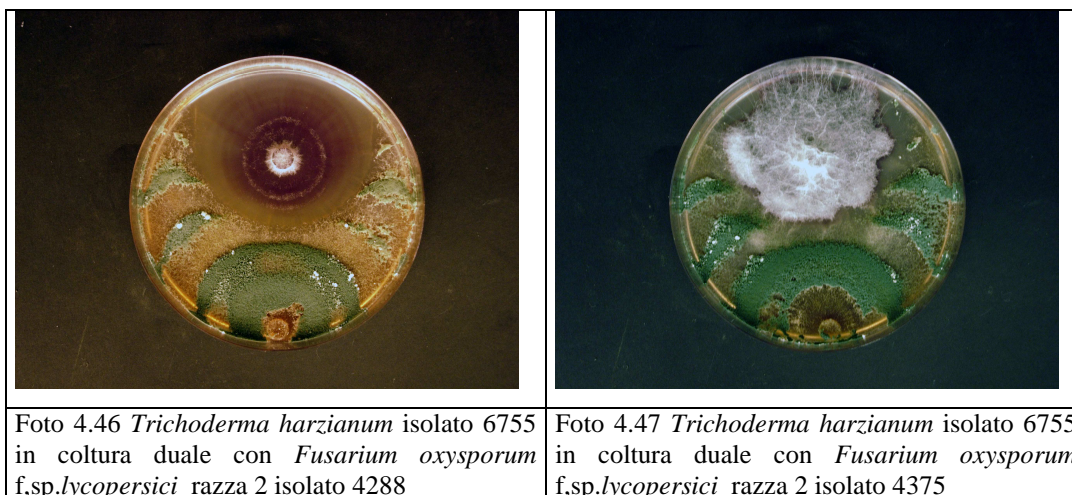


***Trichoderma harzianum* isolato 6755 vs *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici***

Le colonie dell'isolato di *Trichoderma harzianum* non sovracrescono su quelle degli isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (foto da 4.44 a 4.47 ).

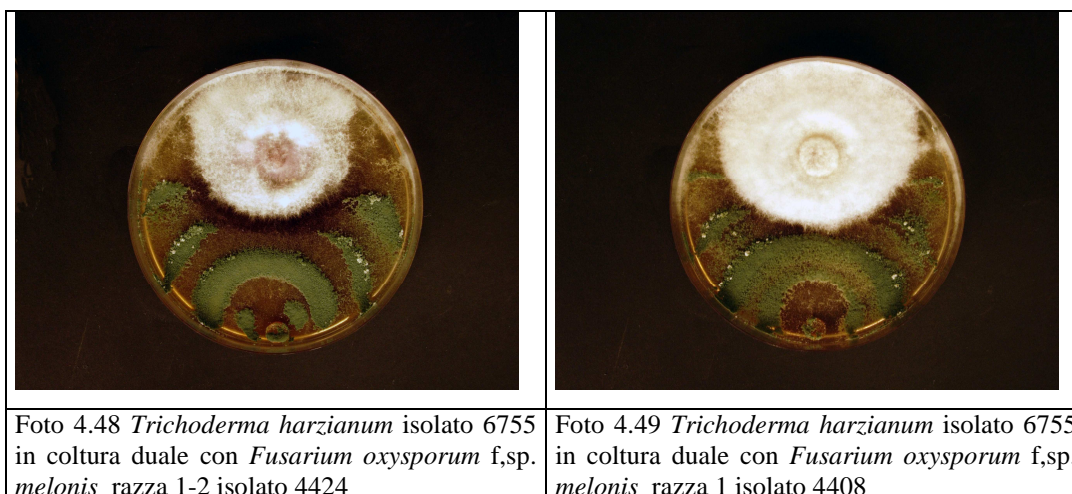


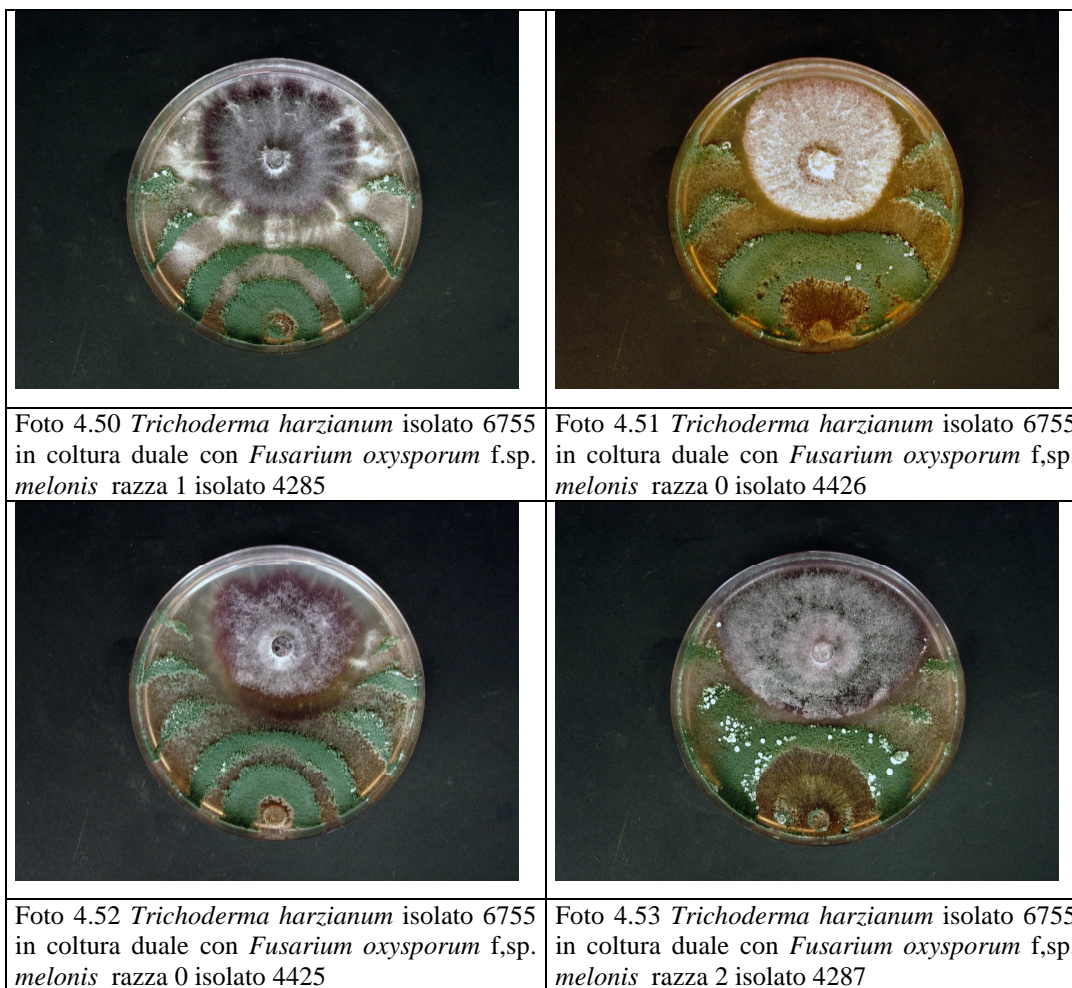




***Trichoderma harzianum* isolato 6755 vs *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis***

Le colonie dell'isolato di *Trichoderma harzianum* non sovracrescono su quelle degli isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Al contrario le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4285 sovracrescono in modo evidente su quelle dell'antagonista (foto da 4.48 a 4.53 ).

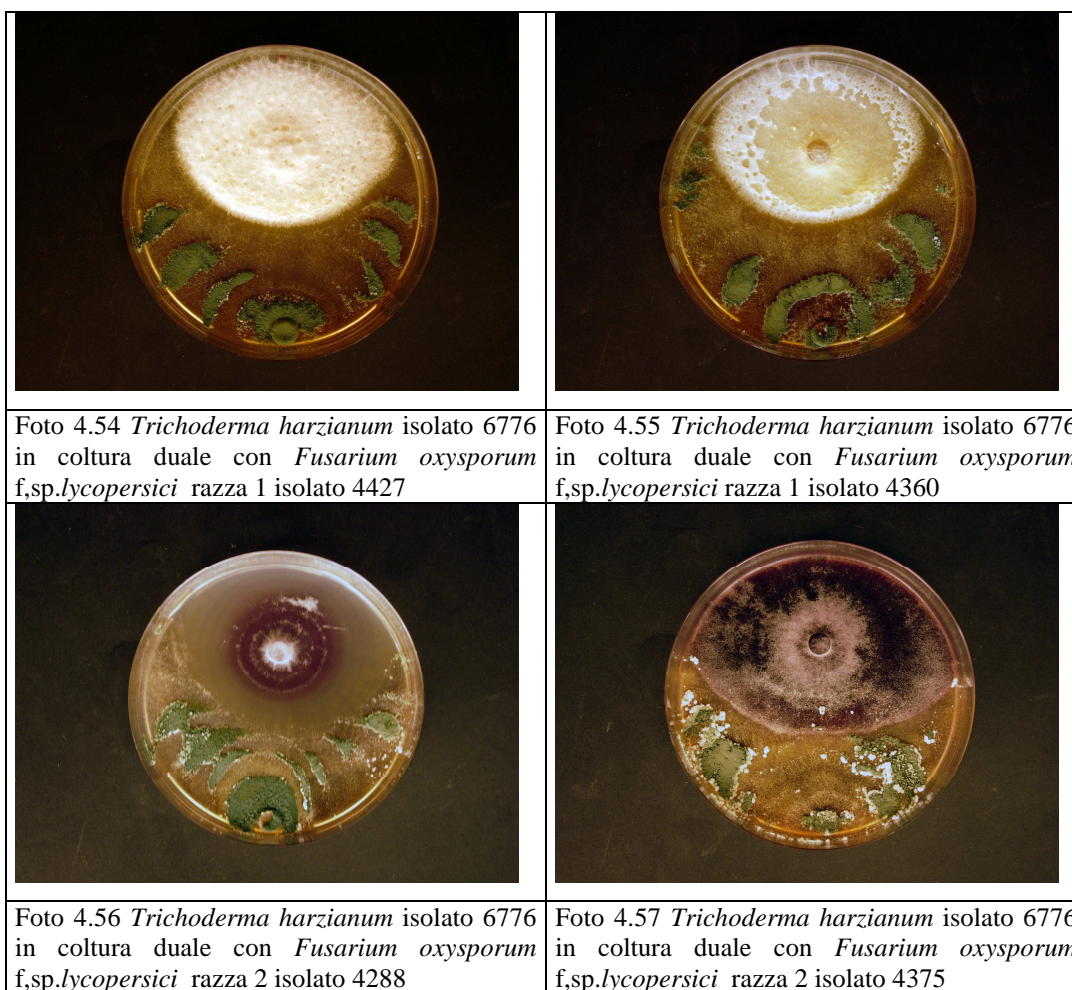




***Trichoderma harzianum* isolato 6776 vs *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***







Le colonie dell'isolato di *Trichoderma harzianum* non sovracrescono su quelle degli isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* razza 2 isolato 4288 e isolato 4375 sembrano prendere il sopravvento sull'antagonista colonizzando gran parte della piastra ( foto da 4.54 a 4.57).





***Trichoderma harzianum* isolato 6776 vs *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis***

Le colonie dell'isolato di *Trichoderma harzianum* non sovracrescono su quelle degli isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Le colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razza 1 isolato 4285 sovracrescono su quelle dell'antagonista (foto da 4.58 a 4.63) .

	
<p>Foto 4.58 <i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776 in coltura duale con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> razza 1-2 isolato 4424</p>	<p>Foto 4.59 <i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776 in coltura duale con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> razza 1 isolato 4408</p>
	
<p>Foto 4.60 <i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776 in coltura duale con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> razza 1 isolato 4285</p>	<p>Foto 4.61 <i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776 in coltura duale con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> razza 0 isolato 4426</p>
	
<p>Foto 4.62 <i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776 in coltura duale con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> razza 0 isolato 4425</p>	<p>Foto 4.63 <i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776 in coltura duale con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> razza 2 isolato 4287</p>

### Produzione di coilings.

Per indagare ulteriormente sull'attività micoparassitaria dei 4 isolati di *Trichoderma* spp in esame è stata allestita questa prova come descritto nel paragrafo 3.3.



Le osservazioni effettuate con il microscopio ottico composto sui vetrini montati con porzioni di cellophan, prelevati dalla zona di contatto tra gli antagonisti e i patogeni, sono state volte all'identificazione di avvolgimenti ifali (coilings), lacci e appressori. *Trichoderma harzianum* isolato 6755 ha prodotto coilings attorno alle ife di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolato 4424, in questo caso sono stati osservati anche gli appressori (Foto 4.63, 4.64,4.65).

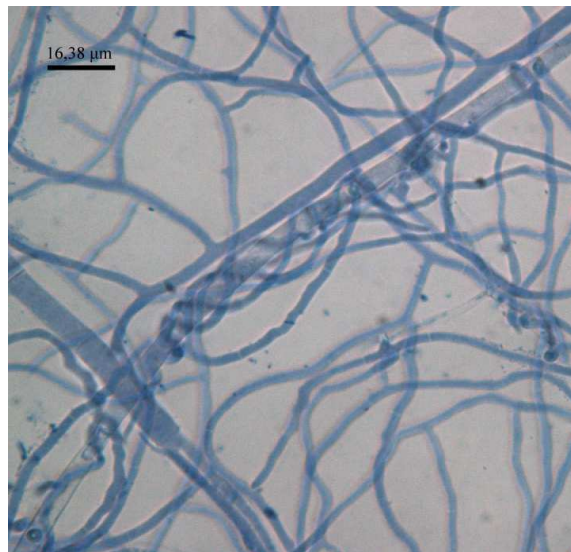


Foto 4.63 Formazione di avvolgimenti ifali da parte di *Trichoderma harzianum* isolato 6755 nei confronti di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolato 4424

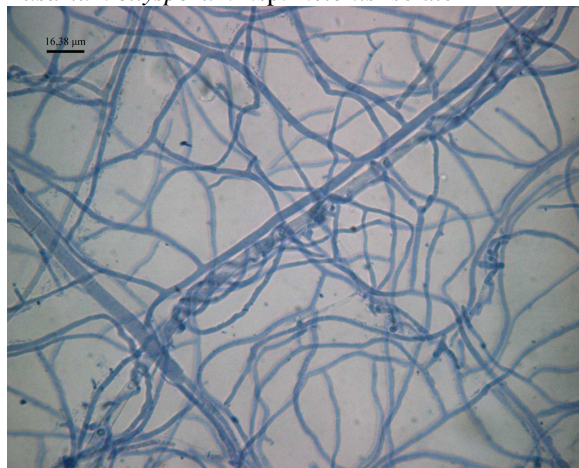


Foto 4.64 Formazione di avvolgimenti ifali da parte di *Trichoderma harzianum* isolato 6755 nei confronti di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolato 4424



Foto 4.65 Formazione di appressori da parte di *Trichoderma harzianum* isolato 6755 sulle ife di *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolato 4424

Nel confronto *Trichoderma harzianum* isolato 6776, con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* isolato 4360, si è notato solo la formazione di corte ramificazioni ifali (lacci) da parte dell'antagonista (Foto 4.66).

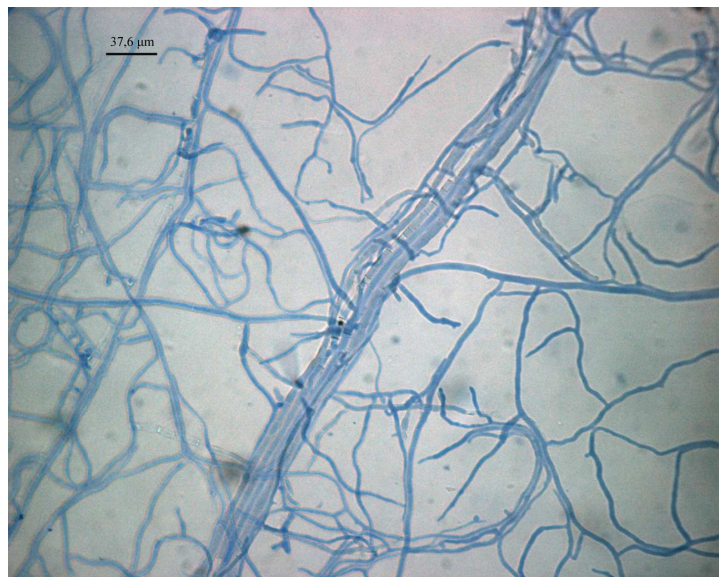


Foto 4.67 Formazione di lacci da parte di *Trichoderma harzianum* isolato 6776 sulle ife di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* isolato 4360

Per quanto riguarda *Trichoderma koningii* isolato 2046 e *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 non sono stati osservati né avvolgimenti ifali nè lacci verso entrambi i patogeni in esame.

## 5 Discussione

Diversi isolati di *Trichoderma* spp sono simbionti opportunisti ed avirulenti su una grande varietà di piante coltivate (Harman *et al.*, 2004), questi infatti, colonizzano la pianta senza risultare patogeni in quanto probabilmente l'invasione e la colonizzazione delle radici induce nella pianta una serie di cambiamenti metabolici volti a bloccare e prevenire l'ingresso del fungo, confinandolo nei primi strati delle cellule corticali (Elad e Kapat, 1999). Nell'interazione con i tessuti radicali, non solo il fungo prolifera utilizzando risorse nutrizionali fornite dalla pianta ma, come conseguenza dell'associazione con le radici, è anche favorito nella colonizzazione di nuove ed estese aree nel suolo. Alcuni ceppi mostrano una forte "competenza per la rizosfera" che permette loro di colonizzare una vasta superficie radicale e di persistere sulle radici per diverse settimane o addirittura mesi (Thrane e Gensen, 1997). Questa capacità permette quindi al fungo di formare una stabile e duratura associazione con la pianta in svariate condizioni ambientali. Perciò, nonostante *Trichoderma* abbia la capacità intrinseca di attaccare le piante, è solitamente avirulento, avendo sviluppato una relazione con le piante di tipo simbiotica più che parassitaria (Harman *et al.*, 2004).

Gli effetti benefici per la pianta, derivanti da *Trichoderma* sono:

- il controllo di diverse malattie grazie all'azione diretta di *Trichoderma* spp. nei confronti di vari organismi patogeni e agenti nocivi della microflora del suolo (Chet, 1987);
- il controllo indiretto di agenti patogeni a seguito dell'induzione di resistenza sistemica in pianta; tale fenomeno favorisce il controllo di varie classi di patogeni (funghi e batteri) spazialmente e temporalmente distanti dal punto di applicazione di *Trichoderma*; (Bigirimana *et al.*, 1987; Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2003);
- il miglioramento della crescita della pianta e lo sviluppo dell'apparato radicale. Il verificarsi di quest'ultimo fenomeno in un sistema gnotobiotico ( Yedidia *et al.*, 2001) ha dato credito all'ipotesi che esso è il risultato di un effetto diretto esercitato da *Trichoderma* sulla pianta, oltre ad essere una conseguenza del controllo di microrganismi patogeni minori e dell'inattivazione di composti tossici presenti nella rizosfera. Negli ultimi anni sono stati proposti vari meccanismi potenzialmente coinvolti in questo fenomeno, quali ad esempio: la produzione o il controllo degli ormoni vegetali

(Kleifeld and Chet, 1992), la solubilizzazione di nutrienti normalmente insolubili nel suolo (Altomare *et al.*, 1999) ed un aumento dell'assorbimento e della traslocazione di minerali normalmente poco disponibili per la pianta (Inbar *et al.*, 1994).

Lo scopo del seguente lavoro è stato quello di saggiare 13 isolati di *Trichoderma* spp. per valutarne sia la capacità di controllo della tracheofusariosi del pomodoro e del melone, sia l'attività di promozione di crescita esercitata su queste due specie vegetali.

### 5.1 Controllo della malattia

Dai risultati della prova in vivo *Trichoderma harzianum* isolato 6755 e isolato 6776, *Trichoderma koningii* isolato 2046, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 avrebbero contenuto la Tracheofusariosi del pomodoro, differenziandosi statisticamente dal controllo non trattato e dalla tesi trattata con *Trichoderma fasciculatum* isolato 6421 (per cui si sono registrati percentuali di infezione del 100%) con una significatività inferiore allo 0,01 utilizzando il procedimento LSD di Fisher. Nessun isolato è stato in grado di controllare la tracheofusariosi del melone. Numerose ricerche hanno evidenziato il fatto, che molti isolati sembrano essere capaci di esplicare un efficace controllo di specifici patogeni. Ciò non sarebbe dovuto solo alle caratteristiche ecologiche del patogeno e dell'antagonista, ma anche alla patogeno-specificità degli antibiotici (Howell e Stipanovic 1995) e dei CWDEs (Haran *et al.* 1996) prodotti da quest'ultimo. Per allargare il range dei patogeni controllati con un biofitofarmaco a base di *Trichoderma* spp è stato proposto di miscelare diversi isolati nella formulazione (Cook 1993, Duffy *et al.* 1996). Tuttavia l'isolato 1295-22 di *Trichoderma harzianum* ottenuto per fusione di protoplasmi riesce a contenere le malattie di diversi patogeni come : *Phythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp, *Sclerotium rolfsii* e *Botrytis cinerea* (Harman 1990).

Nella sezione *Pachybasium* (clade B) del genere *Trichoderma* viene classificata la specie aggregata *Trichoderma harzianum* (Teleomorfo *Hypocrea lixii*), che include una gran parte degli isolati utilizzati con successo come BCAs (Biological control agent) di funghi fitopatogeni (Grondona *et al.* 1997, Druzhinina e Kubicek 2004). Nella tabella 5.1 sono riportati alcuni biofitofarmaci in commercio che hanno come ingrediente attivo *T.harzianum* .

Tabella 5.1 biofitofarmaci a base di *T.harzianum*

Nome commerciale del prodotto	Ingrediente attivo	Patogeno bersaglio	Campo di applicazione
Plant Shield™ e Root Shield™ (USA)	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22 e <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	<i>Fusarium</i> spp. , <i>Pythium</i> spp, <i>Rhizoctonia</i> spp. , <i>Sclerotinia</i> spp , <i>Thievalopsis</i> spp, <i>Myrothecium</i> spp , <i>Cylindrocladium</i> spp, <i>Botrytis</i> spp	Cavolo, cetriolo, pomodoro, ornamentali, alberi
Promote™ e Promote Plus™ (Canada)	<i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Trichoderma viride</i>	<i>Fusarium</i> spp. , <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i>	Colture in serra
Root Pro™ (Israele)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Fusarium</i> spp. , <i>Pythium</i> spp. , <i>Rhizoctonia</i> spp, <i>Sclerotinia</i> spp. ,	Colture ortive
T-22™ (USA)	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	<i>Fusarium</i> spp. , <i>Pythium</i> spp. , <i>Rhizoctonia</i> spp, <i>Sclerotinia</i> spp.	Ornamentali, colture ortive
Tri 022/003™ (Olanda)	<i>Trichoderma harzianum</i>	Vari batteri e funghi	Rosa, Begonia, Crisantemo, Rododendro cetriolo e pomodoro
Trichodex™ (Israele)	<i>Trichoderma harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monila laxa</i> , <i>Pseudoperonospora</i> spp	Cetriolo ,fragole, soia, pomodoro girasole.
Trichopel™ (Nuova Zelanda)	<i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Trichoderma viride</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phythium</i>	Ortive in serra, ornamentali in serra.

*Trichoderma harzianum* T35 controlla il patogeno *Fusarium oxysporum* anche competendo per la colonizzazione e per i nutrienti della rizosfera, l'azione di controllo esercitata da questo isolato diventerebbe più efficace al decrescere della concentrazione dei nutrienti nell'ambiente (Tjamos *et al* 1992). Molti isolati di *Trichoderma* hanno, rispetto a molti altri microrganismi, una maggior capacità mobilizzare e assorbire i nutrienti del suolo. L'efficiente utilizzo dei nutrienti disponibili è basato sulla produzione di ATP dal metabolismo di differenti zuccheri, ovvero quelli che derivano dai polimeri comunemente presenti negli ambienti fungini come, cellulosa, chitina e glucani da cui per degradazione si ottiene glucosio (Chet *et al.* 1997). L'assimiliazione del glucosio avviene grazie ad enzimi e permeasi insieme a proteine coinvolte nella modificazione della membrana cellulare e della parete cellulare, l'efficienza del trasporto del glucosio risulterebbe essere cruciale per la competizione (Del Gado-Jaranna *et al.* 2003), ciò è supportato dall'isolamento dal

ceppo CECT 24132 di *Trichoderma harzianum* di un trasportatore ad alta affinità del glucosio il Gtt1. La sintesi di questo trasportatore sarebbe attivata quando le concentrazioni di glucosio sono molto basse, cioè quando il trasporto del glucosio diventa un fattore chiave per la competizione dei nutrienti. La capacità degli isolati di trichoderma di proteggere le piante dai fitopatogeni è stata per lungo tempo attribuita esclusivamente all'effetto antagonista esercitato verso il patogeno (Chet *et al.*, 1997), tuttavia recenti studi hanno posto in evidenza che molti isolati di *Trichoderma* stimolano meccanismi di difesa delle piante, proteggendole indirettamente da numerosi patogeni, con meccanismi di induzione di resistenza che coinvolgono processi fisiologici simili, alla risposta ipersensibile (HR), alla resistenza sistemica acquisita (SAR) e la resistenza sistemica indotta (ISR), che erano già stati scoperti nelle piante. Bigirimania *et al.* (1997) hanno dimostrato che l'inoculazione nel terreno di *Trichoderma harzianum* isolato T-39 rende le foglie di piante di fagiolo resistenti alle fitopatie causate *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum lindemuthianum*, nonostante la presenza dell'antagonista fosse limitata all'apparato radicale, lo stesso gruppo di ricerca ha esteso poi le proprie indagini ad altre dicotiledoni (De meyer *et al.*, 1998). Recentemente studi simili sono stati condotti anche su monocotiledoni, *Trichoderma harzianum* T-22 induce resistenza sistemica nel mais a *Colletotrichum graminicola* (Harman 2004). È molto più difficoltoso esaminare il ruolo degli antagonisti nell'induzione resistenza verso i patogeni dell'apparato radicale e del seme, infatti la vicinanza del patogeno e dell'antagonista, non permetterebbero di escludere meccanismi d'azione riconducibili alla competizione, all'antibiosi e al micoparassitismo. Howell *et al.* (2000) hanno ottenuto ceppi mutanti di un isolato di *Trichoderma virens* che differivano per le capacità micoparassitarie e per la produzione di antibiotici. Mutanti e ceppi selvatici sono stati saggiati per valutare l'efficienza nel controllare il patogeno *Rhizoctonia solani* in piante di cotone, i risultati di questa ricerca hanno indicato che né la produzione di antibiotici, né il micoparassitismo erano strettamente correlati al biocontrollo, tuttavia il contenimento della malattia era strettamente correlato con la capacità, dei diversi isolati, di stimolare nelle giovani piante la produzione di composti di difesa come terpenoidi e fitoalessine.



### 5.2 Promozione della crescita

L'attività di promozione di crescita da parte degli isolati da noi saggiati è stata riscontrata solo nelle piante di pomodoro. Gli isolati *Trichoderma viride* 8209, *Trichoderma erinaceum* 5234 e *Trichoderma asperellum* 4603 hanno fatto riscontrare valori del primo accrescimento in altezza statisticamente superiori al controllo utilizzando il metodo dei confronti multipli "post hoc" Fischer LSD con un livello di significatività dello 0,01. I medesimi risultati si sono ottenuti con il procedimento Tukey HSD ad un livello di significatività dello 0,05.

La promozione di crescita delle piante indotta da alcuni microrganismi tellurici è stata spiegata principalmente con due meccanismi. La prima ipotesi che è stata avanzata attribuisce l'aumento di crescita al controllo biologico che alcuni microrganismi benefici attuerebbero nei confronti di altri microrganismi indicati come patogeni minori, l'altra (più recente) è che questi agenti microbici abbiano un ruolo più diretto, producendo metaboliti con azione regolatrice sulla crescita delle piante e rendendo disponibili per l'assorbimento radicale della pianta elementi scarsamente solubili. Tra le prime pubblicazioni volte ad accreditare la seconda ipotesi c'è quello di Lindsey e Baker (1967), nel quale i due autori dimostrarono che in un sistema gnotobiotico piante di pomodoro allevate in presenza di *T.viride* avevano un'altezza superiore a quelle di controllo, sebbene non si riscontrasse alcuna differenza tra i pesi secchi dell'apparato radicale e di quello epigeo.

Questi risultati sono molto simili a quelli che si sono ottenuti nella prova di promozione di crescita in vivo, con l'importante differenza che la prova non è stata eseguita in condizioni gnotobiotiche.

Chet e collaboratori (1997) in esperimenti condotti in serra hanno osservato incrementi di germinazione, di sviluppo e di peso secco nelle piante ottenute da semi precedentemente trattati con sospensione di spore di *Trichoderma* Benitez *et al.* (1998) hanno ottenuto un aumento della germinazione e un incremento di sviluppo in plantule i cui semi sono stati separati da *Trichoderma* con una membrana di cellophane, ne hanno dedotto che l'isolato di *Trichoderma* in questione produce un fattore di crescita che però non è stato isolato. Ci sono pochi lavori sulla produzione da parte di isolati di *Trichoderma* spp. di sostanze regolatrici di crescita identificate in laboratorio, nonostante siano stati identificati molti funghi filamentosi e le loro

relative vie metaboliche per la produzione di acido indol acetico (IAA) e di etilene (Arora *et al.*, 1992). Osiewacz (2002) ha identificato isolati di *Trichoderma* che producono molecole simili alle citochinine (zeatina) , alle gibberelline (GA3). La produzione di quest'ultima sostanza, potrebbe fornire una plausibile spiegazione alla non corrispondenza tra i maggiori accrescimenti in altezza registrati e i relativi pesi secchi degli apparati epigei. Tuttavia occorrono ulteriori indagini, per appurare che gli isolati di *Trichoderma* nel terreno producano queste sostanze in quantità sufficiente da sortire effetti sulle piante. Molti dei composti prodotti da isolati di *Trichoderma* spp. hanno vari gradi di attività sia antifungina che erbicida, ciò ha naturalmente implicazioni sul loro uso nel controllo biologico. La gliotossina e la viridina sono rispettivamente una epiditiodichetopiperazina e uno sterolo, queste sostanze inibiscono la germinazione e la crescita radicale di piante di *Brassica alba* alla concentrazione di 1 ppm, le stesse sostanze alla medesima concentrazione non hanno avuto alcun effetto inibitorio sulla crescita delle radici di Trifoglio rosso e grano, ciò a dimostrazione della differenza tra le diverse specie vegetali nella tolleranza a questi composti. (Wright 1951). Per le tesi inoculate con *T.minutisporum* isolato 4839, *T.erinaceum* isolato 5234 e *T.viride* isolato 8209 nella prova di promozione di crescita del pomodoro in vivo si sono riscontrati pesi secchi dell'apparato radicale statisticamente inferiori al controllo utilizzando il procedimento Fisher LSD con un livello di significatività dello 0,01. La tossicità della gliotossina sarebbe dovuta ad una inibizione nelle piante dell'enzima acetolattato-sintasi, questo enzima sarebbe coinvolto nella biosintesi degli aminoacidi ramificati (Haraguchi *et al.* 1996). Molti isolati di *Trichoderma* spp producono anche viridiolo un diidroderivato della viridina, che ha un attività antibiotica molto bassa ma una elevata attività fitotossica (Howel e Stipanovic 1984), questa sostanza provocherebbe la riduzione dell'emergenza delle plantule e la riduzione del peso secco dei germogli e delle radici. La produzione di metabolici fitotossici potrebbe essere una spiegazione plausibile al ritardo di germinazione dei semi trattati con alginato inoculato con *T.erinaceum* isolato 5234 osservato *in vitro*, tuttavia si dovrebbe accertare che tale fenomeno possa verificarsi anche nel terreno.

### Rizosfera competenza ed endofitismo

Questa prova è stata eseguita seminando semi di pomodoro impelletati con una soluzione di alginato di sodio inoculata con una sospensione acquosa di conidi degli isolati di *Trichoderma* spp. (*Trichoderma harzianum* isolato 6755 e isolato 6776, *Trichoderma koningii* isolato 2046, *Trichoderma erinaceum* isolato 5234) in terreno sterilizzato. Per questa prova sono state allestite due tesi di controllo, seme naturale e seme con solo alginato di sodio. I rilievi condotti sulle piastre di P190 della quarta replica contenenti la sospensione acquosa ottenuta dalla rizosfera, hanno evidenziato la presenza di colonie di *Trichoderma* sia nella tesi seme naturale sia nella tesi seme più alginato. Evidentemente deve essersi verificata una contaminazione accidentale. L'aspetto morfologico delle colonie allevate su P190 non ci consente di distinguere i 2 isolati di *T.harzianum*, ma si possono notare differenze tra le diverse specie degli isolati utilizzati (*T.koningii*, *T.erinaceum*, *T.harzianum*). Tuttavia non è stato possibile individuare differenze tra le colonie di *Trichoderma* sviluppatesi da piastre di P190, contenenti la sospensione acquosa della rizosfera, a causa della presenza di numerose colonie di batteri e altri funghi (ricolonizzatori del terreno sterilizzato), che ostacolando la crescita ne hanno confuso la morfologia macroscopica.

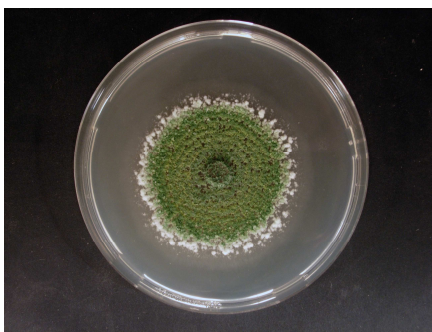


Foto 5.1 Aspetto morfologico della colonia di *T.koningii* isolato 2046 su P190

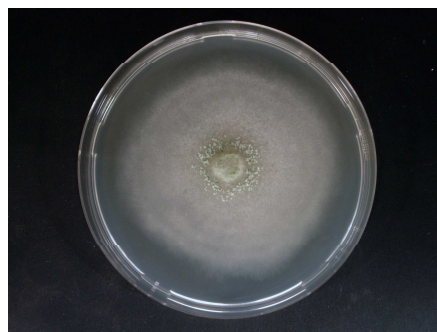


Foto 5.2 Aspetto morfologico della colonia di *T.erinaceum* isolato 5234 su P190

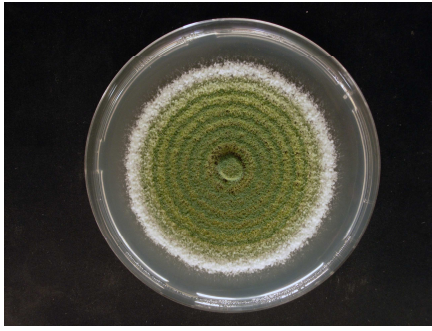


Foto 5.3 Aspetto morfologico della colonia di *T.harzianum* isolato 6755 su P190

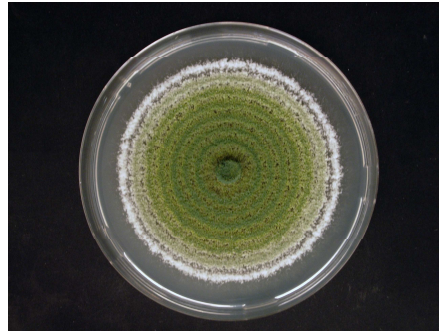


Foto 5.4 Aspetto morfologico della colonia di *T.harzianum* isolato 6776 su P190

I rilievi condotti sulle piastre di P190 della terza replica, contenenti porzioni dell'apparato radicale, sottoposto a sterilizzazione esterna, hanno evidenziato la presenza di colonie *Trichoderma* nella tesi trattata con solo alginato di sodio. La morfologia macroscopica delle colonie sviluppatesi era riconducibile a quella di *T.harzianum*, pertanto i risultati di questa replica non sono stati presi in considerazione. Dall'analisi della varianza effettuata sui valori ottenuti dalla prova di endofitismo è emerso che *T.harzianum* isolato 6755 e 6776 e *T.koningii* isolato 2046 differiscono statisticamente dal controllo, a causa della contaminazione accidentale si tende ad attribuire la capacità endofitica al solo *T.koningii* isolato 2046, tuttavia occorrerebbero ulteriori indagini per valutare la capacità endofitica di questo isolato, corredate dalle osservazioni istologiche dell'apparato radicale al microscopio composto.

Molti isolati di *Trichoderma* spp. possiedono la capacità di colonizzare gli strati di cellule più esterni dell'apparato radicale, mostrando caratteristiche morfologiche simili a quelle osservate durante i fenomeni di micoparassitismo. (Yedidia *et al.* 1999) Infatti in un sistema idroponico modificato *Trichoderma asperellum* isolato T-203 è stato aggiunto alle radici di cocomero dove il fungo ha iniziato a differenziare strutture simili ad apressori e avvolgimenti ifali sulla superficie del capillizio radicale, osservati al microscopio elettronico a scansione. *T.asperellum* T-203 successivamente ha iniziato a colonizzare le cellule corticali della radice, rimanendo confinato negli strati cellulari più esterni. La pianta ha reagito alla penetrazione del fungo con apposizioni di parete e produzione di composti fenolici, che hanno confinato le ife fungine nello spazio intercellulare. ( Yedidia *et al.* 2003). Evans *et al.* (2003) hanno descritto un isolato endofitico di *Trichoderma stromaticum* che

colonizza l'apparato vascolare di piante di cacao. L'invasione delle cellule esterne della radice da parte di isolati di *Trichoderma* spp. può portare a fenomeni di induzione di resistenza sistemica ( Yedidia *et al.* 2003), e un isolato che colonizza l'apparato vascolare potrebbe essere anche più efficiente (Harman *et al.* 2004). Molti lavori hanno mostrato che la colonizzazione del tessuto radicale da parte degli isolati di *Trichoderma* spp. induce nell'ospite l'aumento dei livelli di enzimi collegati alla difesa come: perossidasi, chitinasi,  $\beta$ -1,3-glucanasi, idroperossido liasi, e fenilalanin-ammonio liasi (PAL) (Yedidia *et al.*, 1999,2003; Howell *et al.* 2000)

### Prova di antagonismo in vitro e micoparassitismo

Nella tabella 5.2 è riportato il quadro riassuntivo dell'inibizione di accrescimento esercitata dai 4 isolati di *Trichoderma* spp. testati nei confronti di vari isolati di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *melonis*.

Tabella 5.2 Quadro riassuntivo dell'inibizione di crescita degli isolati di *Fusarium oxysporum* testati ottenuto dai risultati dalle colture duali. Con il segno + sono indicati i casi in cui si è riscontrata una inibizione dell'accrescimento del patogeno, con il segno - quelli in cui non è stata osservata alcuna inibizione

Specie e forma speciale	Razza fisiologica	N° isolato	<i>Trichoderma koningii</i> isolato 2046	<i>Trichoderma erinaceum</i> isolato 5234	<i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6755	<i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	R1	4360	+	+	-	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	R1	4427	-	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	R2	4288	+	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	R2	4375	+	-	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R1-2	4424	-	-	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R1	4408	+	+	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R1	4285	+	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R0	4425	+	+	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R0	4426	+	+	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R2	4287	+	+	+	+

I 4 isolati di *Trichoderma* spp. testati per quanto riguarda l'inibizione di crescita esercitata nei confronti dei ceppi di *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* hanno manifestato un comportamento che appare isolato specifico. *Trichoderma koningii* isolato 2046 e *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 hanno manifestato un'inibizione nei confronti di tutti gli isolati delle razze fisiologiche 0, 1 e 2 di *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* in esame ma non nei confronti della unico isolato di razza 1-2. *Trichoderma harzianum* isolato 6755 ha manifestato un'inibizione nei confronti di tutti i patogeni testati, ad eccezione del *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* razza 1 isolato 4360. *Trichoderma harzianum* isolato 6776 ha manifestato nei confronti dei diversi ceppi delle due *formae speciales* un comportamento isolato specifico. Tuttavia è doveroso notare che nella maggioranza dei casi non si è assistito ad una inibizione a distanza, infatti la diminuzione degli accrescimenti dei patogeni è avvenuta nei rilievi finali ovvero prima che le colonie entrassero in contatto.

Nella tabella 5.3 è riportato il quadro riassuntivo dei rilievi condotti sulle colture duali dopo l'incontro tra le colonie dei patogeni e degli antagonisti.

Tabella 5.3 Quadro riassuntivo delle osservazioni condotte sulle colture duali dopo l'incontro tra le colonie del patogeno e dell'antagonista, con il segno + sono indicati i casi in cui si è riscontrata una sovraccrescita dell'antagonista sul patogeno, con il segno - sono indicati i casi in cui l'antagonista non è sovraccresciuto

Specie e <i>forma speciale</i>	Razza fisiologica	N° isolato	<i>Trichoderma koningii</i> isolato 2046	<i>Trichoderma erinaceum</i> isolato 5234	<i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6755	<i>Trichoderma harzianum</i> isolato 6776
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i>	R1	4360	+	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i>	R1	4427	+	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i>	R2	4288	+	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i>	R2	4375	+	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R1-2	4424	+	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R1	4408	+	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R1	4285	+	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R0	4425	+	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R0	4426	+	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	R2	4287	+	+	-	-

*Trichoderma koningii* isolato 2046 è riuscito a crescere e produrre fruttificazioni agamiche su tutte le colonie degli isolati dei patogeni testati, anche quelli di cui non ha inibito l'accrescimento. *Trichoderma erinaceum* isolato 5234 ha manifestato un comportamento intermedio non riuscendo a sovraccrescere sulle colonie di *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* razza 1 isolato 4285 e *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* razza 0 isolato 4425. *Trichoderma harzianum* isolato 6776 e isolato 6755 (che aveva inibito l'accrescimento di quasi tutti gli isolati dei patogeni testati) , non ha manifestato la capacità di sovraccrescere le colonie dei patogeni. Tuttavia sarebbe interessante effettuare altre indagini sui quattro isolati di *Trichoderma* spp. volte ad individuare la produzione di eventuali VOCs . Molti isolati di *Trichoderma* producono composti diffusibili a basso peso molecolare o antibiotici che inibiscono la crescita degli altri microrganismi. In qualche caso la produzione di questi composti è correlata con l'attività di biocontrollo e l'antibiotico purificato riproduce l'effetto dell'isolato antagonista, comunque ci sono anche esempi di ceppi in cui è stata indotta una mutazione per l'iperproduzione di antibiotici, che garantiscono un controllo in vivo dei patogeni simile a quello dei ceppi selvatici non trasformati (Chet *et al.* 1997). Il 6-pentyl- $\alpha$ -pirone e l'acido harzianico sono tra i principali antibiotici isolati da *Trichoderma harzianum* ed hanno un ruolo fondamentale nel controllo di *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Vey *et al.* 2001).

Song *et al.* (2006) hanno isolato tre metaboliti (Trichokonine) da *Trichoderma koningii* isolato SMF2 che hanno un effetto antimicrobico su una vasta gamma di patogeni. In questo studio tre diverse Trichokinine isolate da *T. Koningii* SMF2 hanno inibito in vitro la crescita di batteri gram positivi, lieviti e funghi fitopatogeni come *Fusarium oxysporum* , *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Verticillium dahlie*. LeTrichokonine, sono dei peptidi ad attività antibiotica la cui sintesi non è di origine ribosomiale (*Peptaibols*).Questi sono caratterizzati dalla presenza di un aminoacido particolare l'acido  $\alpha$ -aminoisobutirico (Aib) e agli estremi della catena aminoacidica presentano un aminoacido idrossilato (parte C-terminale) e un aminoacido acetilato (parte N-terminale). Sono prodotti da funghi e batteri che li sintetizzano tramite una peptido-sintetasi non ribosomiale NRPSs. Questa proteina è costituita da moduli multipli che legano,attivano e condensano ogni specifico aminoacido (Marahiel *et al.* 1997). L'attività antimicrobica di queste sostanze sembra essere collegata

ad'interazioni con i fosfolipidi della membrana cellulare, in cui inducono la formazione di pori con conseguente perdita di soluti dal citoplasma.

Gli enzimi idrolitici e gli antibiotici agendo in sinergia permettono di raggiungere livelli di antagonismo e controllo della malattia più alti (Howell 1998, Monte 2001).

La prova di micoparassitismo *in vitro* ha permesso l'identificazione di strutture indicanti l'attività di parassitizzazione di *Trichoderma harzianum* isolato 6755 e isolato 6776 verso i le ife degli isolati di Fol e Fom utilizzati nella prova di controllo della malattia *in vivo*. Durante il processo di micoparassitismo, *Trichoderma* riconosce, entra in contatto e distrugge la parete cellulare del fungo ospite. La parete cellulare fungina è costituita (in ordine decrescente di abbondanza): da carboidrati (80-90%), proteine, lipidi, pigmenti e sali minerali. *Trichoderma* ha sviluppato un sistema antifungino basato essenzialmente su una vasta gamma di enzimi litici che vengono secreti all'esterno: endochitinasi,  $\beta$ -Nacetilglucosamminidasi, chitobiosidasi, proteasi,  $\beta$ -1,3-glucanasi,  $\beta$ -1,4-glucanasi,  $\beta$ - 1,6-glucanasi, lipasi, xilanasi, mannanasi, pectinasi, pectin liasi, amilasi, fosfolipasi, RNasi, DNasi ecc. (Lorito, 1998). I  $\beta$ -glucani sono polimeri lineari di D-glucosio uniti da legami  $\beta$ . La loro funzione è diversa e dipende dalla grandezza, struttura e proprietà chimico fisiche. I  $\beta$ -glucani sintetizzati dai funghi sono sia extracellulari che citoplasmatici: la maggior parte si localizza nella parete cellulare, formando polimeri strutturali che conferiscono rigidità e protezione alla parete. Gli enzimi che idrolizzano i  $\beta$ -glucani sono classificati in base al tipo di legame che scindono:  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6 e  $\beta$ -1,4-glucanasi o cellulasi che degradano l'omopolimero  $\beta$ -1,4-glucano. Le glucanasi sono distinte in eso e endo, le prime idrolizzano il polimero dall'estremità non riducente dando come prodotto finale monomeri, le seconde agiscono all'interno della molecola in più punti a caso, rilasciando oligosaccaridi solubili di varie dimensioni. La presenza delle  $\beta$ 1,3-glucanasi è stata descritta nei funghi, batteri, alghe, piante e animali. Nei batteri e nei funghi filamentosi sono enzimi esocellulari (Resee *et al.*, 1950), e in alcuni funghi sono anche associate alla parete cellulare. Le glucanasi dei funghi filamentosi svolgono principalmente tre funzioni: una funzione autolitica finalizzata alla liberazione delle spore in alcuni corpi fruttiferi dei basidiomiceti; una funzione morfogenetica nell'accrescimento e nel differenziamento e una funzione nutrizionale, rispettivamente nei funghi saprofiti e micoparassiti. L'evidenza che le glucanasi giochino un ruolo fondamentale nel micoparassitismo è dimostrata dagli studi di



Lorito e colleghi, (1994a), in cui una quantità di 90 µg/ml di una β-1,3-glucanasi purificata da *T.harzianum* produce un'inibizione del 50% sia della germinazione delle spore che dell'allungamento del tubetto germinativo dei conidi di *B. cinerea* e di molti altri funghi fitopatogeni. La chitina è un polimero non ramificato formato da unità di N-acetil-D-glucosamina (NAcGluc) unite da un legame β-1,4, dopo la cellulosa è il biopolimero più abbondante in natura, essendo presente nell'esoscheletro di molti invertebrati e nelle pareti cellulari della maggior parte dei funghi. Gli enzimi chitinolitici sono comunemente presenti nei protisti, batteri, funghi, piante, invertebrati e vertebrati (Lorito, 1997). Tutti gli enzimi capaci di catalizzare la degradazione della chitina attraverso l'idrolisi del legame β-1,4 dell'N-acetil-β-D-glucosamina sono definiti enzimi chitinolitici e sono suddivisi in tre gruppi, differenziati sulla base dell'attività e del prodotto di reazione. Le chitobiasi o β-1,4-N-acetilglucosaminidasi sono esochitinasi, scindono la chitina dall'estremità non riducente, rilasciando solo monomeri di N-acetilglucosamina. Le endochitinasi scindono la chitina e i chitoligomeri a caso, rilasciando una miscela di prodotti solubili di differente dimensione e basso peso molecolare. Una espressione aumentata delle endochitinasi genera ceppi più efficaci nel controllo biologico. Margolles-Clark e colleghi (1996) hanno utilizzato un promotore di un gene di *T. reesei* per ottenere trasformanti di *T. harzianum* che sovraesprimevano il gene dell'endochitinasi *ThEn-42*. I trasformanti ottenuti avevano una produzione di endochitinasi esocellulari 5 volte maggiore rispetto al ceppo selvatico, mentre l'attività chitinasica totale incrementava di 10 volte. Le chitobiosidasi o β-1,4-chitobiosidasi sono esochitinasi che, a partire dall'estremità non riducente della chitina e dei chitoligomeri, rilasciano dimeri di N-acetilglucosamina detti chitobiosi. Il sistema chitinolitico di *T. harzianum* è il più studiato tra i *Trichoderma* spp. (Lorito *et al.*, 1994b) e i suoi enzimi possono essere divisi in due gruppi. Al gruppo I appartengono gli enzimi di peso molecolare di circa 60-70 kDa o più grandi, tutti β-acetilesosaminidasi; il gruppo II comprende tutti gli enzimi con peso molecolare minore di 60 kDa, per la maggior parte tutte endochitinasi. Il secondo gruppo può essere suddiviso nei sottogruppi IIa (endochitinasi e chitobiosidasi di peso molecolare maggiore di 40 kDa CHIT52-40) e IIb (endochitinasi di peso molecolare minore di 40 kDa CHIT37-28) (Lorito, 1998). In *Trichoderma* spp., come in molti funghi filamentosi, le chitinasi possono svolgere diverse attività: una morfogenetica, mediante la lisi della chitina endogena e

l'accrescimento ifale e una nutrizionale, per l'ottenimento di zuccheri semplici e per penetrare i funghi parassitati (Gooday *et al.*, 1985). Il ceppo P1 di *T. atroviride* è tra i più studiati e usati con successo. Tra i suoi enzimi chitinolitici la CHIT42 è tra quelli più ampiamente studiati, avendo dimostrato di possedere una notevole attività antifungina (Harman *et al.*, 1993). Questo enzima è codificato dal gene *ech42* (*ThEn42*), presente in singola copia nel ceppo P1 (Hayes *et al.*, 1994) e di questo gene è stato caratterizzato anche il promotore (Lorito *et al.*, 1996). Le chitinasi di *T. harzianum* sono molto più efficaci di quelle prodotte da piante e batteri per quanto riguarda le capacità di inibire funghi fitopatogeni. Infatti questi enzimi fungini sono capaci di lisare non solo l'estremità ifale dove la chitina non è ancora completamente cristallizzata, come nel caso delle chitinasi di pianta, ma anche le pareti delle ife mature, dei conidi, delle clamidospore e degli sclerozi, dove la chitina raggiunge livelli di cristallizzazione maggiore ed è normalmente più resistente alla digestione enzimatica (Lorito, 1998). La parete fungina contiene oltre a chitina e glucani anche lipidi e proteine. Sivan e Chet (1989) riscontrarono che il trattamento delle pareti cellulari di *F. oxysporum* con enzimi proteolitici provocava un incremento della degradazione della chitina e dei  $\beta$ -1,3- glucani ad opera di *T. harzianum*. Una proteasi alcalina da *T. harzianum* coinvolta nel micoparassitismo, la PRB1, è stata purificata e caratterizzata. Successivamente è stato clonato e caratterizzato il gene di questa proteasi, ed è stato riscontrato un incremento del corrispondente mRNA in presenza di *R. solani* (Geremia *et al.*, 1993). Attualmente sono stati ottenuti trasformanti di *T. harzianum* più efficaci nel micoparassitismo e nel biocontrollo, aumentando il numero di copie del gene *prb1* (Flores *et al.*, 1997). Per questi ceppi ingegnerizzati, aventi un più alto livello di espressione del *prb1* durante l'interazione con *R. solani*, si è riscontrato un maggiore controllo *in vitro* e *in vivo* del patogeno (Flores *et al.*, 1997). Metcalf e Wilson (2001) in una prova di biocontrollo hanno descritto la colonizzazione, da parte di *Trichoderma konigii* isolato Tr05, in radici di cipolla infette da *Slcerotium cepivorum*. Le ife di *T.konigii* Tr05 sono penetrate nel tessuto epidermico e corticale delle radici ed hanno degradato le ife del patogeno, provocando solo lievissimi danni al tessuto non infetto. Gli autori hanno collegato questo fenomeno alla produzione di una exo-endochitinasi da parte dell'antagonista in questione.

## 6 Conclusione

### Conclusione

Dallo screening “*in vivo*” eseguito su 13 isolati di *Trichoderma* spp. 4 ceppi hanno esercitato un controllo della tracheofusariosi del pomodoro, uno di questi ha avuto insieme ad altri due isolati un effetto di promozione di crescita nelle piante di pomodoro per quanto riguarda il primo accrescimento in altezza, mentre un solo isolato si è contraddistinto per la promozione di crescita per quanto riguarda l'accrescimento totale.

Dei quattro isolati che hanno fatto riscontrare le percentuali di infezioni più basse nella prova in vivo, due isolati hanno manifestato una certa capacità di sovraccrescere le colonie dei patogeni “*in vitro*” , sebbene non siano stati osservati chiari indizi di micoparassitismo verso i patogeni, che sono stati altresì individuati negli altri due isolati che però non hanno manifestato la capacità di sovraccrescita.

Questo lavoro è stato condotto con una prova preliminare “*in vivo*” con la quale si è cercato di riprodurre , per quanto possibile, le condizioni di normale coltivazione delle due specie vegetali prese in esame. Successivamente sono state condotte ulteriori indagini “*in vitro*” per cercare di capire i meccanismi di antagonismo coinvolti nel controllo della malattia. Questo tipo di procedimento è giustificato dal fatto, che molte volte gli ottimi risultati ottenuti da isolati in esperimenti “*in vitro*” non sono confermati in prove di campo “*in vivo*”.

Ad ogni modo l'identificazione di un isolato efficiente come agente di biocontrollo è solo la prima parte del lavoro che occorre eseguire per lo sviluppo di un sistema di biocontrollo. Infatti una volta che si è identificato un isolato interessante e sono stati individuati i suoi meccanismi di azione, si devono eseguire ulteriori prove per individuare il miglior processo produttivo, la formulazione , la metodologia di distribuzione e la conservazione, prima di iniziare la produzione su scala industriale.

## 7 Bibliografia

### Bibliografia

- Abou-Jawdah, Y., & Al-Khoury, A. M.** (1996). First report of the identification of race 0, 1, and 1,2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in Lebanon. *Plant Dis.*, 80: p711
- Agrios, G.N.** (1997) *Plant Pathology*. Academic press San Diego, California USA: pp 635
- Alexander, L. J. & Tucker, M.** (1945) Physiological specialization in the tomato wilt fungus *F.oxysporum* f.sp *lycopersici* *J. Agric. Res.* , 70: pp 303-313
- Alexander, L.J.** (1959) Progress report of national screening comitee for disease resistance in tomato 1954-1957 *Plant Disease Report*, 43: pp 55-65
- Alexander, L.J. & Hoover, M. M.** (1955) Disease resistance in wild species of Tomato Ohio Agriculture Expermental Sation Research Bullettin, 752: pp 76-77
- Altomare, C.;** Norvell, W.A.; Bjorkman, T. and Barman, G.E. (1999) Solubilization of phosphate and micronutrients by the plantgrowthpromoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295–22. *Applied Environmental Microbiology*, 65: pp 2926– 2933
- Anderson, J. D.** ; Bailey, B. A. ; Taylor, R. ; Sharon, A.; Avni, A. Matoo, A. K. And Fuchs, Y. (1993) Fungal Xylanase elicits ethylene biosynthesis and other defense response in tobacco. In: “Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene Vol 16” (Ed. by J. C. Peach; A. Latche and C. Balague), Kluwer Dordrecht: pp 197-204
- Armstrong G. M. & Armstrong J. K.** (1981) *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: ( coord Nelson, P.E., Toussoun, T.A. e Cook, R.J.) “*Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*” The Pennsylvania University Press, University Park, : pp. 391-399.
- Arora,D.K.** ; Elander, R.P. and Mukerji, K.G. (1992) *Handbook of applied mycology. Fungal Biotechnology*, vol 4. Marcel Dekker, New York
- Ayers, W. A. & Adams, P. B.** (1983) Improved media for growth and sporulation of *Sporidesmium sclerotivorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: pp 325-330.

- Bailey, B. A. ; Korcak, R. . F. and Anderson, J. D. (1992)** Alteration in *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi cell membrane function following treatment with an ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase. *Plant Physiol.* 100 :pp 749-755
- Baker, K. F. & Snyder, W. C. (1965)** Ecology of soil borne plant pathogens. Prelude to biological control Univ. Cal. Press, Berkley : pp 571
- Baker, R. (1992)** Molecular biology in control of fungal pathogens in: “ Handbook of applied mycolgy volume 1 Soils and Plants”( ed. by Akora, P.K. ; Bharat, R. ; Mukerji, K.J. ; Knudsen, G. R). Marcel Dekker inc. New York, Basel, Hong Kong,,: pp 259-293
- Banihashemi, Z. and DeZeeuw, D.J. (1975)** The behavior of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in the presence and absence of host plants. *Phytopathology*, 65: pp 1212-1217
- Beckman, C. H. (1966)** Cell irritability and localization of vascular infection in plants. *Phytopathology* , 56 : pp 821-824
- Beckman, C. M. (1969)** The mechanics of gel formation by swelling of simulated plant cell wall membranes and perforation plates of banana root vessel. *Phytopathology*, 59: pp 827-843
- Beckman, C. M. & Zarogian, G. E. (1967)** Origin and composition of vascular gel in banana roots. *Phytopathology* 57 pp 11-13
- Beckman, C.H. (1987)** The nature of wilt disease of plants. APS Press St Paul MN
- Belisario, A.; Luongo, L. and Corazza, L. (1999)** .La tracheofusariosi, una preoccupante avversità del melone d’inverno *Tec. Agric.* ,23: pp 41-44
- Belisario, A.; Luongo, L., Corazza, L., and Gordon, T. R. (2000)** Indagini su popolazioni di *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in Italia. *Colture Protette*, 3: pp 87-89
- Bell, D. K.; Wells, H. D. and Markham, C. R. (1982)** In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens *Phytopathology*, 72 : pp 379-382
- Benhamou N. & Chet I. (1996)** Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspect of the interaction. *Phytopatology*, 86: pp 405-416

- Benítez, T** ; Delgado-Jarana, J ; Rincón, A.M. ; Rey, M. Limón, M.C. (1998) Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In ( Eds S.G. Pandai ) Recent research developments in microbiology, vol. 2 Research Signpost Trivandrum : pp 129-150
- Bigirimana, J.;** De Meyer, G.; Poppe, J. Y. E.; And Hofte, M. (1997) Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 62 pp 1001–1007
- Bilai , V. I.** (1955) The *Fusaria* (Biology and Systematics). Doklady Akademii Nauk Ukrainskoj Kiev.
- Bok, S. H.;** Lee, H. W.; Choi, D e Kim, S. U. (1996) Bioencapsulated biopesticides, in: “Advances in Biological Control of Plant Diseases”. (Ed by T. Wenhua. R. J. Cook and Rovira ). China Agricultural University Press, Beijing : pp 303-309
- Boller, T.** (1989) Primary signal and second messenger in the reaction of plants to pathogens. In: (Eds F. Boss and D.J. Morré) Second messenger in Plant growth and development. Alan Liss, New York: pp 227-225
- Booth, C.** (1971) The Genus *Fusarium* Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey. UK.
- Bowen, G. D.** (1980) Misconception, concepts and approaches in rhizosphere biology. In: “ Contemporary Microbial Ecology” (Ed by D.C. Ellwood, J.N. Hedger, M. J. Latham, J.M. Lynch and J.H. Slater eds.) Academic Press, London : pp 283-304
- Brandes, E. W.** ( 1919) Banana wilt. Phytopathology, 9: pp 339-390
- Brodie, I. D. S. & Blakeman, J . P.** (1977) Effects of nutrient leakage , respiration and germination of *Botrytis cinerea* conidia caused by leaching with water. Transaction of the British Mycological Society, 68: pp 445-447
- Burge, M.N.** (1988) Fungi in Biological Control Systems. Manchester University Press, Manchester : pp. 260
- Burges, H.D** (1981) Microbial Control of Pests and Diseases. Academic Press, London & New York : pp 949



- Calderon, A.** ; Zapata, J. M. ; Munoz, R. ; Pedreno, A. and Barcelo A. R. (1993) Resveratrol production as a part of the hypersensitive-lyke response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride* New Phytol. , 124 : pp 455-463
- Chet I.** ( 1987 )*Trichoderma*: applicazione, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: (eds. I. Chet) Innovative Approaches to Plant Disease Control (Series and Ecological and Applied Microbiology) J.Wiley&Sons New York: pp 137-160.
- Chet, I.** ; Inbar, J. And Hadar, I.( 1997) Fungal antagonists and mycoparasites. In: ( Eds D.T Wicklow and B. Söderström) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag Berlin : pp 165-184
- Chiocchetti, A.** ; Bernardo I.; Daboussi, M. J.; Garibaldi, A.; Gullino, M. L.; Langin, T. e Migheli, Q. (1999) Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. Phytopathology, 89 : pp 1169-1175.
- Chun, S. C.**; Schneider, R. W. ; Groth, D. E. e Giles, C. G. (1997) Effect of different carbon sources on efficacy of biological control of seedling disease in water-seeded rice. Phytopathology, 87 : pp 190-191
- Citrulli, M. & Alexander, L.J.** (1966) A comparison of pathogenetic isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato Phytopathology, 56 : pp 1301-1304
- Clavet C.,** ;Pera J. ; Barea J. M. (1993) Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. Plant and Soil, 148 : pp 1-6
- Clayton, E. E.** (1923) The relation of temperature to the Fusarium wilt of the tomato. American J. Bot. , 10 : pp 71-88
- Connick ,W. J. Jr.** ; Daigle, D. J. ; Boyette, C. D.; Williams, K. S. ; Vinyard , B. T. e Quimby, P. C., Jr. (1996) Water activity and other factors that affect the viability of *Colletotrichum truncatum* conidia in wheat flour-kaolin granules ("Pesta"). Biocontrol Science and Technology, 6 : pp 277-284

- Connick, W. J.** ; Boyette, C. D. e McAlpine, J. R. (1991) Formulation mycoherbicide using a pasta-like process. *Biological Control*, 1 : pp 281-287
- Cook, R. J. & Baker, K. F.** (1974) Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman company, S. Francisco : pp 43-44
- Cook, R. J. & Baker, K. F.** (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. American phytopathological society, St. Paul (MN).
- Cook, R.J.** (1993) The rule of biological control in pest management in the 21th century. In: ( Eds R.D. Lumdsen and J.L. Vaughn) Pest management: Biologically Based Technology. American Chemical Society, Washington DC : pp 10-20
- Corazza, L.** (1998) Le fusariosi del melone d'inverno. *Colture Protette*, 5 : pp 39-41
- Crossley, D. A . J.** ; Coleman, D.C.; Hendrix, P. F . (1989) The importance of the fauna in agricultural soils : Research approaches and perspective *Agriculture, Ecosystem and Enviroment*, v. 27 .
- De la Cruz J.** ; Hidalgo-Gallego A. ; Lora J. M. ; Benitez. Pintor-Toro J. A. ; Llobell A. (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J.of Biochem.* , 206 : pp 859-867
- De Meyer, G.;** Bigirimana, J.; Elad, Y. and Hofte, M. (1998) Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* , 104 : pp 279–286
- Deese, D. C. & Stahmann, M. A.** 1962 Pectic enzymes in Fusarium-infected susceptible and resistant tomato plants. *Phytopathology*, 52 : pp 255-260
- Del gado-Jaranna, J.;** Moreno-Mateos,M.A. and Benitez,T. (2003) Glucose uptake in *Trichoderma harzianum* role of Gtt1. *Euk. Cell*, 2 : pp 708-717
- Di Pietro A.** ; Lorito M., Hayes C. K.; Broadway R. M.; Harman G. E. (1993) Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination gliotoxin. *Phytopathology*, 83 : pp 308-313
- Dingley, J.M.** (1957) Life history studies in the genus *Hypocrea* Fr. *Trans. R. soc. N.Z.* , 84 : pp 689-693
- Doi, Y.** (1967) Revision af the *Hypocreales* with cultural observation III. Three species of the genus *Podostroma* with *Trichoderma* or *Trichoderma*-likee conidial state. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 8 : pp 693-794

- Druzhinina, I & Kubicek, C.** (2005) Species concept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea* from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University science*, 6B(2) : pp 100-112
- Duffy, B.K.;** Simon, A. and Weller, D.M. (1996) Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, 86 : pp 188-194
- Elad Y. and Shtienberg D.** (1996) *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. In: “Advances in Biological Control of Plant Diseases.” (Ed by T. Wenhua, R.J. Cook and A. Rovira Beijing) Agricultural University Press : pp 310-319
- Elad, Y. & Kapat, A.** (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105 : pp 177-189
- Elad, Y., & Hadar, Y.** (1982) Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in carnation. *Plant Disease*, 65 : pp 675-677
- Elad, Y.;** Chet, I. and Katan, J. (1980) *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *phytopathology*, 70 : pp 119-121
- Elias, K. S. & Schneider, R. W** (1991) Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *Phytopathology*, 81 : pp 159-162.
- Erzurum, K.,** Taner, Y., Secer, E., Yanmaz, R., and Maden, S. (1999) Occurrence of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing wilt on melon in Central Anatolia. *J. Turkish Phytopathol.*, 28 : pp 87-97
- Evans, H. C.,** Holmes, K. A. and Thomas, S. E. (2003). Mycobiota of an indigenous *Theobroma* species (*Sterculiaceae*) in Ecuador: assessing its potential for biological control of cocoa diseases. *Mycol. Prog.* 2 : pp 149–160
- Faull J. L. and Scarletti R.** (1994) In vitro activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research*, 98 : pp 1207-1209
- Ficcadenti, N.;** Veronese, P.; Sestili, S.; Crinò, P.; Lucretti, S.; Schiavi, M. and Saccardo, F. (1995) Influence of genotype on the induction of haploidy in *Cucumis melo* L. by using irradiated pollen. *J. Genet. Breed.* 49 : pp 359-364

- Flores, A. ;** Chet I. ; Herrera-Estrella, A. (1997) Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Current Genetics*, 31 : pp 30-37
- Fraser, A. K.** (1971) Growth restriction of pathogenetic fungi on the leaf surface micro-organism. *Accademic press, London* : pp 529-535
- Fravel, D. ;** Olivain, C. and Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol *New Phytologist*, 157: pp 493–502
- Fravel, D. R.;** Lewis J. A. & Chittams J. L. (1995) Alginate prill formulation of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopatholog*, 85 : pp 165-168
- Fravel, D. R.;** Marosi, J. J.; Lumsden, R. D. e Connick W. J., Jr. (1985) Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix *Phytopatholog*, 75: pp 774-777
- Fuchs, Y. ;** Saxena, A. ; Gamble, H. R. and Anderson, J. D. (1989) Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiol.*, 89 : pp 138-143
- Gams, W.** (1998) “Morfology and identification of *Trichoderma*” in: ( Eds Kubicek, C. P. & Harman, G. E. ) “ *Trichoderma & Gliocladium* vol 1” Taylor and Francis, London: pp 3-15
- Geremia, R.A. ;** Goldman, G.H. ; Jacobs, D. ; Ardiles, W. ; Vila, S.B. ; Van Montagu, M. and Herrera-Estrella, A. (1993) Molecular characterization of the proteinaseencoding gene, *pbr1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology*, 8 : pp 603-613
- Gerlach, W. & Nirenberg, H.** (1982) The genus *Fusarium* - A pictorial atlas *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Heft 209* Paul Parey , Berlin.
- Ghabrial, S. A.** (1980) Effects of fungal viruses on their Hosts *Annual review of phytopathology*, 18 : pp 441-461
- Godoy, P. ;** Nunes, F. ; Tomimori, J.Y. ; Zaror, L. (2004) Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 157 : pp 287–290
- Goidanich ,G.** (1964). *Manuale di patologia vegetale. Vol. 2. Edizioni agricole, Bologna: pp 1202*

- Gomez Vazquez, J., & Tello Marquina, J. C.** (2000) Presenzia de la razza 1,2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en Almeria. Bol. San. Veg. Plagas, 26: pp 27-33
- Gooday, G.W.** ; Humphereys, M. and Mc Intosh, W.H. (1985) Roles of chitinases in fungal growth. In: (Eds R. Muzzerelli ; C. Jeuniaux and C G. Gooday) Chitin in nature and technology. Plenum Press N.Y. : pp 83-91
- Gordon, T. R. & Martyn, R. D.** (1997) The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum* Annual Review of Phytopathology, 35: pp 111-128.
- Gordon, W. L.** (1952) The occurrence of *Fusarium* species in Canada. II. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species in cereal seed. Canadian Journal of Botany, 30 : pp 209-251
- Gordon, T. R.** ; Okamoto, D. (1990) Colonization of crop residue by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. Phytopathology, 80: pp 381- 386
- Gordon, T. R.;** Okamoto, D. and Jacobson, D. J. (1989) Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. Phytopathology, 79: pp 1095-1100
- Gordon, T.R.** (1993) Genetic variation and adaptative potential in asexual soilborne fungus. In: “ The fungal Holomorph: Mitotic and Phleomorphic Speciation in Fungal Systematic” (Ed by D.R. Reynolds and J.W. Taylor) CAB International : pp 217-224
- Gordon, T.R. & Okamoto, D** (1992a) Population structure and the relationship between pathogenetic and non pathogenetic strani of *Fusarium Oxysporum* Phytopathology, 82: pp 73-77
- Gordon, T.R. & Okamoto, D** (1992b) Variation within and between population of *Fusarium Oxysporum* based on vegetative compability and mithochondrial DNA. Canadian Journal of Botany, 70 : pp 1211-1217
- Gothoskar, S. S.;** Scheffer, R. P.; Walzer, J. C. and Stahmann, M. A. (1953) The role of pectic enzymes in *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology, 43: pp 535-536
- Grattidge, R. & O'Brien, R. G.** (1982) Occurence of a third race of *Fusarium* wilt of tomato in Queensland Plant Disease, 66: pp 165-166

- Grondona, I;** Hermosa, R; Tejada, M; Gomis, MD; Mateos, PF; Bridge, PD; Monte, E; (1997) Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Appl. Environ. Microbiol., 63: pp 3189-3198
- Haraguchi, H. ;** Hamatani, Y. ; Hamada, M. and Fujii-Tachino, A. (1996) Effect of gliotossin on growth and branched-chain aminoacid biosynthesis in plants. Phytochemistry, 42 : pp 645-648
- Haran, S.;** Schickler, H.; Oppenheim, A. and Chet, I. (1996) Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinase during mycoparasitism. Phytopathology, 86: pp 980-985
- Harman G.E. & Kubicek C. P.** (1997) *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol 1. Taylor & Francis. London
- Harman, G. E. ;** Hayes, C. K. ; Lorito, M.; Boadway, R. M. ; Di Pietro A. and Tronsmo, A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology, 83: pp 313-318
- Harman, G. E. & Björkman, T.** (1998) Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement in: (Eds by G.E. Harman and C. P Kubicek) “ *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol 2. Enzymes, biological control and commercial application” Taylor and Francis, London: pp 229-261
- Harman, G.E. ;** Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I. and Lorito, M. (2004) *Trichoderma species* – opportunistic, avirulent, plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2: pp 43-56
- Harman, G.E.** (1990) Deployment tactics for biocontrol agents in plant pathology. In: (Eds R.R. Baker and P.E. Dunn) New direction in biological control: Alternatives for suppressing Agriculture Pests and Disease. Alan Liss, New York: pp 779-792
- Hayes, C.K. ;** Klemsdal, S.; Lorito, M.; Di Pietro, A.; Peterbauer, C.; Nakas, J.P.; Tronsmo, A.; and Harman G.E. (1994) Isolation and sequence of an endochitinase encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. Gene, 138: pp 143-148

- Hebbar, K. P.** ; Lumsden, R. D. ; Poch , S. M. e Lewis, J. A. (1997) Liquid fermentation to produce biomass of mycohrbicial strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48 : pp 714-719.
- Hiltner, L.** (1904) Über neuer Erfahrungen und Probleme auf den Gebeit der Bodenbacteriologie und unter besonderer Beruchsichtigung der Grundungen und Brache. *Arb.dt. Land W. Ges* : pp 59-78
- Howell, C. R.,** Hanson, L. E., Stipanovic, R. D. and Puckhaber, L. S. (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90 pp 248–252
- Howell, C.R.** (1998) The role of antibiosis in biocontrol. In: (Eds G.E Harman., C.P. Kubicek) *Trichoderma & Gliocladium*, vol. 2 Taylor & Francis, Padstow: pp 173-184
- Howell, C.R. & Stipanovic, R.D.** (1995) Mechanism in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disesase by *Trichoderma viride*: antibiosis. *Phytopathology*, 85: pp 469-472
- Howell, C.R. & Stipanovic, R.D.** (1984) Phytotoxicity to crop plant and herbicidal effect on weeds of viridiol produced by *G.virens* *Phytopathology*, 74: pp 1346-1349
- Inbar, J.** ; Abramsky, M. and Chet, I. (1994) Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology.*, 100: pp 337–346
- Inbar, J. and Chet I.** (1997) Lectins and biocontrol. *Critical Reviews of Biotechnology*, 17: pp 1-20
- Ishii, S.** (1987) Generation of active oxygen species during enzymic isolation of protoplast from oat leaves. *In vitro Cell. Devel. Biol.*, 23: pp 653-658
- Joffe, A. Z.** (1974) A modern system of *Fusarium* taxonomy *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 53 : pp 201-228.
- Jones, J. B.** ; Jones, J. P. ; Stall, R. E. & Ziller, T. A. (1991) Compendium of tomato disease. American Phytopatological society St. Paul (MN)
- Kerr, A.** (1980) Biological control through production of Agrocin 84. *Plant Disease*, 64: pp 25-30

- Kistler, H. C.;** Momol, E. A. e Benny, U. (1991) Repetitive genomic sequences for determining relatedness among strains of *F. oxysporum* Phytopathology, 81: pp 331-336
- Kleifeld, O. and Chet, I.** (1992) *Trichoderma* – plant interaction and its effect on increased growth response. Plant Soil. , 144: pp 267–272
- Kloepper, J. W. & Schroth, M. N.** (1981) Development of a powder formulation of Rhizobacteria for inoculation of potato seedpieces. Phytopathology, 71: pp 590-592.
- Levine, M. N. ; Bamberg , R. H. and Atkinsons, R. E.** (1936) Micro-organisms antibiotic are pathogenic to cereal rusts Phytopathology, 26: pp 99-100
- Lewin, B.** (1997) La trasduzione del segnale. in Gene VI, capitolo 35, Oxford University Press and Cell Press. : pp 904-934
- Lewis, J. A. & Papavizas, G. C.** (1985) Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferations of the fungi in soils. Plant Pathology, 34: pp 571-577
- Lewis, J. A.;** Fravel, D. R.; Lumsden, R. D. e Shasha B. S. (1995) Application of fungi in granular formulations of pregelatinized starch-four to control damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. Biological Control, 5: pp 397-404
- Liddell, C. M..** (1991) Introduction: recent advances in *Fusarium* systematics Phytopathology, 81: pp 1044
- Lindsey, D.L. & Baker , R.** (1967) Effect of certain fungi on dwarf tomatoes growing in gnotobiotic condition Phytopathology, 57: pp 1262-1263
- Loeffler , W. ; Tschen, S. M. ; Vannittanakom , N. ; Kugler , M. ; Knorp , E. ; Hsieh , T. F. & Wu , T. G.** (1986) Antifungal effects of bacylisin and fengymicin from *Bacillus subtilis* F-29-3 . A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics . Journal of Phytopathology, 115: pp 204- 213
- Lorito, M. ; Harman G.E., Hayes C.K.;M Broadway R.M, Tronsmo A.; Woo S.L. & Di Pietro, A.** (1993) Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidasse. Phytopathology, 83 : pp 302-307
- Lorito, M. ; Hayes C.K.; Di Pietro A.; Woo S.L. and Harman G.E.** (1994b) Purification, characterzation, and synergistic activity of a glucan 1,3-β -



- glucosidase and an N acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84: pp 398-405
- Lorito, M.** (1998) Chitinolytic enzymes and their genes. In: (Eds G.E. Harman and C.P Kubicek) *Trichoderma and Gliocladium* vol.2. Taylor & Francis, London : pp 73-99
- Lorito, M.** (1997) Chitin in agriculture. *Carbohydrates in europe*, 19 : pp 24-29
- Lorito, M. ; Hayes, C.K.; Di Pietro, A.; Woo, S.L. and Harman G.E.** (1994b) Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an N140 acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84 : pp 398-405
- Lorito, M. ; Peterbauer, C. ; Hayes, C.K. and Barman, G.E.** (1994a) Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140 : pp 623-629
- Lorito, M.; Mach, R.; Sposato, P.; Strass, J.; Peterbauer, C.K. and Kubicek, C.P.** (1996) Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93 : pp 1486-1487
- Luque, A.; Biasoli, M.; Alvarez, D.** (1995) Aumento de la incidencia de micosis superficiales producidas por hongos del género *Fusarium*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 12 : pp 65-67
- Lynch, J. M.** (1990) Population dynamics and rhizosphere interaction. John Wiley and sons, New York.
- Marahiel, M.A. ; Stachelhaus, T. and Mootz, H.D.** (1997) Modular peptide synthetases involved in non ribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev* , 97: pp 2651-2674
- Margolles-Clark, E. ; Harman, G. and Penttila, M.** (1996) Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: pp 2152-2155

- Marlatt, M.L.** ; Correl, J.C. ; Kaufmann, P & Cooper, P.E. (1996) Two genetically distinct population of *Fusarium oxysporum* f.sp race 3 in the United states. Plant Disease, 80: pp 1336-1342
- Matuo, T.** (1972) Taxonomic studies of phytopathogenic *Fusaria* in Japan. Review of Plant Protection Research, 5 : pp 34-45.
- McClure, T. T.** (1950) Anatomical aspects of the Fusarium wilt of sweet potatoes. Phytopathology, 40 : pp 769-775
- McGrath, D. J.** ; Gillespie, G. & Vawdrey, L. (1987) Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2 of *Lycopersicon pennellii*. Aust. J.Agric.Res. 38: pp 729-733
- McKeen , C . D.** ; Reylly, C. C. & Pusey, P. L . (1986) Production and partial characterisation of antifungal substances antagonistic to *Monilia fructicola* from *Bacillus subtilis* . Phytopathology , 76: pp 136 –139
- Messiaen, C. M. & Cassini, R** (1981) Taxonomy of Fusarium. In: "Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy", Nelson, P.E., Toussoun, T.A. e Cook, R.J. (coord.). The University Pennsylvania Press, University Pennsylvania : pp 427-445.
- Messiaen, C. M.;** Risser, G., and Pecaut, P. (1962). Etude des plantes résistantes au *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* dans la variété de melon Cantaloup Charentais. Ann. Amélior. Plant., 12 : pp 157-164
- Metcalf ,D.A. & Wilson, C.R.** (2001) The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma konigii* Plant Pathology, 50 : pp 249-257
- Monte, E.** (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Int Microbiol, 4: pp 1-4
- Moreau, R. A.** ; Powell, M. J. ; Whitaker, B. D. ; Baley, B. A. and Anderson J. D. (1994) Xylanase treatment of plant cells induces glycosylation and fatty acylation of phytosterols Physiol. Plant, 91: pp 575-580
- Morgan, F. L.** (1963) Infection inhibition and germ tube lysis of three cereal rust by *Bacillus subtilis*. Phytopathology
- Namiki, F.** , Shiomi, T., Nishi, K., Kayamura, T., and Tsuge, T. (1998) Pathogenicity and genetic variation in the Japanese strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* . Phytopathology, 88 : pp 804-810

- Nelson, P. E.** ; Toussoun, T. A. & Marasas W. F. O. (1983) *Fusarium* species: An illustrated manual for identification PSUP University Park. Pennsylv.
- Nishimura, S.** (1971) Observation on wilting mechanism of *Fusarium*-infected watermelon plants Review of Plant Protection Research 4 pp 71-80
- Nordbring-Hertz, B. & Chet, I.** (1986) Fungal lectins and agglutinins. In Microbiol lectins and agglutinins: properties and biological activity John Wiley & Son pp 393-407
- Odum, E. P.** . (1983) Le popolazioni nella comunità. In: (Eds E. P. Odum), Basi di ecologia, a cura di L. Rossi, traduzione di L. Nobile, Piccin Nuova Libraia Padova. pp 544
- Osiewacz, H.D.** (2002) Molecular biology of fungal development Marcel Dekker New York
- Ouchi, S.** (1983) Induction of resistance or susceptibility. Annu. Rev. Phytopathology 21 pp 289-315
- Papavizas, G.C.** (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and the potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23: pp 23-54.
- Pennypacker, B. W.** (1981) Anatomical changes involved in the pathogenesis of plant by *Fusarium* In: "*Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy", Nelson, P.E., Toussoun, T.A. e Cook, R.J. (coord.). PSUP University Park. Pennsylv. : pp 399-408.
- Pennypacker, B. W. & Nelson, P. E.** (1972) Histopathology of carnation infected with *F. oxysporum* f. sp. dianthi. Phytopathology, 62: pp 1318-1326
- Phipps, P. M. & Stipes, R. J.** (1976) Histopathology of mimosa infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. perniciosum. Phytopathology, 66 pp 836-843
- Pinck, L. A.** ;Holton , F.W & Allison, F.E. (1961a) Antibiotics in soil 1 physiochemical studies of antibiotic of clay complexes Soil science, 91: pp 22-28
- Pinck, L. A.** ;Soulidies, D.A. & Allison, F.E. (1961b) Antibiotics in soil 2 Extent and mechanisms of release Soil science, 91 pp 94-99
- Raillo , A** (1950) Gryby roda *Fusarium* State Publ. Moskva. Gos. Izd-vo sel-hoz Litry.
- Reese, E.T;** Levinson, H.S.; Downing, M. and White, W.L. (1950) Quatermaster culture collection. Farlowia, 4 : pp 45-86

## Bibliografia

- Rick, C. M.** (1978) "Tomato" . In: J Smartt and NW Simmonds (eds), Evolution of Crop Plants Longman Scientific and Technical. Essex England. pp 452-457
- Risser, G. Z.** Banihashemi, and D.W. Davis, (1976) A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. Phytopathology, 66: pp 1105-1106
- Roussos, S.** ; Olmos, A. ; Raimbault, M.; Saucedo-Castaneda Lonsane, B. K. (1991) Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: Conidiospores of *Trichoderma harzianum*. Biottechnol. Techn. , 5: pp 415-420
- Royse, D. J. and Ries, S. M.** (1978) The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. Phytopathology, 68 : pp 603-607
- Schreuder, W.,** Lamprecht, S. C., and Holz, G. (2000) Race determination and vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* from South Africa. Plant Dis. 84 pp 231-234
- Sestili, S.;** Veronese, P.; Ficcadenti, N.; Crinò, P. and Saccardo, F. (1994) .Induction of haploidy in muskmelon (*Cucumis melo* L.). Cell Culture, 88: pp 23-29
- Shapiro , M.** (1992) Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth(Lepidoptera: *Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. Journal of Economic Entomology , 85: pp 1682-1686
- Shapiro, M. & Robertson J. L.** (1992) Ehnancement of gypsy moth (Lepidoptera: *Lymantriidae*) baculovirus activity by optical brighteners. Journal of Economic Entomology, 85: pp 1120-1124
- Sivan A. and Chet I.** (1989) Degradation of fungal cell walls by litic enzyme of *Trichoderma harzianum*. Journal General of Microbiology, 135: pp 675-682
- Slininger, P. J. & Shea-Wilbur, M. A.** (1995) Liquid-culture pH, temperature and carbon (not nitrogen). source regulate phenazine productivity of the take all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Applied Microbiology & Biotechnology, 43 : pp 794-800
- Smith, R. & Walzer, J. C.** (1930) A cytological study of cabbage plants in strains susceptible or resistant to yellows. Journal of Agriculture Research, 41: pp 17-35

- Snyder , W. C. & Hansen, H. N.** (1940) The species concept in *Fusarium*. American Journal of Botany, 27: pp 64-67
- Song,X.-Y.;** Shen, Q.-T.; Xie, S.-T. ; Chen, X.-L. ; Sun, C.-Y. and Zhang, Y.-Z. (2006) Broad spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma konigii* SMF2 against plant pathogens. FEMS Microbiology Letters, 260: pp 119-125
- Stall, R. E.** (1961) Development of *Fusarium* wilt on resistant variety of tomato caused by a strain different from race 1 isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Plant Dis. Rep., 45 : pp 12-15
- T. Katan** (1999) Current Status of Vegetative Compatibility Groups in *Fusarium oxysporum* *Phytoparasitica*, 27: pp 1-14
- Thomas, P.A. & Geraldine, P.** (1992) Fungal keratitis due to *Fusarium* and other fungi. J.Mycol. Med. 2: pp 121-131.
- Thrane, C. & Jensen, D. F.** (1997) Endo-1,3- $\beta$ -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium spp* Eur. J. Plant Pathol., 103: pp 331-344
- Tisdale, W. H.** (1917) Flaxwilt: a study of the nature, and inheritance of wilt resistance. Journal of Agriculture Research, 11: pp 573-605
- Tjamos,E.C. ;** Papavizas,G.C.; Cook,R.J. (1992) Biological control of plant disease progress and challenge for the future. Plenum Press, New York.
- Ullstrup, A. J.** ( 1937) Histological studies on wilt of china aster. Phytopathology, 27 : pp 737-748
- Vey, A. ;** Hoaglan, R.E. and Butt, T.M. (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: (Eds T.M Butt, C. Jackson, N. Magan) Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CAB International, Bristol : pp 311-346
- Vidhyasekaran, P.;** Sethuramam, K. ; Rajappan, K. e Vasumathi, K. (1997) Powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. Biological Control, 18 : pp 166-171
- Webster, J.** (1964) Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* I. Comparison of the perfect states of *H.gelatinosa* , *H.rufa* and *H.sp.* 1 Trans. Br. Mycol. Soc., 47: pp 75-96

- Wechter, W. P.** ; Whitehead, M. P. ; Thomas, C.E., and Dean, R. A. (1995) .Identification of a randomly amplified polymorphic DNA marker linked to the *Fom-2 Fusarium* wilt resistance gene in muskmelon MR-1. *Phytopathology* , 85: pp 1245-1249
- Whilite, S. E.,** Lumsden, R. D. & Straney, D. C. (1994) Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping-off. *Phytopathology*, 84: pp 816-833
- Wollenweber, H. W. & Reinking, O. A.** (1935) Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung Paul Parey Berlin
- Wright, J.M.** (1951) Phytotoxic effects of some antibiotics *Ann. Bot.*, 15 : pp 493-499
- Wyss, P.** ; Boller, T. And Wiemken, A. (1992) Testing the effect of biological control on the formation of vesicular arbuscoral mychorrhiza. *Plant Soil*, 147: pp 159-162
- Yedidia ,I.;** Srivastva, A. K.; Kapulnik, Y. and Chet, I. (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*, 235: pp 235–242
- Yedidia, I.** ; Benhamou, N. And Chet, I. (1999) Induction of defense reponses in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environment Microbiology*. 65 pp 1061–1070
- Yedidia, I.;** Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. (2000) Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum strain T-203*. *Plant Physiology Biochemistry*, 38: pp 863–873
- 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 the accumulation of phytoalexins. *Applied Environmental Microbiology*, 69: pp 7343-7353
- Zimand, G.** ; Elad, Y. and Chet, I. (1996) Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity *Phytipathology*, 86: pp 1255-1260

## Bibliografia

- Zink, F. W.** (1992) Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0 and 2 in muskmelon cultivars Honey Dew, Iroquois, and Delicious 51. *Plant Dis.*, 76: pp 162- 166
- Zink, F. W.** and Thomas, C. E. (1990) Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0, 1, and 2 in muskmelon line MR-1. *Plant Dis.*, 80: pp 1230-1232
- Zuniga, T. L.**, Zitter, T. A., Gordon, T. R., Schroeder, D. T., and Okamoto, D. (1997) Characterization of pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing Fusarium wilt of melon in New York. *Plant Dis.*, 81: pp 592-596