

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 La situazione della barbabietola da zucchero in Italia	5
1.2 Principali malattie	6
1.3 Cercosporiosi	7
1.3.1 Sintomi	7
1.3.2 Agente causale	8
1.3.3 Ciclo biologico	9
1.3.4 Lotta	10
1.4 <i>Hypocrea/Trichoderma</i>	11
1.4.1 Filogenesi	11
1.4.2 Descrizione morfologica e microscopica del genere <i>Trichoderma</i> spp.....	14
1.4.3 Ecologia e Importanza economica	15
1.5 Interazione Pianta – Patogeno	16
1.6 Interazione <i>Trichoderma</i> spp. – Patogeno	18
1.6.1 Antibiosi.....	19
1.6.2 Competizione	19
1.6.3 Micoparassitismo	20
1.7 Interazione complessa (Pianta – Patogeno – <i>Trichoderma</i> spp.).....	22
1.8 Meccanismi di difesa della pianta	24
1.8.1 La resistenza sistemica acquisita (SAR)	25
1.8.2 L’induzione di resistenza in <i>Trichoderma</i>	26
1.8.3 Proteine PR	27
2. SCOPO DELLA RICERCA	33
3. MATERIALI E METODI.....	35
3.1 Isolamenti di <i>Trichoderma</i> spp.	36
3.2 Colture monosporiche	37
3.3 Identificazione dei ceppi su base microscopica	38

3.4	Allestimento dei campioni per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione.....	38
3.5	Analisi molecolare.....	39
3.5.1	Estrazione del DNA dagli isolati fungini	39
3.5.2	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	40
3.5.3	3.5.3. Clonaggio dei prodotti di PCR	42
3.5.4	Analisi filogenetica.....	44
3.6	Saggi di biocontrollo in vitro.....	45
3.7	Saggi di biocontrollo in vivo	46
3.7.1	Allevamento delle piante di barbabietola	46
3.7.2	Preparazione della sospensione conidica di <i>Trichoderma</i>	47
3.7.3	Trattamento delle foglie basali di barbabietola con elicitore biologici e chimici	47
3.7.4	Preparazione e inoculazione della sospensione conidica di <i>C. beticola</i>	48
3.8	Estrazione proteica dalle foglie apicali di barbabietola.....	49
3.8.1	Analisi delle forme isoenzimatiche di chitinasi.....	49
3.8.2	Saggio dell'attività glucanasica ed analisi delle forme isoenzimatiche	50
3.8.3	Saggio dell'attività perossidasi ed analisi delle forme isoenzimatiche	51
4.	RISULTATI.....	52
4.1	Descrizione dei fenotipi di <i>Trichoderma</i>	53
4.2	Colonie osservate al microscopio ottico ed elettronico a scansione.....	53
4.3	Analisi molecolare.....	54
4.4	Saggi di biocontrollo <i>in vitro</i>	55
4.5	Saggi di biocontrollo <i>in vivo</i>	56
4.6	Analisi delle forme isoenzimatiche	57
4.6.1	Analisi delle forme isoenzimatiche di chitinasi.....	57
4.6.2	Analisi delle forme isoenzimatiche di β -1,3-glucanasi	58
4.6.3	Analisi delle forme isoenzimatiche di perossidasi	58
	RISULTATI Figure e grafici	60

5. CONCLUSIONI E DISCUSSIONE	78
6. BIBLIOGRAFIA.....	84

1.INTRODUZIONE

1.1 La situazione della barbabietola da zucchero in Italia

L'Italia è il Paese maggiormente colpito dal ridimensionamento degli investimenti sulla barbabietola da zucchero.

A fronte di questo netto ridimensionamento l'Italia rimane comunque il quinto Paese dell'Unione Europea a 25 membri per superficie coltivata e dopo l'Irlanda è il Paese che ha fatto registrare il calo percentualmente più significativo. Infatti la nuova geografia della produzione della barbabietola da zucchero conferma la *leadership* dei Paesi dell'Europa centro-settentrionale - Germania, Francia, Polonia e Regno Unito in testa. Anche l'Emilia-Romagna, pur essendo in Italia la regione ai vertici del comparto per capacità produttiva e rese in saccarosio, è stata penalizzata. La prossima campagna vedrà, infatti, la chiusura di altri 5 stabilimenti.

Una strada alternativa che potrebbe contribuire, almeno in parte, a limitare il previsto impatto negativo sul settore bieticolo saccarifero-nazionale, è rappresentata dalle bioenergie che potrebbero diventare un elemento strategico di evoluzione di molti comparti produttivi, tra cui anche la barbabietola da zucchero. In questo contesto l'attenzione si è focalizzata sulle prospettive economiche e di sviluppo verso l'utilizzo di materie prime agricole per l'ottenimento di biocarburanti ed in particolar modo di bioetanolo che può essere ottenuto sia dai cereali che da barbabietola da zucchero. I biocarburanti, oltre che rappresentare un possibile antidoto alla carenza di fonti energetiche tradizionali, consentono, come dimostrano alcuni studi, la limitazione delle emissioni inquinanti nell'aria, in linea con quanto previsto dal protocollo di Kyoto, al quale anche l'Italia aderisce.

Nel settore dei biocarburanti l'Italia, unitamente ad altri Paesi Europei, dispone degli investimenti e delle capacità produttive necessarie.

Per quanto riguarda l'Italia, il decollo del progetto bioetanolo di Alcoplus (la *joint venture* tra Caviro e Alceste entrata attivamente nel mercato e costituita a Faenza nel luglio scorso con l'obiettivo di diventare il più grande polo produttivo italiano

del comparto) si inserisce in un contesto di profonda trasformazione delle politiche agricole e dei mercati internazionali che, suggerisce la riconversione di parte delle colture agricole verso utilizzi finalizzati alla produzione di energia pulita. Particolarmente interessante è la prospettiva di destinare una parte della produzione di barbabietole da zucchero, che vede l'Emilia-Romagna come principale bacino produttivo nazionale, alla trasformazione in alcool. Ora le prospettive per il mondo agricolo, ed in particolare per la bieticoltura, si sono ampliate, poiché per recuperare energia rinnovabile sotto forma di biogas, oltre alla digestione anaerobica dei reflui zootecnici, possono entrare convenientemente in gioco anche biomasse vegetali appositamente coltivate allo scopo. Grazie alla politica energetica adottata dall'Unione europea, si sono create le premesse per un utilizzo diverso dei terreni, o quantomeno delle produzioni. Infatti si punta decisamente ad aumentare la produzione di energie alternative e quelle derivanti da materie prime fossili, questo per effetto della riforma della Pac e dell'Ocm zucchero - che ha tagliato il sostegno a seminativi e barbabietola da zucchero ma ha incentivato la coltivazione di colture energetiche (Lunati, 2006).

Di fondamentale importanza risulta così essere la recentissima decisione presa nell'ultimo Consiglio Europeo (Bruxelles 8-9 Marzo 2007) che ha posto un obiettivo vincolante che prevede una quota minima del 10% per i biocarburanti nel totale dei consumi di benzina e gasolio per autotrazione dell'UE entro il 2020 e che dovrà essere conseguito da tutti gli Stati membri (<http://www.consilium.europa.eu/>).

1.2 Principali malattie

Tra le malattie fungine che possono colpire la barbabietola da zucchero si citano: morie dei semenzali e marciumi basali della barbabietola (*Phoma betae* Frank), mal vinato (*Helicobasidium brebissonii* (Desm.) Donk), oidio (*Erysiphe betae* (Vanha) Weltzien) e cercosporiosi (*Cercospora beticola*) Sacc. (Matta, 2000).

1.3 Cercosporiosi

La cercosporiosi è considerata la malattia fogliare più distruttiva della barbabietola da zucchero a livello mondiale. I paesi più colpiti sono quelli dell'Europa centro-meridionale: Italia, Francia e Grecia. In Italia è particolarmente dannosa in quei comprensori come la valle Padana Centro-orientale, dove la bietola viene coltivata in modo intensivo.

In queste zone, per ragioni climatiche e di diffusione dell'inoculo, essa trova ambienti molto favorevoli per il suo sviluppo. Numerosi monitoraggi nei diversi comprensori, hanno consentito la suddivisione dei bacini bieticoli italiani in 6 aree definite omogenee (elaborazioni DEPAAA su dati EUROSTAT, 2003), e per ciascuna area è stato infine fissato l'intervallo ottimale per l'inizio dei trattamenti ed il numero delle applicazioni, stabilito in base all'epoca di raccolta prevista.

1.3.1 Sintomi

I sintomi principali della malattia si manifestano a livello della lamina fogliare. La formazione della macchia fogliare è preceduta da una decolorazione dei tessuti epidermici in una piccola zona, quasi puntiforme, situata per lo più su un'unica foglia (Fig. 1.1). Le macchie caratteristiche sono di forma rotondeggiante (1-3 mm di diametro) con un bordo tendente al violaceo, mentre il centro della lesione, con il perdurare delle condizioni climatiche favorevoli, assume una colorazione grigiastra. Le macchie si presentano dapprima isolate e poi tendono a confluire, provocando dei disseccamenti su ampie aree fogliari fino ad interessare l'intera lamina; questa necrotizza completamente compromettendo il rendimento fotosintetico della pianta. In condizioni normali, si ha la completa differenziazione della macchia fogliare nella sua forma tipica da 1-3 giorni (Ferrari *et al.*, 1992).



Fig. 1.1: Foglie di barbabietola da zucchero affette da Cercosporiosi.

1.3.2 Agente causale

L'agente della malattia è *Cercospora beticola* Sacc., un fungo imperfetto filamentoso di cui non si conosce il teleomorfo. *Mycosphaerella* è stata caratterizzata come forma sessuale di altre specie di *Cercospora*, ma nessuna delle specie considerate monofiletiche con *C. beticola*, basandosi su sequenze di rDNA, possiede un teleomorfo conosciuto (Goodwin *et al.*, 2001).

In coltura artificiale si possono distinguere due tipi fondamentali di ife:

- quelle superficiali con calibro 2-3 μm , mediamente settate, a protoplasma leggermente granuloso, con numerose ramificazioni che danno luogo ad un micelio aereo, feltroso di colore grigio-cenere o verde scuro;
- quelle immerse nel substrato con dimensioni 4-5 μm , invece, si presentano irregolari a setti ravvicinati, intensamente pigmentate, riunite in masserelle stromatiche, simili a quelle che si formano sui tessuti dell'ospite.

Dalle cellule dei corpi stromatici prendono origine i conidiofori, più larghi delle ife, pigmentati alla base e quasi ialini alla sommità, leggermente geniculati e a maturità con cicatrici circolari. Queste rappresentano i punti di distacco dei conidi (Fig.1.2), che inizialmente sono quasi indistinti dal conidioforo e solo successivamente assumono le loro caratteristiche. Presentano dimensioni incostanti (70-120 μm x 3-3,5 μm) sono allungati con base leggermente ristretta e tronca, apice tendenzialmente acuminato e con un numero medio di setti che varia da 8 a 15 (Canova, 1959).

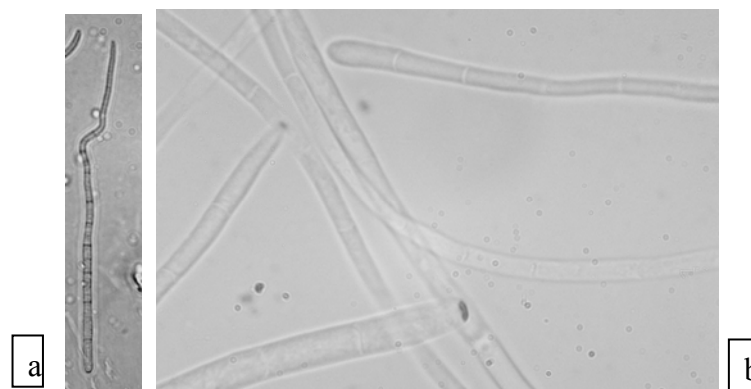


Fig. 1.2: Conidi di *C. beticola* a= 125x e b= 500x.

1.3.3 Ciclo biologico

Gli elementi vegetativi del patogeno, localizzati nel seme e nei residui della vegetazione infetta nel terreno, permettono in condizioni ambientali sfavorevoli, la conservazione di *C. beticola*. Nel terreno il patogeno può sopravvivere anche per alcuni mesi.

In primavera, in corrispondenza di condizioni termo-igrometriche ideali, i conidi formati sul micelio si distaccano ed arrivano sulla vegetazione. La differenziazione dei conidi avviene nel giro di poche ore, con temperatura (T) compresa tra 25 e 30 C° e umidità relativa (UR) del 95%. Il distacco avviene in risposta a 3 stimoli meccanici: correnti d'aria, attività di insetti e acqua. I conidi giunti a contatto con l'ospite germinano con emissione di un tubetto promicelico e le condizioni ottimali sono: T compresa tra 25 e 30 C° ed UR prossima al 100%. Il tubetto promicelico entra nei tessuti vegetali attraverso gli stomi completamente aperti, si localizza nella camera ipostomatica e susseguentemente si sviluppa intercellularmente. Lo sviluppo e la formazione delle ife sono condizionati principalmente dall'UR mentre la penetrazione è favorita da bagnatura fogliare limitata alle ore notturne. La velocità di penetrazione è massima con UR al 92%, e diminuisce, fino ad annullarsi al 60% di UR. La T ottimale di inoculazione è 25 C°. Alla penetrazione segue l'incubazione che consiste nello sviluppo del micelio all'interno del parenchima fogliare dell'ospite fino alla manifestazione dei sintomi della malattia (Fig. 1.3). I conidi, responsabili delle reinfezioni, si formano nella parte centrale delle macchie. Il periodo di incubazione varia da una a due

settimane e dipende dalle condizioni climatiche. I conidi, responsabili delle reinfezioni, si formano nella parte centrale delle macchie (Ferrari *et al.*, 1992).

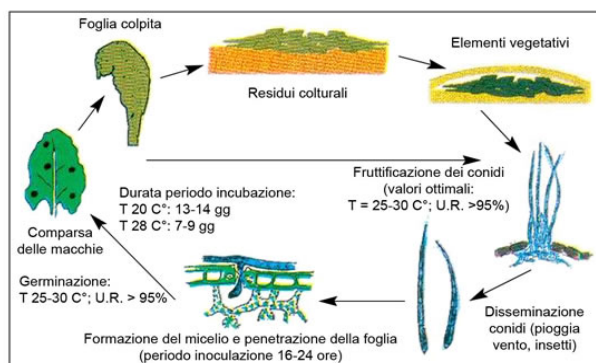


Fig. 1.3: Il ciclo di sviluppo e propagazione di *C. beticola* Fonte: Tugnoli e Biasco, 2005

1.3.4 Lotta

La Cercosporiosi rappresenta il più importante problema per il settore bieticolo-saccarifero italiano. Un razionale programma di difesa deve essere rapportato alle caratteristiche della varietà utilizzata e più precisamente al grado di tolleranza presente all'interno del proprio patrimonio genetico; pertanto gli interventi chimici dovranno essere modulati differenzialmente.

Nelle realtà italiane, solitamente, sono necessari interventi chimici a partire dalla comparsa delle prime macchie necrotiche, proseguendo mediamente ogni 18 giorni, con prodotti a base di triazoli e strobilurine. La Cercosporiosi della barbabietola resta, comunque, una fitopatia di difficile contenimento e la comparsa di ceppi di *C. beticola* resistenti ai principali fungicidi monosito indirizza a ricercare mezzi di lotta alternativi.

Le piante agrarie, in generale, sono caratterizzate da una serie più o meno complessa di proprietà costitutive che conferiscono una loro resistenza (resistenza costitutiva) agli agenti patogeni. Questa resistenza, quindi, rappresenta la capacità da parte della pianta di prevenire l'invasione degli agenti dannosi.

In barbabietola da zucchero, la resistenza a *C. beticola* si manifesta con una riduzione del tasso di sviluppo del patogeno e del numero di conidi formati per macchia (Rossi e Battilani, 1991). Questa resistenza è poligenica e quantitativa: il numero esatto di geni coinvolti è ancora controverso si pensa siano 4-5 geni

maggiori (Skaracis e Biancardi, 2000). In tempi più recenti la mappatura di quantitative trait loci (QTL) ha fornito contributi importanti allo studio delle resistenze poligeniche permettendo di definire il numero e la posizione delle resistenze geniche sulla linkage map della pianta (Koch e Jung, 1998). QTLs di resistenza a *C. beticola* sono stati identificati su tutti i cromosomi della bietola. Nilsson *et al.* (1999) hanno individuato cinque QTLs su quattro cromosomi, Schafer-Pregl *et al.* (1999) sette QTLs su 6 cromosomi, Koch e Jung (2000) quattro QTLs su tre cromosomi e Setiawan *et al.* (2000) quattro QTLs su quattro cromosomi.

Nelle cultivar di barbabietola da zucchero commerciali dotate di resistenza poligenica i livelli di resistenza parziali non consentono di effettuare meno di due interventi fungicidi, talvolta tre in annate favorevoli alla diffusione del patogeno. Negli ultimi anni si è valutata la possibilità di integrare i trattamenti chimici con quelli biologici al fine di limitare la protezione chimica ad un solo intervento e contenere la malattia entro soglie compatibili con buoni livelli produttivi.

1.4 *Hypocrea/Trichoderma*

(Fungi, Ascomycota, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*)

In accordo con l'articolo 59 del Codice Internazionale di Nomenclatura Botanica, il teleomorfo è l'elemento su cui si basa il sistema di classificazione degli Ascomiceti e viene accettato come nome dell'olomorfo (cioè teleomorfo + anamorfo). In letteratura comunque quando si fa riferimento agli agenti di biocontrollo (BCAs) si cita comunemente il nome dell'anamorfo *Trichoderma*. Nel presente lavoro, quindi, nei capitoli dei Materiali e metodi e successivi si parlerà di *Trichoderma*.

1.4.1 Filogenesi

Il genere *Trichoderma* è stato introdotto da Persoon (1794) per quattro funghi microscopicamente simili e fenotipicamente di aspetto polverulento ricoperto in qualche zona da pustule. Le quattro specie originalmente descritte in *Trichoderma*

erano chiamate *T. aureum*, *T. nigrescens*, *T. roseum* e *T. viride*, ognuna con un colore di conidi differente. Attualmente, solo la specie *viride* mantiene come classificatore Persoon.

Il primo “moderno” trattato su *Hypocrea* fu pubblicato da Dingley (1952, 1957), che identificò gli anamorfi di *Hypocrea* in *T. viride* Pers. A questo seguirono le pubblicazioni di Webster (1964), Webster e Rifai (1968) fino a giungere alla revisione critica del genere *Trichoderma* pubblicata da Rifai (1969). L’autore incluse nove specie aggregate basandosi su caratteri microscopici, che attualmente sono ancora accettati - angolo di ramificazione del conidioforo, morfologia dei fialidi e conidi e presenza di clamidospore - e su caratteri macroscopici, che comprendono la rapida crescita della colonia, micelio aereo e produzione di zonature verdi, alternate a bianche, indicative della conidiogenesi.

Le nove specie aggregate erano: *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain., *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai e *T. viride*. Ciascuna specie aggregata poteva comprendere più di una specie, ma Rifai concluse che i caratteri del solo anamorfo non potevano essere risolutivi come chiave tassonomica di *Trichoderma*.

Bissett (1991) ridefinì dapprima la classificazione delle specie aggregate di *Trichoderma*, fatta da Rifai, in cinque aggregati che erano *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum* e *T. pseudokoningii*. Poi, notando che più di venti specie distinte potevano essere assegnate a ciascuna specie morfologica di *T. hamatum*, *T. koningii* e *T. viride*, riconobbe cinque sezioni: *Hypocreanum* Bissett, *Longibrachiatum* Bissett, *Pachybasium* (Sacc.) Bissett, *Saturnisporium* Yoshim. Doi *et al.* e *Trichoderma*. Le sezioni erano distinte da differenze nello schema di ramificazione dei conidiofori, morfologia dei fialidi e conidi.

- *T. sez. Hypocreanum* Bissett è caratterizzata da anamorfi tipo *Verticillium* e *Acremonium*. L’anamorfo tipo *Verticillium* di *Hypocrea* /*Trichoderma* è distinto da *Verticillium* per la presenza di uno schema di ramificazione dendritica dei conidiofori che generalmente include ramificazione secondarie.

- *T. sez. Longibrachiatum* Bissett è distinta da conidiofori aggregati a formare pustole poco sviluppate. Il conidioforo è formato da una lunga ramificazione primaria e corte ramificazione secondarie. I fialidi sono singoli raramente riuniti in verticilli e producono conidi ellissoidali verdi. Una caratteristica del gruppo è la formazione di fialidi intercalari. Il teleomorfo *H. schweinitzii* Complex è considerato un gruppo monofiletico sulla base di dati morfologici colturali e molecolari.
 - *T. sez. Pachybasium* (Sacc.) Bissett raggruppa gli anamorfi della maggioranza delle specie descritte *Hypocrea/Trichoderma*. Le colonie spesso producono compatte pustole conidiogene con uno schema di ramificazione generalmente piramidale. Possono presentare ife sterili frammiste ai conidiofori, fialidi tipicamente corti e larghi prodotti in ciuffi di 2-7. Una delle principali caratteristiche di *T. sez. Pachybasium* è che i fialidi sono raggruppati in grappoli, spesso derivanti da una larga cellula basale. In questa sezione, Bissett incluse anche specie con ramificazioni tipo *Gliocladium*. *T. sez. Pachybasium* è considerato polifiletico (Kinderman *et al.*, 1998, Lieckfeldt e Seifert, 2000; Kulling-Gradinger *et al.*, 2002). Kinderman *et al.* (1998) divisero *T. sez. Pachybasium* in due distinti gruppi filogenetici chiamati A e B. Il gruppo A comprendeva le specie *T. atroviride* P. Karsten, *T. hamatum* (le specie tipiche di *T. sez. Pachybasium*), *T. koningii*, *T. minutisporum* Bissett, *T. piluliferum* Webster e Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pubescens* Bissett, *T. strigosum* Bissett, e *T. viride*; e il gruppo B comprendeva le specie *T. crassum* Bissett, *T. fertile* Bissett, *T. flavofuscum*, *T. harzianum* Rifai, *T. longipile* Bissett, *H. semiorbis* (Berk.) Berk., *T. spirale* Bissett, *H. stristipilosa/T. strictipile*, *T. tomentosum* Bissett, e *H. virens/T. virens*.
 - *T. sez. Saturnisporium* Yoshim. Doi *et al.* è stato originariamente distinto dalle altre sezioni per i suoi conidi tuberculati; mentre i dati molecolari la inserivano all'interno di *Hypocrea schweinitzii* Complex.
- T. sez. Trichoderma* ha come specie tipica *T. viride*, raggruppa gli anamorfi con conidiofori stretti e flessuosi e rami con 2-3 fialidi per

verticillo. I fialidi sono generalmente allungati e inseriti sul conidioforo con ampi angoli. I conidi possono essere sia lisci che rugosi.

L'introduzione delle analisi molecolari, nei primi anni del 1990, ha aperto una nuova era per la sistematica di funghi fornendo informazioni che potevano essere analizzate insieme con i dati morfologici più classici. I primi studi filogenetici basati sul DNA del genere *Hypocrea* sono stati fatti da Spatafora e Blackwell (1993) e Rehner e Samuels (1994-1995). Nell'ambito di questi studi sono state stabilite le relazioni filogenetiche delle specie *Hypocrea/Trichoderma*. Samuels *et al.* (1998) hanno scritto una monografia su *H. schweinitzii* Complex che includeva *T. sez. Longibrachiatum*, trattando molteplici caratteri morfologici, dati di crescita e analisi del DNA. Si è constatato che lo stroma di *Hypocrea* possiede strutture altamente conservate mentre differenze significative sono più facilmente visibili nella morfologia dell'anamorfo *Trichoderma*. In base ai risultati molecolari combinati con quelli morfologici viene confermata la distinzione delle specie fatte da Bissett.

1.4.2 Descrizione morfologica e microscopica del genere *Trichoderma* spp.

In generale, le colonie di *Trichoderma* presentano inizialmente un micelio aereo ialino che può assumere un aspetto fioccoso, a seconda del ceppo e del mezzo di coltura, ed assumono col tempo una colorazione verde più o meno intensa. Alcuni ceppi rilasciano un tipico odore di cocco o di canfora.

I conidiofori sono prodotti dalla colonia in modo diffuso, a ciuffi, o come pustole compatte ma comunemente sono distribuiti in anelli concentrici dalle sfumature verdi. Molto comuni sono i conidiofori formati da un asse centrale con ramificazioni laterali regolari, che, a loro volta, ramificano dando origine ad una struttura piramidale. Le cellule conidiogene sono fialidi ialini cilindrici, subglobosi o ampolliformi: la forma dei fialidi è un carattere tassonomico.

I conidi sono unicellulari, solitamente verdi o ialini, raramente gialli. La loro parete è usualmente liscia ma talvolta rugosa. La forma è altrettanto variabile: ellissoidale, allungata o cilindrica raramente globosa con dimensioni di circa 3-5

µm di diametro. I conidi appaiono generalmente secchi, anche se in alcune specie si trovano riuniti in capocchie o teste gelatinose.

Le clamidospore (struttura quiescente di resistenza del fungo) sono presenti nelle ife, in posizione intercalare o terminale. Possono essere unicellulari o pluricellulari ed assumere diverse forme di colore verde o giallo chiaro, spesso le clamidospore sono rivestite di una parete ispessita.

Le ife vegetative sono normalmente ialine, con parete liscia e larghezza di 2-10 µm.

La temperatura ottimale di sviluppo è intorno ai 25-30°C, mentre non cresce a 35°C (Chaverri e Samuels, 2003).

1.4.3 Ecologia e Importanza economica

Specie di *Hypocrea* ed il suo anamorfo *Trichoderma* sono comunemente presenti nelle foreste umide tropicali e subtropicali, ma si trovano anche nelle foreste aride, temperate o boreali e persino alle più estreme latitudini nord e sud.

Trichoderma ha, quindi, una diffusione ubiquitaria perché è in grado di crescere e sporulare su numerose fonti di carbonio e risulta facilmente riconoscibile per la formazione di masse di conidi che sono generalmente verdi.

Molte specie del genere *Trichoderma* hanno dimostrato una notevole attività antifungina ed un'attitudine nel promuovere la crescita delle piante. E' noto che l'utilizzo industriale di cellulasi extracellulari prodotte da *T. reesi* ha accresciuto l'interesse verso lo studio della biologia molecolare di questo fungo, fornendo anche informazioni riguardo alla tecnologia fermentativa, la quale risulta essere un passaggio chiave nella produzione commerciale di biofitofarmaci (Kubicek *et al.*, 1990). Le caratteristiche di questi funghi e la convergenza di interessi da differenti campi di applicazione hanno, quindi, agito sinergicamente e spinto ad approfondire la ricerca su *Trichoderma*. Attualmente circa un terzo dei prodotti commerciali presenti sul mercato, che utilizzano i funghi come principio attivo, sono a base di *Trichoderma* (Vannacci e Gullino, 2000).

Numerosi ceppi di *Trichoderma* sono risultati efficaci nel biocontrollo di vari funghi patogeni del suolo, sia in condizioni di serra che di pieno campo. Isolati di

Trichoderma sono stati utilizzati con successo contro diverse fitopatie tra cui marciumi radicali e basali causati da *Pythium ultimum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* e *Armillaria* spp. (Lewis e Papavizas, 1987; Otieno *et al.*, 2003), avvizzimenti su varie colture, causati da *Fusarium* (Chet e Inbar, 1994) e la muffa grigia causata da *Botrytis cinerea* (Harman *et al.*, 1996; Elad, 2000; Hjeljord *et al.*, 2000).

Oltre al loro impiego nel controllo biologico, alcune specie hanno l'abilità di decomporre il materiale a base di cellulosa attraverso la produzione di enzimi per compostaggio ad uso domestico e trovano applicazioni nella produzione di detergenti per lavanderie (Kubicek *et al.*, 1990; Molla *et al.*, 2002).

Le tecniche di applicazione di *Trichoderma* sono diverse:

- applicazioni a spaglio nei campi infestati;
- applicazioni direttamente nella zona radicale prima del trapianto in campo;
- concia del seme.

L'applicazione a spaglio comporta, di norma, la distribuzione di notevoli quantità di materiale e ciò rende questa strategia non sempre di pratica applicazione; a causa dell'aggravio dei costi (Papavizas *et al.*, 1985). L'aggiunta al terreno di *Trichoderma* allevato su substrati artificiali come cariossidi di cereali, granuli di diatomee impregnati con melassa o ottenuto in fermentatori, ha trovato vari riscontri nelle ricerche (Chet, 1987). Ma anche in questo caso la necessità di applicazioni di ingenti biomasse dell'antagonista ha indotto i ricercatori ad aggirare questi ostacoli orientandosi verso la concia (Roberti, 1998). La concia del seme con antagonisti garantisce una più immediata disponibilità del prodotto biologico attivo. I conidi di alcuni ceppi di *Trichoderma*, applicati sui semi e immagazzinati a 4°C e 15°C sono risultati essere in grado di sopravvivere dai 3 ai 5 mesi (Domsch *et al.*, 1980).

1.5 Interazione Pianta – Patogeno

Una delle più comuni forme di resistenza manifestata da ogni specie di pianta contro centinaia di potenziali patogeni è “la resistenza del non ospite”. Questa

forma di resistenza prescinde dallo specifico riconoscimento dell'agente patogeno e sembra dipendere da un complesso controllo genetico, che coinvolge una molteplicità di fattori di difesa non specifici, sia costitutivi che inducibili, considerati come parte della resistenza "basale" della pianta. "La resistenza del non ospite" è diversa dalla "resistenza dell'ospite" che è espressa da un genotipo di una pianta, appartenente ad una specie ospite, normalmente suscettibile ad una data razza di microrganismi patogeni. In questo caso, la pianta riconosce specificamente l'agente patogeno e attiva tutta una serie di meccanismi di difesa che portano a sfociare nella resistenza.

Collateralmente alla resistenza genetica, a seguito dell'interazione con l'entità patogena, le piante possono attivare una serie di meccanismi biochimici e strutturali diversi, in grado di contrastare il processo patologico in atto (resistenza post-infezionale). E' ormai assodata l'esistenza di una forma di resistenza orizzontale, messa in atto dalla pianta in risposta ad uno stimolo esterno, a seguito di un contatto compatibile prodotto da un patogeno omologo, per cui risultano potenziate le risposte di difesa dell'ospite (Ross, 1961).

La resistenza dell'ospite è spesso controllata da un singolo gene di resistenza (*R*) il cui prodotto interagisce direttamente od indirettamente con un elicitore specifico del patogeno, codificato da un gene definito di avirulenza (*avr*) (Hammond-Kosack e Jones, 1996). In questo caso, l'interazione tra pianta ospite (resistente) e patogeno risulta incompatibile. Se i geni *R* e/o *Avr* sono assenti o non funzionali, l'interazione tra l'ospite (resistente) e il patogeno (virulento) è compatibile, e determina lo sviluppo della malattia.

La resistenza dell'ospite è stata spiegata da Flor (1955) con la teoria gene-per-gene secondo la quale, nelle interazioni incompatibili, per ciascun gene che conferisce virulenza (patogenicità) al patogeno c'è un corrispettivo gene di resistenza, nella pianta ospite, che conferisce resistenza al patogeno, e viceversa. In questo caso, il gene di virulenza diventa un gene di "avirulenza", perché la sua presenza impedisce lo sviluppo della malattia. Il riconoscimento, diretto od indiretto, del prodotto di un gene di avirulenza del patogeno (*Avr*), da parte del prodotto di un corrispettivo gene di resistenza di pianta (*R*), è la causa dell'attivazione dei meccanismi di resistenza dell'ospite (Fig. 1.4).

Questo riconoscimento può essere associato alla reazione di ipersensibilità (HR), che consiste in una rapida morte delle cellule dell'ospite localizzata presso il sito di penetrazione del patogeno.

L'HR è anche associata all'induzione di risposte di difesa generalizzate, come lignificazione, rinforzamento della parete cellulare, deposizione di callosio, accumulo di fitoalessine e trascrizione di geni che codificano per proteine PR, che prevengono l'ulteriore diffusione del patogeno (Lamb, 1994).





	Genotipo della pianta	
	<i>Rlm1</i> resistente	<i>rlm1</i> sensibile
<i>AvrLm1</i> avirulento	R 	S 
<i>avrLm1</i> virulento	S 	S 

Fig.1.4: Interazione “gene per gene”. Gene *R* (resistenza, allele dominante) e gene *avr* (avirulenza). Fonte FLOR (1955):

1.6 Interazione *Trichoderma* spp. – Patogeno

Le specie di *Hypocrea/Trichoderma* sono importanti economicamente per l'effetto che alcune di loro provocano sui funghi fitopatogeni. I più comuni agenti di biocontrollo (BCAs) sono ceppi di *T. virens*, *T. viride* e soprattutto di *T. harzianum*. Il biocontrollo risulta sia dalla competizione per i nutrienti e lo spazio come un risultato della abilità di *Trichoderma* BCAs di produrre e/o resistere a metaboliti in grado di impedire la germinazione delle spore (fungistasi), di uccidere le cellule (antibiosi) di modificare la rizosfera, acidificando il suolo in modo tale che il patogeno non possa svilupparsi. La loro attività antifungina è stata ampiamente documentata e gli studi indicano che la loro potenzialità di biocontrollo è basata su uno o più possibili fattori, quali antibiosi (Howell 2003), competizione per i nutrienti e micoparassitismo (Elad, 2000; Viterbo *et al*, 2002).

1.6.1 Antibiosi

Per antibiosi s'intende l'inibizione di un organismo mediante la produzione di uno o più metaboliti prodotti da un altro organismo. L'antibiosi si verifica durante l'interazione che coinvolge composti a basso peso molecolare o antibiotici. Spesso questi metaboliti, sono prodotti dalla microflora antagonista in condizioni di scarsa disponibilità di nutrienti (Lewis *et al.*, 1991). Come molti organismi, anche i funghi appartenenti al genere *Trichoderma* producono un'ampia varietà di metaboliti secondari volatili (VOCs) e non volatili, con la caratteristica di inibire altri microrganismi con cui entrano in contatto (Dennis e Weber, 1974a; Dennis e Weber, 1974b).

I metaboliti antifungini più noti, sintetizzati dal genere *Trichoderma* sono: la gliovirina, la gliotossina, i peptaiboli, la trichodermina e le trichozianine, (attive contro numerosi funghi e batteri) e il 6-pentil- α -pirone (6PP), responsabile del profumo di cocco tipico di alcune specie (Vey *et al.*, 2001). La gliotossina, ad esempio, è stata isolata da paglia di grano e semi colonizzati da *T. viride* (Wright 1956). La combinazione di enzimi idrolitici e antibiotici induce più alti livelli di antagonismo rispetto ad un'azione singola. Tale sinergismo, ad esempio, è stato riscontrato fra un'endochitinasi di *T. harzianum* e la gliotossina sulla riduzione di germinazione dei conidi di *B. cinerea* e *F. oxysporum*, che risultava più bassa quando l'enzima era aggiunto dopo gli antibiotici (Howell, 2003). Anche i peptaiboli sono una classe di peptici lineari idrofobici che, oltre ad avere una forte attività antimicrobica contro i batteri gram positivi e funghi, agiscono sinergeticamente con gli enzimi degradando la parete cellulare allo scopo di elicitare la resistenza della pianta e inibire la crescita di patogeni fungini (Jung *et al.*, 1981).

1.6.2 Competizione

Fungistasi

Gli antagonisti come *Trichoderma* spp. sono capaci di sopravvivere in condizioni di competizione molto estrema (Chet *et al.*, 1997).

Preparati a base di *Trichoderma* spp. sono molto efficaci nel controllare parecchi funghi fitopatogeni, come *R. solani*, *P. ultimum* o *Sclerotium rolfsii*, quando alternati con bromuro di metile, benomil, captano o altri prodotti chimici (Vyas e Vyas, 1995).

Competizione per i nutrienti

La competizione per i nutrienti rientra in una forma di controllo biologico in quanto le carenze nutritive rappresentano la più comune morte dei microrganismi. Un importante esempio di competizione per i nutrienti è fornita da alcuni isolati di *Trichoderma* BCAs, produttori di composti siderofori (proteine con un dominio di legame selettivo per il ferro), che sono in grado di chelare il ferro rendendolo indisponibile per gli altri organismi e limitandone così la crescita e lo sviluppo (Chet e Inbar, 1994).

Trichoderma ha, inoltre, l'abilità di ottenere ATP dal metabolismo di differenti zuccheri e, mentre il ruolo del sistema di trasporto del glucosio è ancora sconosciuto, la sua efficacia sembra cruciale nella competizione come riscontrato dall'isolamento di un trasportatore di glucosio ad alta affinità Gtt1, nel ceppo 2413 di *T. harzianum* (Delgado-Jarana *et al.*, 2003). Altri geni che influenzano l'antagonismo dei ceppi di *Trichoderma* sono presenti in fattori di trascrizione responsabili della regolazione delle fonti di carbonio (CreaA), azoto, (AreA), fattori di stress (Msn2/Msn4), pH (PacC) e micoparassitismo (MYC) (Mach e Zeilinger, 2003).

1.6.3 Micoparassitismo

Il micoparassitismo, inteso come l'attacco di un fungo su un altro, è un processo molto complesso che comprende eventi sequenziali: riconoscimento, attacco, penetrazione e morte dell'ospite. E' responsabile di cambiamenti morfologici quali l'arrotolamento e la formazione di strutture; come l'appessorio, che servono a penetrare l'ospite e contengono alte concentrazioni di soluti osmotici come il glicerolo (Benitez *et al.*, 2004).

Trichoderma aderisce al patogeno grazie all'interazione tra molecole complementari, presenti sulla superficie cellulare di entrambi i microrganismi;

successivamente le ife del fungo antagonista avvolgono e penetrano le ife del fungo bersaglio grazie alla formazione di caratteristiche strutture simili a ganci ed appressori. Dopo l'avvolgimento attorno al fungo fitopatogeno, *Trichoderma* penetra grazie alla produzione di una notevole quantità di sostanze dotate di attività antimicrobica e soprattutto enzimi litici come chitinasi e glucanasi, che degradano la parete cellulare del fungo parassitizzato. In corrispondenza delle strutture di ancoraggio sono evidenti sull'ifa del fungo bersaglio, dei veri e propri solchi e fori di penetrazione (Fig. 1.5). Nell'ultima fase dell'interazione antagonista-ospite, *Trichoderma* digerisce il contenuto intracellulare del fungo attaccato, provocando dei cambiamenti morfologici come la vacuolizzazione, la perdita del citoplasma e la disintegrazione delle ife del fungo bersaglio e delle strutture di conservazione (Benhamur e Chet, 1996).

L'importanza di questi enzimi litici è stata dimostrata dalla sovraespressione e delezione dei rispettivi geni (Viterbo *et al.*, 2002). L'indagine sulle vie responsabili del segnale di traduzione in *T. atroviride* durante il micoparassitismo ha condotto all'isolamento di componenti chiave delle vie di segnale cAMP e MAP kinasi, come la subunità α di proteine G (G- α) che controlla enzimi extracellulari, produzione di antibiotici e arrotolamento dell'ifa attorno all'ospite (Benitez *et al.*, 2004).

Il sistema chitinolitico di *Trichoderma* comprende molti enzimi fra cui: 1,4- β -acetilglucosaminidasi (GlcNAcasi), endochitinasi ed exochitinasi.

73-kDa Nag1 rappresenta la principale GlcNAcasi in *T. atroviride*, mentre CHIT 73 e CHIT 102 GlcNAcasi sono le principali in *T. harzianum* TM e *T. asperellum*. In alcuni casi le endochitinasi sono regolate da molti meccanismi ad esempio la loro induzione da stress è stata mostrata per Chit 33 e 42.

Le β -1,3-glucanasi inibiscono la germinazione delle spore o la crescita del patogeno in sinergismo con chitinasi e antibiotici (Howell 2003; Harman *et al.*, 2004). Molte β -1,3-glucanasi sono state isolate ma solo pochi geni sono stati clonati. I trasformanti con sovraespressione di BGN 13.1 inibiscono la crescita di *B. cinerea*, *R. solani* e *P. citrophthora*. L'antagonismo si è rilevato più alto verso *P. citrophthora* - oomicete con cellulosa e glucani come principale componente della parete cellulare – che non verso *B. cinerea* o *R. solani* che presentano chitina

e glucani come principali componenti della parete cellulare (Benitez *et al.*, 1998). Particolarmente interessante è il sinergismo osservato tra questi enzimi e alcuni fungicidi di sintesi, in special modo con i composti inibitori della sintesi degli steroli, quali fusilazolo e miconazolo, comunemente utilizzati per il controllo di diverse malattie fungine. In alcuni casi, il livello di sinergismo risulta particolarmente elevato, suggerendo l'applicazione di queste interazioni tra composti, sia per migliorare la resistenza alle malattie delle piante (Woo *et al.*, 1999) che per la produzione di nuovi formulati anticrittogamici (Lorito *et al.*, 1994). Interazioni fortemente sinergiche nell'attività antifungina sono state trovate con numerosi altri composti, comprese alcune fosfolipasi e diverse proteine PR tra cui l'osmotina (Lorito *et al.*, 1996).

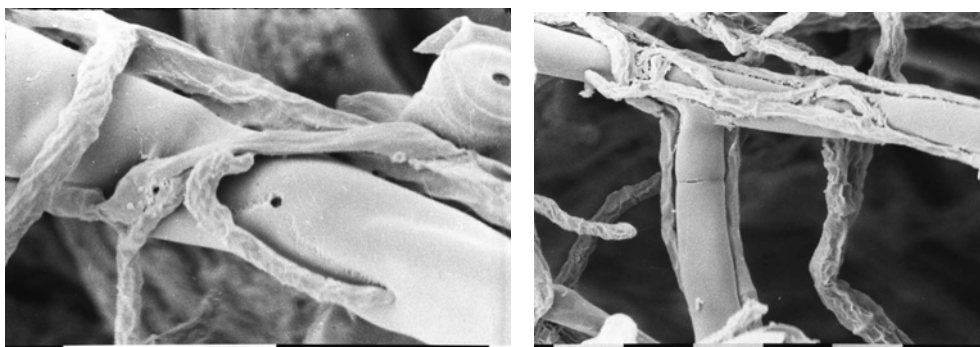


Fig.1.5: Microfotografia al microscopio elettronico a scansione. Si notano gli effetti della parassitizzazione di *T. harzianum* su *R. solani*. Marker = 10 μ m Fonte Manzali *et al.*, 1993.

1.7 Interazione complessa (Pianta – Patogeno – *Trichoderma* spp.)

Fino a poco tempo fa, la ricerca si è interessata principalmente dello studio dei differenti fattori coinvolti nei meccanismi di interazione tra *Trichoderma* e altri funghi, batteri e virus patogeni per la pianta.

Una minore importanza è stata data all'identificazione di geni e prodotti genici che possano svolgere un ruolo di primaria importanza nell'associazione tra i diversi ceppi di *Trichoderma* e la pianta. I pochi studi avviati in tal senso, si sono concentrati su un numero limitato di geni che vengono differenzialmente espressi

in pianta, quando questi funghi colonizzano le radici, spesso indipendentemente dalla presenza del patogeno (Yedidia *et al.*, 2003).

L'analisi proteomica ha portato ad un notevole passo avanti nella valutazione dei determinanti molecolari coinvolti nelle interazioni complesse *Trichoderma*-pianta-patogeno.

Tale tecnica permette di studiare i cambiamenti dell'espressione genica dei tre componenti (pianta-patogeno-antagonista) e di individuare le specie proteiche la cui produzione è alterata o differenziata durante l'interazione multicomponente. L'impiego di questi nuovi strumenti di analisi ha permesso di realizzare un "dialogo molecolare" tra *Trichoderma*, pianta e agente patogeno, permettendo di identificare una varietà di molecole segnale, che vengono scambiate durante queste interazioni. Alcune di queste molecole possono agire come ormoni stimolando la crescita e lo sviluppo della pianta, altre come elicitori, inducendo le risposte di difesa in pianta. La caratterizzazione di ceppi che elicitano risposte di difesa nelle piante rappresenta il punto di partenza per:

- studiare il meccanismo di azione delle singole componenti coinvolte nell'interazione *Trichoderma* - pianta, al fine di isolare, clonare e caratterizzare nuovi geni coinvolti nell'induzione di risposte di difesa;
- trasformare ceppi commerciali di *Trichoderma*, che normalmente non inducono fenomeni di resistenza indotta, con geni in grado di conferire tali capacità;
- modulare l'espressione di geni endogeni di *Trichoderma* coinvolti nell'interazione fungo – pianta cercando di attivare uno stato di ISR in quest'ultima;
- utilizzare i prodotti dei geni coinvolti nell'induzione di resistenza per la formulazione di nuovi biofitofarmaci.

Oggi sono più di 50 le formulazioni a base di *Trichoderma* registrate e commercializzate in diversi Paesi e usate come biopesticidi, biostimolanti e biofertilizzanti su una larga varietà di piante in grado di integrare e, in alcuni casi sostituire, pesticidi di sintesi, riducendo i rischi relativi all'inquinamento ambientale. Di seguito sono riportati alcuni esempi:

Prodotto	Ingrediente attivo	Coltura protetta	Patogeno bersaglio
Binab T™	<i>T. harzianum</i>	Alberi da frutta, ornamentali	Batteri e funghi
Bio-Fungus™	<i>Trichoderma</i> spp.	Ananas, ciliegio	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp</i>
Antagon™	<i>Trichoderma</i> spp	Colture ortive	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i>

1.8 Meccanismi di difesa della pianta

I meccanismi di difesa delle piante non necessariamente richiedono uno stimolo da parte di organismi viventi, in quanto i geni della pianta rispondono sia allo stimolo di numerosi patogeni che a quello degli elicitori. I principali sono: risposta di ipersensibilità (HR), resistenza sistemica acquisita (SAR) e resistenza sistemica indotta (ISR).

La reazione di ipersensibilità rappresenta un sistema di difesa attivo e geneticamente controllato che si manifesta nel giro di 24 ore dal contatto col patogeno. La risposta ipersensibile consiste nella morte delle cellule e dei tessuti infettati per attivazione di un programma di tipo apoptotico (programmed cell death, pcd) previsto dal genoma della pianta stessa o indirettamente in seguito all'accumulo e/o al rilascio di composti tossici prodotti dalle cellule stesse (Buchanam *et al.*, 2000).

Nelle colonizzazioni biotrofiche, tale risposta può essere indotta da messaggeri come acido salicilico, e nelle colonizzazioni necrotrofiche da acido jasmonico ed etilene (Van Wees *et al.*, 2000). E' seguita da eventi biochimici che si manifestano non solo a livello del sito di infezione, ma anche in zone della pianta più distanti, confermando che spesso è causa dello stabilirsi di una resistenza sistemica acquisita (Van Loon, 2000).

1.8.1 La resistenza sistemica acquisita (SAR)

L'induzione di resistenza, sia localizzata che sistemica, si verifica più o meno in tutte le piante a seguito dell'attacco di microrganismi patogeni, di danni fisici causati da insetti o da altri fattori, trattamenti chimici di vario tipo e in seguito alla presenza di rizobatteri non patogeni (Oostendorp *et al.*, 2001). Notevoli progressi sono stati fatti nel chiarimento delle "vie" coinvolte nell'induzione di resistenza, al momento ne sono note tre: due di queste, vedono coinvolta la produzione di PR (pathogenesis-related-proteins). In un caso la produzione di proteine PR avviene a seguito dell'attacco di microrganismi patogeni, nell'altro a seguito di necrosi o ferite provocate da parassiti (es. erbivori, insetti ecc.). Entrambe le vie possono ciò nonostante indurre meccanismi di diverso tipo (Fig.1.6). Nel primo caso - (pathogeninduced - pathways): la pianta produrrà come molecola segnale l'acido salicilico mentre nell'altro - (herbivory-induced pathway) - l'acido jasmonico (Van Loon 2000). Questi composti e i loro analoghi inducono risposte simili anche se applicati esogenamente, inoltre risulta rilevante l'interazione (crosstalk) tra queste due diverse vie (Bostock *et al.*, 2001).

Le vie indotte dall'acido salicilico e dall'acido jasmonico sono caratterizzate dalla produzione di proteine PR (pathogenesis-related-proteins). Queste comprendono: chitinasi, glucanasi, enzimi ossidativi come perossidasi, polifenol-ossidasi e lipossigenasi.

Al momento la terminologia, associata a queste due vie, è molto confusa; per semplicità si indica come SAR (systemic acquired resistance), ciascun processo che vede come risultato il diretto accumulo di proteine PR e fitoalessine (Harman *et al.*, 2004).

Il terzo tipo di induzione di resistenza è quello indotto da rizobatteri non patogeni, ed è indicata come RISR (rhizobacteria-induced systemic resistance). Sebbene da un punto di vista fenotipico l'RISR sia molto simile alla SAR, essa funziona in modo completamente diverso.

La colonizzazione dell'apparato radicale da parte dei rizobatteri non induce infatti una produzione ed un accumulo diretto di proteine PR ed alcuni ceppi batterici sembrano non indurre neppure l'accumulo di acido salicilico (Van Loon e Baker, 2006). Comunque, a seguito dell'attacco di un patogeno, la pianta, in presenza di

rizobatteri, aumenta le sue capacità di risposta e si ha una diminuzione di gravità della malattia. L'RISR determina, quindi, un potenziamento delle risposte di difesa della pianta, senza la cascata di eventi tipica delle vie dell'acido salicilico e jasmonico (SAR) (Harman *et al.*, 2004).

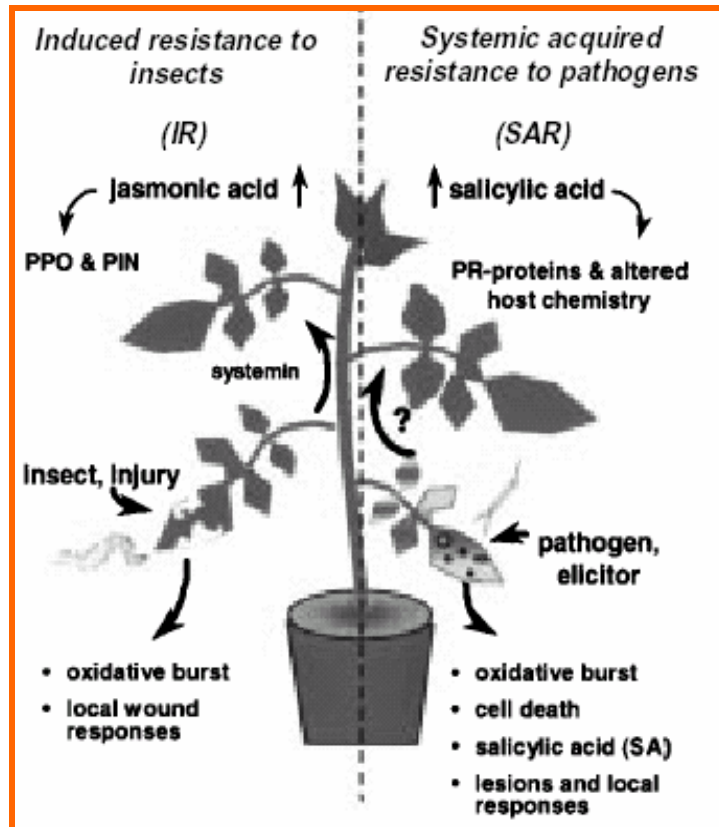


Fig.1.6: SAR e ISR. Foto da Bostock *et al.*, 2001.

1.8.2 L'induzione di resistenza in *Trichoderma*

Recenti studi hanno messo in evidenza la capacità di *Trichoderma* spp. di indurre sia una resistenza di tipo sistemico che localizzato nei confronti di molti patogeni (Harman *et al.*, 2004). La prima dimostrazione di induzione di resistenza da parte di *Trichoderma* spp. venne pubblicata nel 1997 da Bigirimana *et al.* Questi autori dimostrarono che il trattamento del suolo con *T. harzianum* T-39 permetteva la crescita di piante di fagiolo resistenti alle malattie causate da *B. cinerea* e *Colletotrichum lindemuthianum*.

Studi simili sono stati effettuati su diverse piante sia monocotiledoni che dicotiledoni e con differenti specie ed isolati di *Trichoderma*:

- *T. virens* G-6, G-6-5 e G-11 ha indotto resistenza in piante di cotone contro *R. solani* (Howell e Stipanovich, 1995);
- *T. asperellum* T-203 ha indotto resistenza in piante di cetriolo contro *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Yedidia *et al.*, 2003).
- *T. harzianum* T-22 ha indotto resistenza in piante di mais contro *C. graminicola*.

Una delle scoperte più interessanti è stata quella relativa all' induzione di resistenza da parte del ceppo *T. harzianum* T-22 su pomodoro contro *A. solani*. Il ceppo T-22 rizosfera-competente ha infatti fornito un controllo sia spazialmente che temporalmente distante dal punto e dal momento di applicazione. L'infezione naturale causata da *A. solani* sulle foglie di pomodoro è stata sostanzialmente ridotta tramite l'applicazione del ceppo T-22 sulle radici avvenuta ben più di cento giorni prima. Non si sa ancora quanto possa essere la durata dell'induzione di resistenza in assenza del ceppo di *Trichoderma* inducente, comunque sembra che nel caso di ceppi rizosfera-competenti, possa essere a lungo termine (Harman *et al.*, 2004).

I dati finora ottenuti indicano quindi che la resistenza localizzata e sistemica indotta è una componente importante del biocontrollo di *Trichoderma* spp.. E' bene comunque ricordare che meccanismi diversi potrebbero essere responsabili del biocontrollo di ceppi differenti, su piante differenti e con patogeni differenti.

1.8.3 Proteine PR

Le cellule delle piante sintetizzano molti composti in grado di svolgere un ruolo protettivo nella difesa delle piante. Fra questi citiamo:

- le proteine (PR) (Datta e Muthukrishnan, 1999).

Le proteine PR sono state identificate per la prima volta nelle foglie di tabacco, in un caso di induzione a seguito di reazione di ipersensibilità, causata da infezioni con il virus del mosaico TMV (Van Loon e Van Kammen, 1970).

Le proteine PR sono state suddivise in 17 famiglie in base ad omologie strutturali (Christensen *et al.*, 2002) (Tab.1.1). All'interno di ciascuna famiglia di proteine PR esistono sia isoforme extracellulari di solito secrete nell'ambiente extracellulare (apoplasto), che intracellulari con localizzazione vacuolare (Van den Bulcke *et al.*, 1989). Questo riflette, probabilmente, l'esigenza per la pianta di possedere due linee difensive attive distinte; la prima più esterna, rappresentata dallo spazio extracellulare che porta all'indebolimento del patogeno prima che questo possa superare le barriere passive, la seconda più interna, rappresentata dal vacuolo che costituirebbe un'ulteriore difesa in caso di ingresso all'interno della cellula.

Proteine PR-1. Le proteine PR-1 presentano un peso molecolare di 15-17 kDa con isoforme sia acide che basiche e sono state ampiamente caratterizzate dal punto di vista molecolare, ma la funzione biologica è fino ad oggi sconosciuta. Svolgono un ruolo centrale nei meccanismi di difesa delle piante in quanto sono fortemente indotte in risposta ad infezioni da parte di patogeni e a trattamenti con SA ed etilene (Van Loon e Van Strien, 1999).

Proteine PR-2. Sono le β -1,3-glucanasi, presenti nel regno vegetale e rappresentano una delle prime famiglie di proteine PR di cui sia nota l'attività enzimatica (Kauffmann *et al.*, 1987). Esistono svariate isoforme che differiscono nel peso molecolare, punto isoelettrico, struttura primaria, localizzazione cellulare e regolazione genica. Le β -1,3-glucanasi si possono accumulare in seguito dell'attacco di patogeni (Linthorst, 1991), ma anche durante molti processi fisiologici come: la germinazione del seme, la mobilizzazione del callosio (Abeles e Forrence, 1970), la maturazione dei frutti (Hitton e Pressey, 1980). La loro espressione è indotta anche da stress, ormoni (Felix e Meins, 1987) ed elicitori fungini (Lamb *et al.*, 1989).

Proteine PR-3, PR-8, PR-11. Sono chitinasi, enzimi che idrolizzano la chitina, un polimero costituito da unità di N-acetilglucosammina unite da legami glicosidici β -1,4. Queste famiglie enzimatiche presentano un peso molecolare che varia tra 25 e 35 kDa. Tutte le chitinasi delle piante fino ad ora isolate mostrano una attività endochitinasica e differiscono nella struttura primaria, punto isoelettrico e localizzazione cellulare. Sulla base della struttura primaria esse

vengono raggruppate in 5 classi. La classe I comprende proteine basiche caratterizzate da un dominio N-terminale ricco in cisteina capace di legare la chitina, ed un dominio catalitico C-terminale altamente conservato dotato di attività chitinolitica. Gli enzimi di classe II sono privi del dominio N-terminale legante la chitina, ma mostrano una notevole identità di sequenza con il dominio catalitico delle chitinasi di classe I.

Gli enzimi di classe IV presentano un peso molecolare minore per effetto di tre delezioni nel dominio N-terminale e una delezione nel dominio C-terminale (Nielsen *et al.*, 1994). Le chitinasi di classe I, II e IV vengono riunite nella famiglia delle PR-3.

Gli enzimi di classe III sono caratterizzati da una attività chitinasi-lisozima e non mostrano identità di sequenza con le altre classi di chitinasi, per questo motivo sono state raggruppate nella famiglia PR-8.

Infine, le chitinasi di classe V presentano una attività antifungina e sono state raggruppate nella famiglia delle proteine PR-11 (Melchers *et al.*, 1994).

La sintesi di chitinasi è fortemente indotta in risposta ad agenti abiotici quali etilene e SA, fattori biotici quali funghi, batteri, virus e viroidi, e da elicitori di origine fungina o endogena. Spesso l'induzione delle chitinasi è accompagnata dall'accumulo di β -1,3-glucanasi e di altre proteine PR. Saggi di attività antifungina *in vitro* hanno dimostrato che le chitinasi inibiscono la crescita di diversi funghi patogeni, ed inoltre, presentano un effetto sinergico con le β -1,3-glucanasi (Melchers e Stuiver, 2000).

Proteine PR-4. Le proteine che appartengono a questa famiglia presentano pesi molecolari compresi tra i 13 e i 20 kDa. Tali proteine vengono classificate nelle classi I e II, sulla base della presenza o assenza di un dominio N-terminale ricco in cisteina (Caruso *et al.*, 1996).

Proteine PR-5. Appartengono a questa famiglia l'osmotina e la zeamatina (Roberts e Selitrennikoff, 1990). Possiedono, inoltre, una spiccata attività antifungina nei confronti di un largo spettro di funghi fitopatogeni che consiste nell'inibizione dell'allungamento ifale e della germinazione delle spore. In particolare il meccanismo di inibizione dell'osmotina consiste nella permeabilizzazione della membrana plasmatica attraverso la formazione di pori.

Le proteine appartenenti a questa famiglia sono suddivise sulla base del punto isoelettrico (pI) in tre classi: acide, neutre e basiche (Koiwa *et al.*, 1994).

Proteine PR-6. Le PR-6 raggruppano gli inibitori di proteinasi; questi sono proteine di difesa regolate durante lo sviluppo della pianta ed indotte in risposta ad attacchi di patogeni e insetti. Le proteinasi sono largamente distribuite nel regno vegetale e possono essere suddivise in 4 classi in base al meccanismo di azione: proteinasi a serina, a cisteina, aspartico-proteinasi e metallo proteinasi (Ryan, 1973).

Proteine PR-9. Le PR-9 comprendono le perossidasi, che nel regno vegetale sono state estensivamente studiate e ben caratterizzate dal punto di vista biochimico.

Utilizzano il perossido di idrogeno per l'ossidazione di substrati organici e inorganici (fenoli, indoli, lipidi e ioni metallici coordinati ad altre proteine). La superfamiglia delle perossidasi delle piante è suddivisa in tre classi: la classe I comprende isoforme intracellulari, la classe II le perossidasi fungine, mentre la classe III include molte isoforme extracellulari.

Le perossidasi delle piante sono implicate in una grande varietà di processi fisiologici quali il metabolismo dell'auxina, la biosintesi dell'etilene, la formazione della lignina, nonché nei meccanismi di crescita e senescenza (Gaspar *et al.*, 1991). In particolare sono coinvolte nei processi di lignificazione e rafforzamento della parete cellulare svolgendo un ruolo attivo nei meccanismi di difesa delle piante (Passardi F. *et al.* 2004). Cambiamenti nell'attività delle perossidasi durante le reazioni di resistenza e suscettibilità sono stati osservati in molte interazioni pianta-patogeno ed è stato visto che isoforme acide extracellulari di perossidasi possano aumentare la resistenza mediante la costruzione o il rafforzamento delle barriere fisiche. Ad esempio, incrementi in attività perossidasi sono stati osservati nelle reazioni di resistenza in riso, frumento e orzo mentre in interazioni di suscettibilità tali reazioni sono ritardate o, addirittura, non indotte (Caruso *et al.*, 2001).

Proteine PR-12. Le proteine che appartengono a questa famiglia, dette anche defensine, sono state isolate da 13 specie vegetali e sono piccoli peptidi (45-54 amminoacidi) con 8 cisteine, 2 glicine, un residuo aromatico e un residuo di acido glutammico altamente conservato (Broekaert *et al.*, 1995). Le defensine sono

componenti importanti dei sistemi di difesa della pianta, perché coinvolte nella protezione del seme nelle prime fasi della germinazione. Parecchi membri di questa famiglia inibiscono infatti la crescita di funghi fitopatogeni (Terras *et al.*, 1995).

Proteine PR-13. Comprendono le tionine che sono proteine basiche ricche in cisteina a basso peso molecolare (5 kDa) ed identificate in dicotiledoni e monocotiledoni. Tutte le tionine mostrano una elevata attività antifungina *in vitro*.

Proteine PR-15, -16 e -17. Le conoscenze al riguardo di queste famiglie di proteine PR sono piuttosto scarse, infatti, sono state rilevate solo recentemente. In particolare le PR-15 e -16 sono tipiche di monocotiledoni e comprendono famiglie di ossidasi (Bernier e Berna, 2001). Le PR -17 sono state ritrovate in tabacco infetto e frumento (Christensen *et al.* 2002).

Famiglia	Ospite	Proprietà	Gene	Riferimento
PR-1	Tobacco PR-1a	antifungal	<i>Ypr1</i>	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-2	Tobacco PR-2	b-1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (<i>Glb'</i>)]	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-3	Tobacco P, Q	chitinase type I,II, IV,V,VI,VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>	Van Loon, 1982
PR-4	Tobacco 'R'	chitinase type I,II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>	Van Loon, 1982
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like	<i>Ypr5</i>	Van Loon, 1982
PR-6	Tomato Inhibitor I	proteinase- inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (<i>'Pin'</i>)	Green e Ryan, 1972
PR-7	Tomato P ₆₉	endoproteinase	<i>Ypr7</i>	Vera e Conejero, 1988
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	Tobacco 'lignin- forming peroxidase'	peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR-10	Parsley 'PR1'	'ribonuclease-like'	<i>Ypr10</i>	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin	<i>Ypr12</i>	Terras <i>et al.</i> , 1992
PR-13	Arabidopsis THI2.1	thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR-14	Barley LTP4	lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>	García-Olmedo <i>et al.</i> , 1995
PR-15	Barley OxOa (germin)	oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	Barley OxOLP	'oxalate oxidase- like'	<i>Yrp16</i>	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	Tobacco PRp27	unknown	<i>Yrp17</i>	Okushima <i>et al.</i> , 2000

Tab. 1.1: Elenco delle famiglie di Proteine PR. Fonte: Van Loon *et al.*, 1999.

2.SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni la lotta a *Cercospora beticola* Sacc., è imperniata sull'attuazione di programmi di lotta alternativi in quanto è stata resa di difficile attuazione a seguito della revoca dal mercato dei prodotti stannorganici e alla comparsa di ceppi di resistenti ai principali fungicidi monosito. L'utilizzo di isolati di un fungo antagonista *Trichoderma* verso *C. beticola* sia in serra che in condizioni di pieno campo, ha evidenziato un effetto significativo di riduzione dell'entità di sporificazione del fungo (Cerato *et al.*, 2004).

L'obiettivo di questa ricerca è stato, quindi, di determinare la possibilità di induzione di resistenza nel modello barbabietola-cercospora, attivato da elicitori biologici come *Trichoderma* spp. e chimici mediante l'espressione di alcune proteine PR, che si inseriscono nei complessi meccanismi di difesa biochimici post-infezionali, come chitinasi (**Proteine PR-3, PR-8, PR-11**), glucanasi (**Proteine PR-2**) e perossidasi (**Proteine PR-9**).

A tale scopo sono state utilizzate due varietà di *Beta vulgaris* var. *saccharifera*, Aaron e Faro con diversa suscettibilità a *C. beticola*. Tali varietà sono state trattate 7 giorni prima dell'inoculo patogeno con elicitori biologici selezionati da prove di antagonismo *in vitro*: *T. harzianum* con media attività antagonistica, *T. atroviride* con elevata attività ed un biofungicida commerciale.

Come trattamenti di confronto sono stati usati elicitori chimici quali Bion® e Acido salicilico (SA).

3.MATERIALI E METODI

3.1 Isolamenti di *Trichoderma* spp.

Per il reperimento di *Trichoderma* spp. sono stati analizzati 10 campioni di substrato (compost e terreno agrario), prelevati in diversi periodi stagionali e provenienti da varie aree agricole italiane a diversa destinazione agronomica. Cinque provenivano da compost inseminati con *Agaricus bisporus* con sintomi di muffa verde (Fig. 3.1) e cinque da campioni di terreno a diversa destinazione agronomica (insalata, fragola, mais, frumento ed ortensia).



Fig. 3.1 Presenza di muffa verde su un campione di compost.

Nell'analisi di campioni di compost, le porzioni colonizzate dalla muffa verde sono state isolate dalla restante paglia mediante l'utilizzo di un bisturi opportunamente sterilizzato in alcool e alla fiamma. Tali porzioni sono state poste al centro di piastre Petri, tre per ogni campione, contenenti il substrato nutritivo PDA (potato dextrose agar, Difco). Tale substrato è stato sterilizzato in beute da 500 ml in autoclave a 120°C a 1 atmosfera per 15 minuti, addizionato di Solfato di Streptomicina (300 mg/l) ed immesso nelle piastre Petri di plastica sterili di 90 mm, in ragione di 15 ml per piastra. Le operazioni di prelievo della paglia presentante l'alterazione, e tutte le operazioni che richiedevano un ambiente sterile, sono state effettuate sotto cappa sterile a flusso laminare verticale (Faster Bio 48).

Le piastre sono state sigillate con parafilm ed incubate in un termostato a 25°C al buio per circa una settimana. Le strutture riproduttive dei funghi sviluppatasi dopo il periodo di incubazione sono state osservate al microscopio ottico per l'identificazione del genere *Trichoderma*.

Nel caso di campioni di terreno agrario, per ciascuno terreno essiccato a temperatura ambiente e sminuzzato con un pestello, sono stati prelevati cinque subcampioni di 10 g . Ogni subcampione è stato posto in sospensione con 90 cc di acqua distillata sterile. La beuta con la sospensione terrosa diluita 1:10 è stata posta in agitatore per 20' a 150 giri/min. Successivamente, sono state preparate diluizioni progressive - tre passaggi, miscelando 9 cc di acqua distillata sterile con 1 cc della diluizione precedente di terreno - fino ad ottenere quella finale 1:10.000. Da tale diluizione è stato prelevato 1 cc, posto sul fondo di ciascuna piastra Petri e poi versati 10 cc di PDA come substrato, in modo da ricoprire uniformemente la piastra. Per ciascun subcampione sono state preparate 10 piastre.

3.2 Colture monosporiche

Le colture monosporiche sono fondamentali per evitare lo sviluppo di colonie miste ed ottenere colture geneticamente identiche al tipo parentale. La seguente metodologia è stata applicata ai 12 isolati fungini:

- Prelievo del micelio da una piastra di PDA e preparazione di una sospensione in 10 ml di acqua sterile;
- dopo una leggera agitazione del tubo, si versa il contenuto in una piastra di agar acqua e si lascia riposare per 30-60 secondi;
- eliminato l'eccesso di acqua, mediante posizionamento della piastra verticalmente, si lascia riposare a temperatura ambiente per 18 ore;
- successivamente allo stereomicroscopio i conidi germinati sono stati prelevati singolarmente e posizionati su piastre di PDA.

3.3 Identificazione dei ceppi su base microscopica

Le caratteristiche microscopiche (angolo delle ramificazioni ifali, distribuzione e forma dei fialidi e caratteri dei conidi) costituiscono gli elementi fondamentali per la distinzione tassonomica delle specie.

I dodici ceppi analizzati sono stati classificati confrontando le loro caratteristiche con quelle riportate in appropriate chiavi tassonomiche (Rifai, 1969; Samuels *et al.*, 2002) e quelli identificati nell'ambito della specie *T. harzianum* confrontati con i tre ceppi di riferimento di biotipo Th1 (T20), Th2 (T7) e Th3 (T18), forniti dalla Dott.ssa Woo dell'Università Federico II di Napoli (Italia). Questi ultimi biotipi, geneticamente distinguibili sono stati ritrovati su funghi coltivati. Due di questi biotipi risultano non patogeni (Th1 e Th3), mentre Th2 (classificato come *T. aggressivum* f. *europaeum*) e Th4 (*T. aggressivum* f. *aggressivum*) sono stati identificati come i più pericolosi per la produzione di funghi coltivati rispettivamente in Europa ed in America (Ospina-Giraldo *et al.*, 1998).

Per ogni ceppo sono osservate le diverse strutture che sono caratteristiche del genere *Trichoderma*:

- conidiofori in forma piramidale, cioè con branche più lunghe nella base che nell'apice dell'ifa principale;
- ramificazioni sia primarie che secondarie appaiate e ad angolo retto;
- fialidi intercalati lungo l'ifa o in verticilli da 2 a 4, più frequentemente in numero di tre, riuniti in ciuffi e a forma di fiasco: più larghi nella parte centrale che alla base e si restringono verso l'apice a formare uno stretto collo;
- conidi apiculati o rotondi, a parete liscia che possono essere riuniti in capocchie mucillagginose;
- clamidospore unicellulari, lisce, subglobose o clavate, intercalari o apicali nell'ifa.

3.4 Allestimento dei campioni per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione

La preparazione dei campioni fungini (Pisi e Filippini, 1994) comprende tre fasi:

1. Fissazione
 2. Disidratazione
 3. Metallizzazione con oro
-
1. Dalle colonie monosporiche cresciute in piastra agar sono stati prelevati dei tondelli circa 1 cm² e posti in buste di carta bibula (2x2 cm).
 2. I campioni sono stati fissati in una soluzione di glutaraldeide al 5% in tampone fosfato 0.1M pH 7.2 per 30min/1ora a 4°C. Per rimuovere il surplus di fissativo i campioni sono stati sottoposti a tre serie di lavaggi in tampone fosfato, 15 min ciascuna a 4°C.
 3. E' stata poi eseguita una disidratazione attraverso una serie di soluzioni acquose di alcol etilico crescenti (10, 30, 50, 75, 95%) per 15 min ciascuno a 4°C. I campioni trasferiti in alcool etilico al 100% per pochi minuti a temperatura ambiente sono poi stati ulteriormente disidratati mediante il CPD (Critical Point Drying) (Balzers 010).
 4. A disidratazione ultimata i campioni tolti dalle buste, sono stati incollati su appositi supporti in alluminio con una colla conduttiva all'argento e ricoperti con un film di oro (Balzers MED010).
 5. Le osservazioni sono state effettuate utilizzando un SEM Philips 515 e le foto impressionate su pellicola Ilford FP4 125 ASA.

3.5 Analisi molecolare

3.5.1 Estrazione del DNA dagli isolati fungini

L'estrazione del DNA genomico dei quindici isolati fungini è avvenuta utilizzando il metodo adattato dal protocollo di Lohdi *et al.* (1994). I campioni sono stati rimoltiplicati in piastre Petri, contenenti PDA, incubati per 7 giorni a temperatura ambiente. Il micelio d'ogni isolato fungino è stato poi messo in sacchetti di polietilene 10x15 cm, immerso in azoto liquido e frantumato grazie all'utilizzo di un piccolo rullo di legno. All'interno d'ogni sacchetto è stato

aggiunto il tampone d'estrazione (1ml pari a 10 volte il volume iniziale), che ha la seguente composizione:

- 2% CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)
- 100 mM Tris-HCl, pH 8
- 20 mM EDTA
- 1,4 M NaCl
- 1,0 % Sodio solfito
- 1,0 % PVP-40

Si è proceduto ad un'ulteriore omogeneizzazione del fluido con l'aiuto del rullo precedentemente utilizzato. Per la denaturazione delle proteine il contenuto è stato versato in tubi da 1,5 ml ed incubato ad una temperatura di 65° C per 15 minuti. Dopo l'incubazione, i tubi sono stati posti in centrifuga "microfuge 22R" (Beckman) a 14.000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente.

Successivamente, 700 µl di surnatante con l'aggiunta di un ugual volume di cloroformio-isoammilico (24:1) sono stati versati in tubi sterili da 1,5 ml. Dopo averli emulsionati, ribaltando più volte il tubo, sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti. La medesima operazione è stata ripetuta prelevando da quest'ultima soluzione 550 µl di surnatante.

In seguito, dopo aver rimosso 450 µl di surnatante, sono stati aggiunti 225 µl di una soluzione 5M di NaCl pH8 con un ugual volume di isopropanolo. Il tutto è stato mescolato e posto a -20°C per tutta la notte. Il giorno successivo, mediante una centrifugazione di 15 minuti a 14.000 rpm, è stata rimossa la porzione liquida e lavato il pellet aggiungendo 500 µl di una soluzione di etanolo 70%.

L'etanolo è stato rimosso centrifugando per 15 minuti a 14.000 rpm ed il campione è stato posto sottovuoto in un'ampolla per asciugare il pellet dai residui di etanolo. Il pellet è stato poi risospeso in 50 µl di acqua distillata sterile.

3.5.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Per identificare molecolarmente i diversi ceppi estratti è stata utilizzata la coppia di primer universali ITS1 e ITS4 (Tab. 3.1) che amplifica la regione ITS (Internal

Transcribed Spacers) del DNA ribosomiale nucleare che comprende le regioni ITS1 e ITS2, il gene per il 5,8 rRNA (RNA ribosomiale) ed una porzione dei geni per il 18S e il 28S rRNA (Fig. 3.2); questa regione è utilizzata in micologia molecolare per studi comparativi tra le specie.

Tabella 3.1 - Primer utilizzati per l'analisi.

PRIMER	SEQUENZA	AUTORE
ITS1 Forward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> (1990)
ITS4 Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White <i>et al.</i> (1990)

I campioni sono stati sottoposti alla reazione di PCR in tubi ThermoStrip 0,2 ml (AB GENE). Ai 5 µl di DNA estratto da ciascun isolato fungino sono stati aggiunti i seguenti componenti:

- Free Mg buffer (10x; Promega) 2,5 µl
- MgCl₂ (25 mM; Promega) 1,5 µl
- “Forward” primer (5 nm/ml) 1,0 µl
- “Reverse” primer (5 nm/ml) 1,0 µl
- miscela dNTPs (10 mM) 0,5 µl
- Taq polimerasi (100 U/µl) 0,25 µl
- SDW 13,25 µl

Per un volume finale di 20 µl.

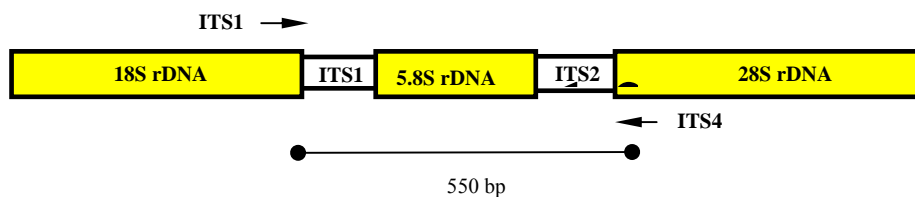


Fig.3.2: Regione ITS del DNA ribosomiale nucleare. Le frecce rappresentano le posizioni dei primer di PCR.

I campioni sono stati amplificati in Thermocycler Biometra T3 come segue:

- fase di denaturazione: 5 minuti a 95°C
- fase di denaturazione: 1 minuto a 94°C
- fase di ibridazione degli oligodesossinucleotidi (annealing): 1 minuto a 55°C

- fase di sintesi: 1 minuto a 72°C

Le ultime tre fasi sono state ripetute 35 volte e seguite poi da 5 minuti a 72°C.

I prodotti ottenuti sono stati analizzati sottoponendone 5 µl ad elettroforesi in gel di agarosio 1,2 % in TBE 1X (54 g di Tris-base, 27,5 g di acido borico, 20 ml 0,5 M di EDTA pH 8,0) impiegando una cella elettroforetica (mod. H213, Scie – Plas) ed evidenziando i frammenti di DNA colorati in soluzione 0,4 µg/ml di bromuro di etidio (EtBr), mediante transilluminatore a luce UV (Spectroline, Model TVL-312A) e successivamente fotografati.

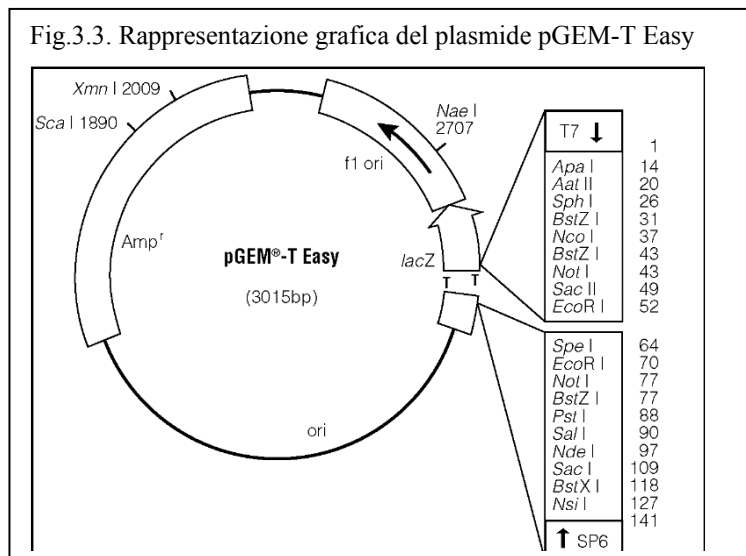
3.5.3 3.5.3. Clonaggio dei prodotti di PCR

A) Reazione di ligasi e trasformazione mediante il kit pGEM-T Easy Vector System (Promega)

La reazione di ligasi e di trasformazione sono state effettuate impiegando il plasmide pGEM-T Easy (Fig.3.3), incluso nel kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) secondo il protocollo Promega. Per la pulizia del prodotto di PCR sono stati aggiunti 50 µl di cloroformio. Dopo aver centrifugato a 13.000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente è stata prelevata la fase acquosa eliminando il cloroformio. Di tale fase acquosa, contenente il prodotto di PCR, per la reazione di ligasi, sono stati impiegati 2,5 µl di prodotto di PCR pulito, unitamente ai seguenti reagenti:

- T4 DNA ligasi 2X buffer 5 µl
- Vettore PGEM-T Easy (Promega) 0,75 µl
- T4 DNA ligasi 0,75 µl
- SDW 1 µl

Il volume totale di 10 µl così ottenuto è stato incubato per tutta la notte a 4 °C.



La reazione di trasformazione è stata effettuata aggiungendo a 10 µl della sospensione della reazione di ligasi 50 µl di cellule competenti JM109 (Promega). Il tutto è stato raffreddato per 20 minuti in ghiaccio poi tenuto a 42°C per 90 secondi in un bagno caldo ed infine raffreddato per 2 minuti in ghiaccio. Lo shock termico è necessario affinché il plasmide venga incorporato nella cellula. Dopo l'aggiunta di 950 µl di LB medium (triptone 10g/l, estratto di lievito 5g/l, NaCl 5 g/l) le cellule sono state incubate per 1 ora e 30 minuti a 37°C in agitazione. Nel frattempo sono state preparate piastre Petri contenenti 30-35ml di LB addizionato di 15 g di agar per litro, ampicillina 100 µg/ml, IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 0,5 mM e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 80 µg/ml. Il mezzo LB con agar è stato precedentemente sterilizzato in autoclave e raffreddato a 50°C prima di unire l'ampicillina, IPTG e X-Gal. Ogni campione è stato distribuito in due piastre: una con 300 µl di sospensione, l'altra con 600 µl. Le piastre sono state incubate tutta la notte a 37°C. Durante questo periodo le cellule batteriche si sono sviluppate assumendo una colorazione blu (non trasformate) o bianca (trasformate).

Al fine di verificare che il prodotto di PCR clonato nel vettore plasmidico fosse quello desiderato, è stata eseguita una reazione di PCR di controllo ("screening"). Con un puntale sono state prelevate le colonie bianche trasferendole su una "master plate" e ponendo successivamente in tubi ThermoStrip 0,2 ml contenente 2 µl di Free Mg buffer (10x; Promega) e 13µl di acqua sterile. Dopo agitazione, il tubo è stato mantenuto a 99,9°C in un termociclatore T3 Thermocycler Biometria

per 9 minuti in modo tale da denaturare i campioni prelevati dalle colonie e favorire la fuoriuscita del DNA plasmidico. Sono stati aggiunti per ogni campione:

- MgCl₂ (50mM; Promega) 0,74 µl
- “Forward” primer (5 nm/ml) 2,00 µl
- “Reverse” primer (5 nm/ml) 2,00 µl
- Miscela dNTPs (10mM) 0,16 µl
- Taq polimerasi 0,10 µl

Il DNA plasmidico è stato così sottoposto a reazione di PCR, utilizzando i primers impiegati inizialmente per ottenere il prodotto di PCR clonato. I prodotti di PCR sono stati poi analizzati su gel di agarosio 0,9%. In base alle dimensioni del frammento ottenuto, circa 850 bp, sono state selezionate le colonie batteriche da sottoporre all'estrazione del plasmide.

B) Estrazione del plasmide ricombinante

La “master plate”, allestita precedentemente, è stata incubata a 37 °C per alcune ore. Successivamente le colonie sono state trasferite in mezzo liquido LB. In un Falcon sono stati aggiunti 10 ml di LB + ampicillina (100µl/100 ml) e la colonia bianca della “master plate,” prelevata con un bastoncino di legno sterile, è stata messa in agitatore a 100-150 rpm a 37°C per tutta la notte.

Per l'estrazione del plasmide e la purificazione dell'inserto è stato utilizzato il kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega) seguendo il protocollo allegato. Al fine di avere ulteriore conferma della avvenuta clonazione il DNA plasmidico, dopo essere stato estratto, è stato sottoposto all'azione di appropriati enzimi di restrizione.

3.5.4 Analisi filogenetica

Il lavoro di sequenziamento è stato eseguito da una compagnia commerciale (MWG - Germany). Le sequenze sono state allineate attraverso il programma di allineamento multisequenze Clustal V method (Higgins e Sharp, 1989) compreso nel pacchetto Megalign (DNASar, Madison, WI, USA). I dati sono stati

analizzati utilizzando il software TREECON (Van de Peer and De Wachter, 1994), calcolando le distanze nucleotidiche con il modello di Jukes and Cantor per costruire un albero utilizzando l'algoritmo di Neighbour-Joining. Per l'analisi di bootstrap si sono campionati 1000 set. La sequenza di *Phaeoacremonium aleophilum* è stata scelta come outgroup.

3.6 Saggi di biocontrollo in vitro

Con i quindici isolati identificati sono state allestite prove di antagonismo *in vitro*, che hanno simulato un confronto diretto tra patogeno ed antagonista in piastra, allo scopo di effettuare uno screening preliminare atto a selezionare i ceppi migliori di *Trichoderma* raggruppandoli in funzione della loro capacità di inibire la crescita del patogeno.

La capacità antagonistica è stata saggiata nei confronti di *Rhizoctonia solani* Kuhn – isolata da radici di fragola, *Cercospora beticola* (Sacc.) – isolata da foglie di barbabietola e *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler – isolata da foglie di cavolfiore.

I diversi microrganismi (i patogeni e l'antagonista) sono stati rimoltiplicati su piastre di PDA alla temperatura di 25°C fino a completo sviluppo.

I saggi di biocontrollo sono stati effettuati prelevando dischetti di 5 mm di diametro dalle colonie sia del patogeno che dell'antagonista e ponendole in piastre di PDA, in posizioni diametralmente opposte. Poiché la velocità di crescita dei micromiceti è diversa, nel caso di *C. beticola*, si è proceduto a trasferire l'antagonista solo quando la colonia del patogeno aveva raggiunto i 3 cm di diametro. Per ogni prova sono state effettuate cinque repliche, più i testimoni. Le piastre sono state incubate in termostato a 25°C per cinque giorni. La prova è stata ripetuta due volte.

La capacità antagonistica è stata valutata in base alla riduzione di crescita del patogeno utilizzando la seguente formula:

$$(R-r/R)*100$$

dove **R**= raggio test **r** = raggio patogeno in piastra con l'antagonista.

La misurazione è stata fatta da metà del tondello sino all'estremità del micelio.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e alla successiva separazione delle medie con il test di Duncan ($p=0.05$).

Oltre l'abilità antagonistica è stata valutata la modalità di esplicare tale fenomeno (D'Ercole *et al.*, 1983):

Micoparassitismo con sovrapposizione dei miceli: quando nel processo di competizione per il nutrimento *Trichoderma* cresce sul *Fusarium* denotando micoparassitismo (antagonismo di tipo fisico);

Lisi con colorazione intensa: quando si crea un semicerchio di colore diverso da quello delle colonie nella zona di contatto dei due miceli, dovuto ad enzimi litici (chitinasi, glucosidasi, amilasi, cellulasi, proteasi, ecc.) che degradano le pareti cellulari del patogeno (antagonismo di tipo chimico);

Distanza: quando i due miceli non vengono a contatto per il presunto rilascio, da parte dell'antagonista, di metaboliti tossici di natura volatile e non (antagonismo di tipo chimico).

3.7 Saggi di biocontrollo in vivo

L'articolazione delle ricerche sugli effetti di alcuni induttori di resistenza acquisita (SAR) su barbabietola da zucchero nei confronti di *C. beticola* si è composta di fasi successive *in vivo*.

Allo stadio vegetativo di sei foglie vere, le piante sono state trattate 7 giorni prima dell'inoculo patogeno con elicitori biologici quali ceppi naturali di *Trichoderma*: uno *T. harzianum* (T148) e l'altro *T. atroviride* (T39) selezionati nelle prove precedenti; un biofungicida Rootshield® a base di *T. harzianum* e con elicitori chimici Bion® (benzo 1,2,3-thiadazole-7carbothioic acido S-methyl ester) e Acido salicilico (SA), quali trattamenti di confronto.

3.7.1 Allevamento delle piante di barbabietola

Barbabietole cv Aaron e Faro, seminate in vassoi alveolari e trapiantate dopo due settimane in contenitori di PET da 25 cc, sono state allevate in cella climatica a 25

°C, 85% di U.R. con un fotoperiodo di 16|8 ore L/B per 11 settimane circa fino al raggiungimento dello stadio di 6 foglie vere ben distese.

Durante questo periodo le piante sono state bagnate due volte a settimana e fertilizzate ogni due. Le varietà scelte mostravano due differenti gradi di tolleranza all'infezione cercosporica, Faro appartiene alla classe B (Buona), mentre Aaron alla M (Media).

3.7.2 Preparazione della sospensione conidica di *Trichoderma*

I due isolati di *Trichoderma*, T39 e T148, dotati rispettivamente di buona e media capacità antagonistica, e il biofungicida Rootshield® (Tc) sono stati allevati su PDB (potato dextrose broth, Difco) per una settimana (Fig. 3.4). Successivamente è stato separato il micelio e il filtrato diluito in acqua distillata fino al raggiungimento della concentrazione di 10^6 conidi/ml. Il conteggio è stato effettuato mediante cella ematocitometrica (Thoma).



Fig.3.4: Da sinistra verso destra sospensione conidica di T148, T39 e del biofungicida commerciale (Tc).

3.7.3 Trattamento delle foglie basali di barbabietola con elicitori biologici e chimici

Piante di barbabietola da zucchero cv. Aaron e Faro sono state trattate 7 giorni prima dell'inoculo con gli elicitori biologici e con le due molecole chimiche alla concentrazione di 5mM (Tonti *et al.*, 2006). I trattamenti sono stati effettuati solo

sulle foglie basali, schermando la restante parte dal getto dell'atomizzatore con un cono di plastica.

Le tesi allestite sono state: non trattato (NT), T39, T148, Tc, SA e Bion® ; sia singole che inoculate col patogeno (*C. beticola* – C). Per ciascuna tesi sono state trattate sei piante e la prova è stata ripetuta due volte.

3.7.4 Preparazione e inoculazione della sospensione conidica di *C. beticola*

Il patogeno è stato allevato, in camera umida, su piante di barbabietola inoculate con sospensione micelica ottenuta miscelando differenti ceppi. Dopo due settimane i conidi sono stati raccolti mediante lavaggio delle macchie, ritagliate in condizioni di asetticità dalle foglie infette, con acqua sterile, energica agitazione e successiva blanda centrifugazione dell'acqua di lavaggio. Il conteggio dei conidi è stato effettuato mediante cella (Thoma) ed è risultato pari a $5 \cdot 10^5$ conidi / ml.

Al momento dell'inoculo le piante precedentemente trattate con gli elicitatori sono state disposte secondo uno schema a randomizzazione completa e su di esse è stato vaporizzato in totale 1l di sospensione conidica.

Le piante sono state coperte con un telo di polietilene al fine di aumentare l'UR (99%), rimosso dopo circa 72 ore.

I rilievi sono stati effettuati in tempi diversi a seconda del parametro da valutare: quelli relativi all'area fogliare interessata da macchie cercosporiche in relazione all'intera lamina sono stati effettuati al 21° giorno, quelli per l'estrazione delle proteine in quattro periodi diversi: prima dell'inoculo (t0) e dopo 7(t7), 14(t14) e 21 (t21) giorni dall'inoculo.

I rilievi, relativi all'area fogliare totale, e all'area interessata da macchie cercosporiche, sono stati effettuati scansionando sei foglie per ciascuna pianta con l'aiuto del software Asses, realizzato dall'American Phytopathological Society. I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e alla successiva separazione delle medie con il test di Duncan ($p= 0.05$).

3.8 Estrazione proteica dalle foglie apicali di barbabietola

Le foglie apicali più giovani, dopo il prelievo ai diversi tempi, sono state congelate a -80°C . Al momento della prova sono state finemente polverizzate in un mortaio freddo con azoto liquido e successivamente sottoposte ad estrazione utilizzando come mezzo il tampone freddo Tris (Trizma[®] Base, Tris[idrossimetil]-amminometano, Sigma) 20 mM, pH 6.8 ($2\text{ g}^{-1}\text{ ml}$ di tessuto fresco), con l'aggiunta di polivinilpolipirrolidone (PVPP) insolubile 1% (Sigma). La sospensione è stata riposta a 4°C per 2 ore in leggera agitazione, quindi filtrata attraverso tessuto Miracloth (Calbiochem, Germany) e centrifugata a 14000 g (centrifuga Beckman) per 40 minuti. Il pellet è stato scartato ed il surnatante è stato conservato in aliquote a -20°C (Buzi *et al.*, 2004). La concentrazione di proteine totali è stata valutata allo spettrofotometro (595nm), utilizzando il metodo Bradford *et al.* (1976).

3.8.1 Analisi delle forme isoenzimatiche di chitinasi

L'analisi quali-quantitativa delle forme isoenzimatiche di chitinasi presenti negli estratti fogliari è stata eseguita mediante la tecnica dell'isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) utilizzando una cella orizzontale Multiphor[®] II 2117 (Pharmacia). Il gel adottato (0,43 mm di spessore, dimensione 12 x 24,5 cm, Clean Gel IEF Ultra, ETC) contenente il 5% di poliacrilammide, prima della corsa è stato reidratato con acqua, glicerolo e Ampholine pH (3-10) (Sinus).

In ciascuno dei pozzetti è stata caricata una quantità di estratto da saggiare corrispondente a 100 μg di proteina totale.

La corsa elettroforetica è stata eseguita a 4°C , seguendo il protocollo indicato dalla ETC. Dopo IEF, è stata seguita la procedura proposta da Trudel e Asselin (1989), ponendo il gel in 100 mL di soluzione tampone di acetato di sodio 0,1 M pH 5,2, sotto agitazione lenta per 10 minuti, allo scopo di allontanare le Ampholine e condizionare il pH. Successivamente, al gel di corsa è stato sovrapposto un gel di saggio (overlay), contenente 2,9 % di acrilammide (p/v),

0,12 % glicol-chitina (p/v), 3,5 % di glicerolo (p/v), 0,012 % di ammonio persolfato (p/v), 0,14 % di TEMED (v/v), 1,4 ml di tampone acetato di sodio 0,15 M pH 5.0 (conc. finale 0,14 mM), volume finale 11.48 ml. La glicol-chitina è stata preparata secondo la procedura di Molano *et al.* (1977). I due gel a contatto, sono stati posti in incubazione per 2 ore a 40°C, con UR prossima alla saturazione. La successiva colorazione del gel di saggio è avvenuta secondo la procedura proposta da Trudel e Asselin (1989), utilizzando Fluorescent Brightener 28 (Calcolfluor White M2R, Sigma Chemical Co.) 0,01 % (p/v) in Tris 0,5 M pH 8.9, per 10 minuti al buio e a temperatura ambiente. Anche il gel di corsa, allo scopo di avere un riscontro, è stato sottoposto a colorazione. Successivamente si è provveduto a tre lavaggi con acqua distillata e alla conservazione del gel a 4°C per tutta la notte. Successivamente si è proceduto alla visualizzazione delle forme isoenzimatiche di chitinasi, corrispondenti a bande scure in cui è avvenuta la degradazione del substrato, attraverso un transilluminatore UV (λ 365 nm). Le bande di attività sono state visualizzate in quanto la fluorescenza è visibile dove è presente la glicolchitina, ma non nelle zone dove essa è stata degradata. I punti isoelettrici sono stati valutati attraverso il calcolo della regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici (Isoelectric Focusing Calibration Kit, Pharmalite 3-10, Amersham).

3.8.2 Saggio dell'attività glucanasica ed analisi delle forme isoenzimatiche

L'analisi delle forme isoenzimatiche di β -1,3-glucanasi presenti negli estratti è stata eseguita secondo la procedura proposta da Pan *et al.* (1989). Dopo IEF, eseguita come descritto precedentemente, il gel è stato lavato con tre passaggi in acqua distillata, quindi immerso in tampone acetato di sodio 50 mM pH 5,2 per 10 minuti. Successivamente è stato incubato a 40°C per 45 minuti in una soluzione di laminarina 0,2 % (p/v) in tampone acetato di sodio 25 mM pH 5,2. Dopo l'incubazione il gel è stato sottoposto ad ulteriori tre lavaggi con acqua distillata e quindi a colorazione con 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (rosso tetrazolio) (Sigma) 0,15 % (p/v) in NaOH 1M, a 100°C, fino a che non si sono rese evidenti le bande

rosse su fondo rosa. Queste corrispondono alle isoforme di attività glucanasica (Pan *et al.*, 1989). I punti isoelettrici sono stati valutati attraverso il calcolo della regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici (Isoelectric Focusing Calibration Kit, Pharmalite 3-10, Amersham).

3.8.3 Saggio dell'attività perossidasi ed analisi delle forme isoenzimatiche

L'analisi isoenzimatica delle perossidasi è stata eseguita secondo Caruso *et al.* (1999). Dopo la corsa in IEF, il gel di acrilammide è stato immerso in tampone fosfato di sodio 0.1 M pH 5,4 per 10 minuti. Successivamente è stato posto in una soluzione di guaiacolo (Farmitalia Carlo Erba) al 4,4 % (v/v) in tampone fosfato di sodio 0.1 M pH 5.4, per 10 minuti, a temperatura ambiente e quindi, dopo immersione in acqua distillata, in una soluzione di perossido di idrogeno (Carlo Erba) 18 % in tampone fosfato di sodio 0.1 M pH 5.4, fino alla comparsa delle bande di colore rosso-bruno. I punti isoelettrici sono stati valutati attraverso il calcolo della regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici (Isoelectric Focusing Calibration Kit, Pharmalite 3-10, Amersham).

4.RISULTATI

4.1 Descrizione dei fenotipi di *Trichoderma*

Dai 10 campioni di substrato pervenuti da diverse aziende dell'Italia settentrionale, sono stati isolati 12 ceppi riferibili al genere *Trichoderma*.

Le colonie sviluppatasi su PDA a 25°C dopo sette giorni di incubazione presentano diversi fenotipi raggruppabili in quattro morfologie (Fig. 4.1).

T145, T147, T168, T169 e T7 (Th2) evidenziano masse conidiche diffuse su tutta la colonia che fanno assumere una colorazione uniforme verde. Questa si presenta raggiata con una zona mediana più compatta e micelio rado intorno al tonello (Fig. 4.1a).

T173 presenta colonie distinte in una zona centrale con produzione di conidi maturi, una zona intermedia con pustole bianche ed un anello periferico verde (Fig. 4.1b).

T30, T79, T106, T143, T148, T187 e T20 (Th1) presentano colonie con anelli concentrici giallo-verdastri in cui sono visibili le produzioni conidiali più compatte. La parte centrale della colonia presenta una formazione più intensa di conidi di colore verde (Fig. 4.1c).

T39 e T18 (Th3) evidenziano colonie granulose, raggiate leggermente più compatte nella parte centrale con un anello giallo-verde periferico (Fig. 4.1d).

4.2 Colonie osservate al microscopio ottico ed elettronico a scansione

Le caratteristiche morfologiche delle diverse colture monosporiche (cm) di *Trichoderma* sono state osservate al microscopio ottico (Fig. 4.2) e al microscopio elettronico a scansione (Fig. 4.3). Tutti i ceppi presentavano le seguenti caratteristiche:

- Conidiofori in forma piramidale, cioè le branche sono più lunghe nella base che nell'apice dell'asse primario (Fig. 4.2a)
- Ramificazioni sia primarie che secondarie appaiate (Fig. 4.2b) e ad angolo retto (Fig. 4.3d).

- Fialidi presenti singoli e intercalati lungo l'ifa o in verticilli da 2 a 4 (Fig. 4.2a), più frequentemente in numero di tre fialidi, riuniti in ciuffi. Sono in tutti i ceppi a forma di fiasco: più larghi nella parte centrale che alla base e si restringono sopra al centro a formare uno stretto collo (Fig. 4.3c). I fialidi solitari tendono ad essere cilindrici con un leggero restringimento all'apice. Il fialide apicale può essere più allungato degli altri (Fig. 4.3b).
- Conidi apiculati o rotondi, a parete liscia che possono essere riuniti in capocchie mucillagginose (Fig. 4.2f, Fig. 4.3c e Fig. 4.3d).
- Clamidospore unicellulari, lisce, subglobose o clavate, apicali (Fig. 4.2f e 4.3e) o intercalari nell'ifa (Fig. 4.3f).

4.3 Analisi molecolare

Il DNA è stato estratto dai 12 campioni fungini oggetto di studio e dai 3 di riferimento. La tecnica della PCR è stata applicata per l'amplificazione della regione ITS del DNA ribosomiale nucleare di *Trichoderma*, l'utilizzo dei primers universali ITS1 e ITS4 porta alla visualizzazione, nella corsa elettroforetica, della banda di circa 620 bp per tutti i campioni (Fig. 4.4).

Per una specifica identificazione dell'appartenenza dei ceppi di *Trichoderma* ai diversi biotipi di *T. harzianum* si è proceduto al clonaggio dei prodotti di PCR ottenuti ed al loro successivo sequenziamento.

In figura 4.5 è visualizzato l'albero filogenetico di tutti i ceppi di *Trichoderma* sequenziati. I ceppi T145, T147, T143, T168, T169, T173 sono affini al ceppo T7 appartenente al biotipo Th2 (*T. aggressivum* f. *europaum*); i ceppi T30, T79, T106, T148 e T187 al ceppo T20 appartenente al biotipo Th1 (*T. harzianum* Complex). Abbiamo riscontrato un solo ceppo (T39) appartenente al biotipo Th3 (*T. atroviride*). Tutti ceppi isolati da compost sono risultati Th2, tranne il T143.

I risultati riassuntivi sono riportati in Tabella 4.1.

Sulla base di questi risultati si riporta una descrizione più dettagliata di *T. harzianum* specie più frequente.

T. harzianum (tel. *Hypocrea lixii*) dopo incubazione di una settimana a 25°C al buio, presenta su PDA colonie talvolta cotonose ricoperte da pustole frequentemente aggregate in anelli concentrici. Si osserva a volte una pigmentazione giallo-bruna diffusa nell'agar e raramente le colonie emanano un odore caratteristico.

I conidiofori generalmente ramificati 2-3 volte con le branche più lunghe appaiate alla base dell'asse principale e le più corte all'apice con angolazioni di 90°.

I fialidi ampolliformi sono ristretti alla base con dimensioni di 2,2-3,5 µm nel punto più largo e 2,5 µm alla base, sono raggruppati in verticilli in numero di 2-4 e solo raramente sorgono singolarmente.

I conidi si formano circa dopo tre-quattro giorni e sono verdi, lisci e apiculati con dimensioni di 2,8-3,4 µm x 3,2-3,9 µm con rapporto fra lunghezza e larghezza compreso fra 1 e 1,3 µm.

Le clamidospore sono presenti, globose (6-9,7 µm), in posizione intercalare o apicale all'ifa.

4.4 Saggi di biocontrollo *in vitro*

La capacità antagonistica saggiata nei confronti di *A. alternata* ha evidenziato una riduzione di crescita molto alta e piuttosto omogenea in tutti i ceppi saggiati (Fig. 4.6). Indipendentemente dal ceppo si è avuta una riduzione media pari al 58% con valori oscillanti fra il 63% (T39, T143, T168 e Th2) ed il 43% per il Th3. Solo l'isolato Th3 ha registrato una riduzione inferiore alla media non differente statisticamente come si evidenzia nell'istogramma di Fig. 4.7

La capacità antagonistica saggiata nei confronti di *C. beticola* (Fig. 4.8) ha mostrato una riduzione di crescita piuttosto bassa e variabile. Si è avuta una riduzione media pari al 14% (Fig. 4.9a) con valore più alto pari al 22% (T39), quello più basso pari all'1% (T187). Con l'elaborazione statistica si sono differenziati sette ceppi con elevata attività di biocontrollo (T39, T79, T143, T145, T147, T169 e Th3) e un ceppo (T187) con attività nulla. La maggioranza dei ceppi ha manifestato attività di micoparassitismo (Fig. 4.9b).

La capacità antagonistica saggiata nei confronti di *R. solani* visualizzata in Fig. 4.10 ha portato in generale ad una riduzione di crescita meno alta rispetto ad *A. alternata* e piuttosto variabile tra i campioni. Si è registrata una riduzione media pari al 27% con valori che oscillano tra il 38% (Th1) ed il 18% (T30). Solo l'isolato T30, infatti, ha registrato una riduzione inferiore alla media differente statisticamente come viene evidenziato in Fig. 4.11a. Gli isolati che si sono distinti sono stati T39, T148, e Th1. Il micoparassitismo è stata la forma di antagonismo più riscontrata nell'ambito dei ceppi di *R. solani* (Fig. 4.11b).

4.5 Saggi di biocontrollo *in vivo*

Per la valutazione degli effetti di alcuni induttori di resistenza acquisita (SAR) su barbabietola da zucchero nei confronti di *C. beticola* si è determinata la percentuale di area necrotica fogliare rapportata all'area totale in piante della cv Faro allevate in cella climatica con l'ausilio del software Asses.

Al prelievo effettuato al 21° giorno dall'inoculo si è evidenziato una minor percentuale di area fogliare malata nelle piante della cv Faro (Fig. 4.12) rispetto a quella di Aaron (Fig. 4.13) nelle tesi inoculate in assenza di trattamento (NT+C).

L'area necrotica fogliare nelle piante della tesi Bion +C (1,3%) della cv Faro è risultata significativamente inferiore rispetto a quella delle piante con solo l'inoculo (7,5%) (Fig. 4.12a). I trattamenti con gli elicitori biologici si sono dimostrati efficaci, garantendo un variabile e significativo contenimento dell'infezione nelle tesi inoculate. In particolare si è avuta una percentuale di area malata che va dall'1,6% del Tc+C, al 2,2% del T 148+C (Fig. 4.12b).

Anche per la cv Aaron i trattamenti con gli elicitori chimici si sono dimostrati validi nelle tesi inoculate, garantendo un significativo contenimento dell'infezione: in particolare si è avuta una percentuale di area malata che va dal 9% in Bion®+C al 6% in SA rispetto alle piante con solo l'inoculo (16%) (Fig. 4.13a). I trattamenti con gli elicitori biologici non si sono differenziati statisticamente dal testimone inoculato (Fig. 4.13b).

4.6 Analisi delle forme isoenzimatiche

I campioni fogliari prelevati a diversi tempi sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) in un range di pH 3-10. Questo range di pH è stato scelto per evidenziare l'espressione di tutte le proteine.

I risultati di ciascuna forma isoenzimatica sono visualizzati per cultivar ed in base alla natura del trattamento (da Fig. 4.14 a Fig. 4.25).

4.6.1 Analisi delle forme isoenzimatiche di chitinasi

In tutte le piante delle tesi della cv Faro trattate con induttori chimici e biologici è stata osservata un'intensa attività chitinasica che converge al massimo in quattro tipi di isoforme con punti isoelettrici (pI): pI 3,5 - 4,3 - 8,80 e 9,30. Le isoforme acide sono più evidenti.

Nelle tesi trattate con gli induttori chimici tali isoforme sono più evidenti a t0 per Bion, a t7 per SA ed SA+C, a t14 solo SA+C e a t21 per Bion+C ed Sa+C (Fig. 4.14).

Nelle tesi trattate con induttori biologici tali isoforme sono evidenti a t0 per T148, a t7 per T148, T148+C, Tc e Tc+C, a t21 solo per Tc e Tc+C (Fig. 4.15).

In tutte le piante delle tesi della cv Aaron trattate con induttori chimici e biologici è stata osservata attività chitinasica prevalentemente costituita da tre tipi di isoforme: pI 3,5 - 4,3 - 8,80 e 9,30.

Nelle tesi della cv Aaron trattate con induttori chimici le isoforme a pI 3,5 e a 4,3 sono più intense a t7 per C, Bion+C ed SA+C, a t14 solo per SA+C e a t21 per tutte. Le isoforme basiche sono meno intense e frequenti solo a t7 (Fig. 4.16).

Nelle tesi trattate con induttori biologici le isoforme più evidenti sono a pI 3,5 e a 4,3 per tutti i tempi tranne t0 che ne evidenziano solo una a 3,5.

Le isoforme basiche sono meno frequenti e sono intense a t7 solo per NT e a t21 in tutte (Fig. 4.17).

4.6.2 Analisi delle forme isoenzimatiche di β -1,3-glucanasi

In tutte le tesi sia della cv Faro che della cv Aaron trattate con induttori biologici e chimici è stata osservata un'intensa attività glucanasica che converge in un solo tipo di isoforma a pI 3,5.

Nelle tesi della cv Faro trattate con gli induttori chimici tale isoforma è stata riscontrata a t0 per NT e a t7 per tutte, a t14 per NT, Bion +C, SA ed SA+C e a t21 per NT+C (Fig 4.18).

Nelle tesi trattate con gli induttori biologici tale isoforma è evidente in t0 per NT e Tc, a t7 per T39+C, T148+C e Tc+C, a t14 per T148+C e a t21 per tutte le tesi trattate e inoculate (Fig. 4.19).

Nelle tesi della cv Aaron trattate con induttori chimici tale isoforma è stata evidenziata a t0 per NT, a t7 per tutte, a t14 per tutte le tesi+C e a t21 per SA+C (Fig. 4.20).

Nelle tesi trattate con induttori biologici tale isoforma è risultata più evidente più o meno in tutti i tempi e in tutte le tesi sia trattate inoculate che trattate non inoculate tranne a t21 per i soli trattati non inoculati (Fig. 4.21).

4.6.3 Analisi delle forme isoenzimatiche di perossidasi

In tutte le tesi sia della cv Faro che della cv Aaron trattate con induttori biologici e chimici è stata osservata un'intensa attività perossidasi che converge in quattro tipi di isoforme: pI 3,5 - 4,0 - 8,90 e 9,30. Le isoforme basiche sono più evidenti.

Nelle tesi della cv Faro trattate con gli induttori chimici le isoforme basiche sono state riscontrate a t0 per NT e Bion, a t7 per Bion, a t14 per Nt, Nt+C e Bion e a t21 per Nt, Bion e Bion +C (Fig. 4.22).

Nelle tesi trattate con gli induttori biologici tali isoforme sono più evidenti nella tesi a t0, t14 e t21, ad eccezione che a t21 per NT+C (Fig. 4.23).

Nelle tesi della cv Aaron trattate con gli induttori chimici tali isoforme sono state riscontrate a t0 per NT e SA, a t7 per Bion+C e SA+C e a t14 e t21 per tutte (Fig. 4.24)

Nelle tesi della cv Aaron trattate con gli induttori biologici tali isoforme sono più

evidenti a t0 per tutte, a t7 per T39+C, T148, T148+C e Tc, a t14 e t21 per tutte (Fig. 4.25).

RISULTATI Figure e grafici



a



b

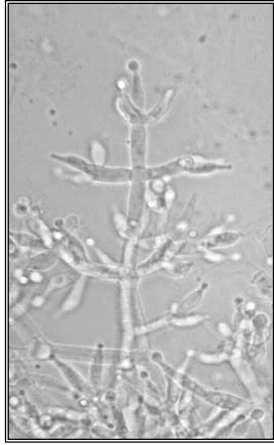


c



d

Foto 4.1: Differenti fenotipi raggruppati in quattro morfologie:
a= T145, T147, T168, T169 e T7 (Th2)
b= T173
c= T30, T79, T106, T143, T148, T187 e T20 (Th 1)
d= T39 e T18 (Th 3)



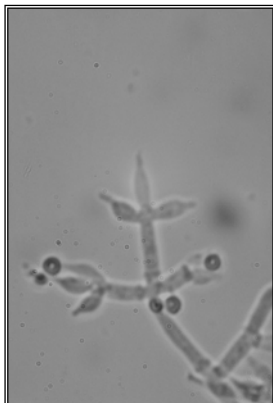
a



b



c



d

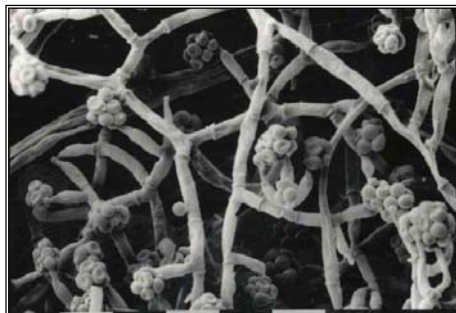


e



f

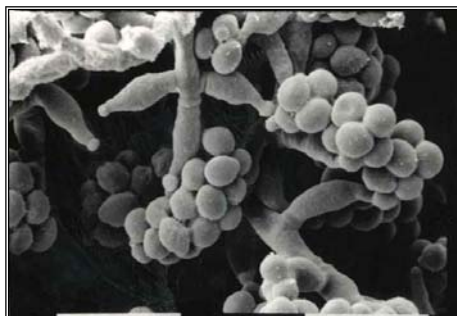
Figura 4.2: Foto al microscopio ottico.
Conidiofori in forma piramidale (a), ramificazioni appaiate (b) o unilaterali (c) con varie angolazioni (b) e (c), fialidi (e) e conidi con clamidospore (f) (500X).



a



b



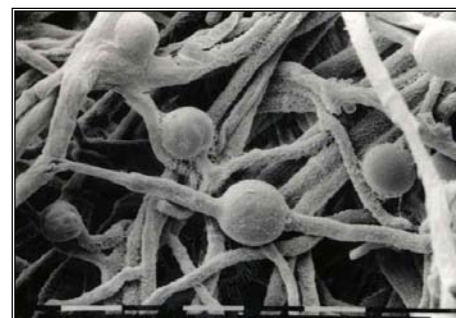
c



d



e



f

Fig 4.3: Foto al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM).
Verticilli da 2-3 fialidi (a), fialide centrale più allungato e ad angolo retto rispetto
agli altri due (b), fialidi più larghi nella parte centrale che si restringono sopra al
centro a formare uno stretto collo (c), ramificazione ad angolo retto rispetto all'ifa
(d), clamidospore apicali (e) e clamidospore intercalari (f).
Marker=10µm

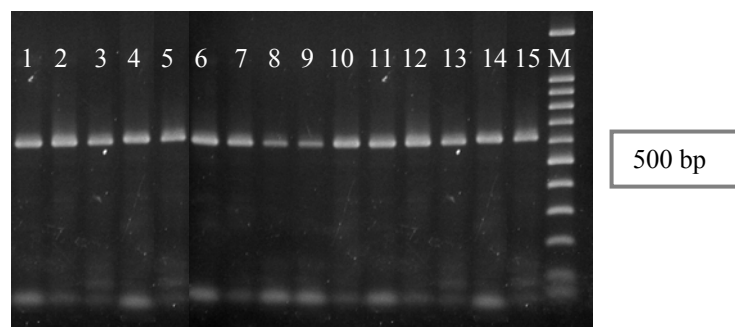


Figura 4.4: Corsa elettroforetica in gel d'agarosio di prodotti di PCR della regione ITS1 – 5.8S – ITS2 di rDNA dei campioni saggiati, ottenuti utilizzando la coppia di primers ITS1 e ITS4; corsia M= marker 100bp DNA Ladder (Promega, USA). In corsia 1 T7, corsia 2 T18, corsia 3 T20, corsia 4 T30, corsia 5 T39, corsia 6 T79, corsia 7 T106, corsia 8 T143, corsia 9 T145, corsia 10 T147, corsia 11 T148, corsia 12 T168, corsia 13 T169, corsia 14 T173 e corsia 15 T187.

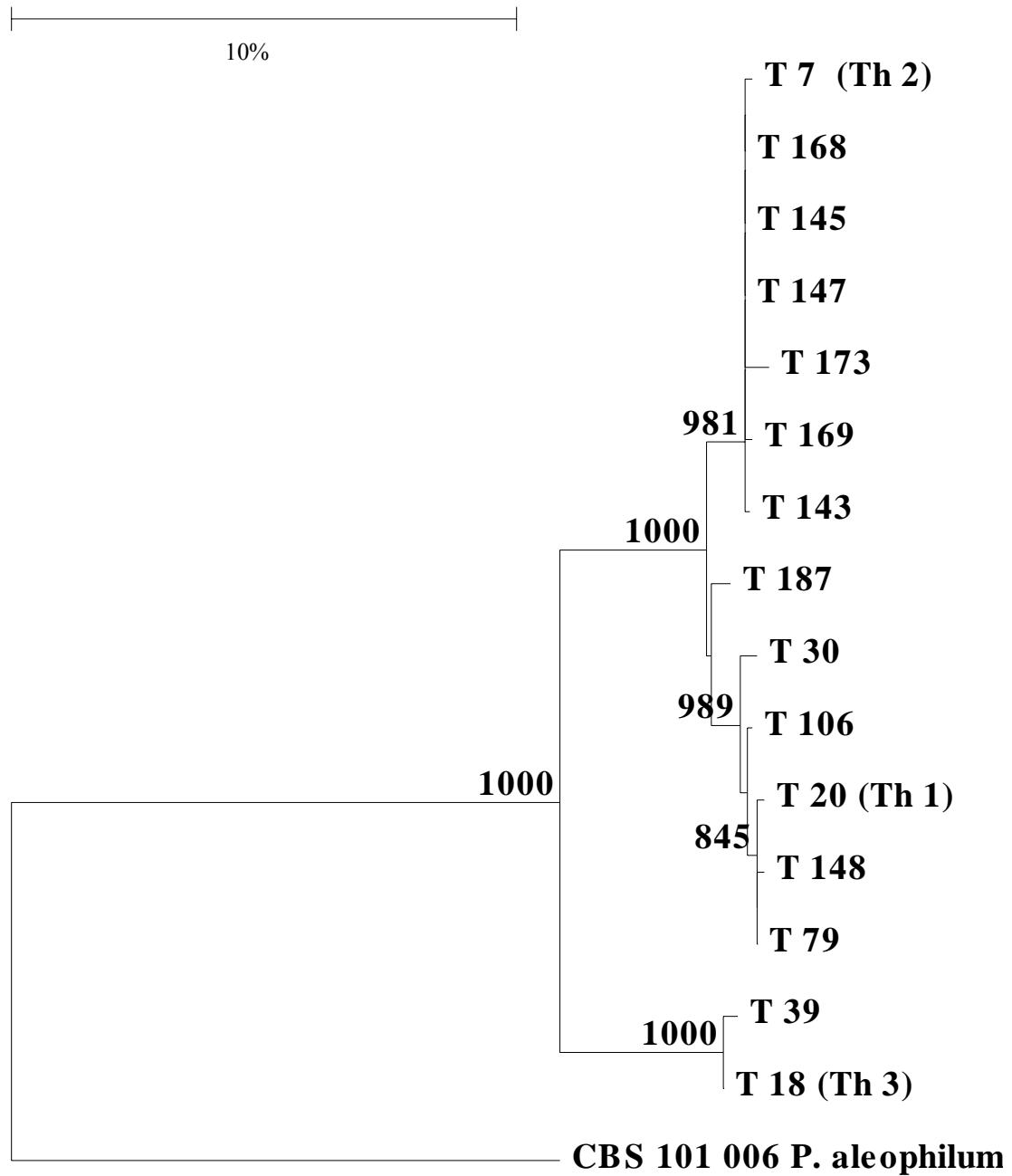


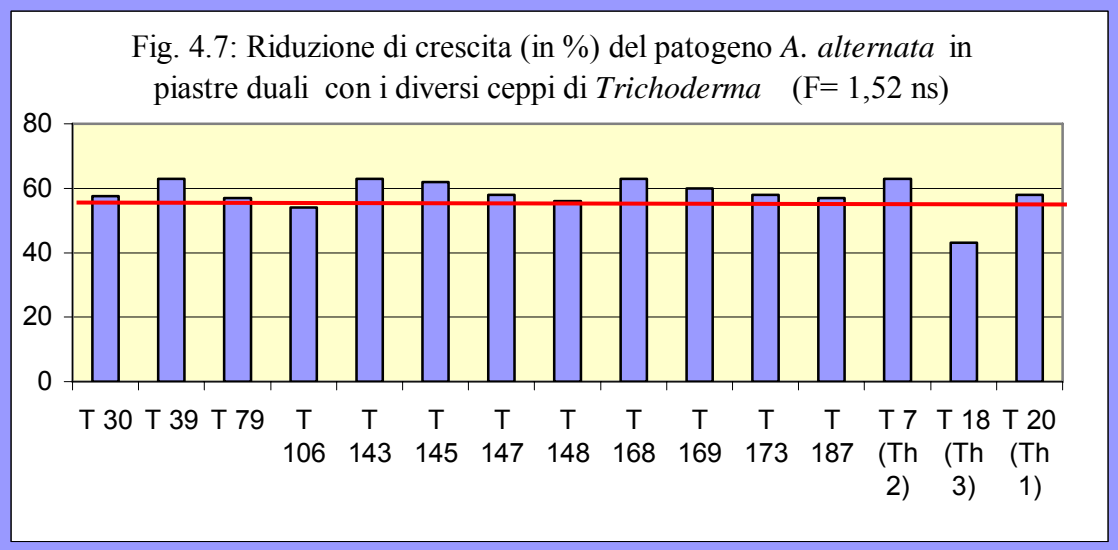
Fig. 4.5: Relazione filogenetica fra i ceppi di *Trichoderma* oggetto di studio basata sull'allineamento delle sequenze della regione ITS del DNA ribosomiale nucleare. Sono state eseguite 1000 repliche per ogni analisi e sono indicati i valori di Bootstrap più alti del 70%. La sequenza di *Phaeoacremonium aleophilum* è stata scelta come outgroup.

Ospite	Numero	Specie
Terreno Insalata	T 30	<i>harzianum</i> Th1 (<i>T. harzianum</i> Complex)
Terreno Mais	T 39	<i>harzianum</i> Th3 (<i>T. atroviride</i>)
Terreno Fragola	T 79	<i>harzianum</i> Th1 (<i>T. harzianum</i> Complex)
Terreno Ortensia	T 106	<i>harzianum</i> Th1 (<i>T. harzianum</i> Complex)
Compost <i>Agaricus</i> A1	T 143	<i>harzianum</i> Th2 (<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaum</i>)
Compost <i>Agaricus</i> B1	T 145	<i>harzianum</i> Th2 (<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaum</i>)
Compost <i>Agaricus</i> A2	T 147	<i>harzianum</i> Th2 (<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaum</i>)
Compost <i>Agaricus</i> B2	T 148	<i>harzianum</i> Th1 (<i>T. harzianum</i> Complex)
Compost <i>Agaricus</i> C	T 168	<i>harzianum</i> Th2 (<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaum</i>)
Compost <i>Agaricus</i> D	T 169	<i>harzianum</i> Th2 (<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaum</i>)
Compost <i>Agaricus</i> E	T 173	<i>harzianum</i> Th2 (<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaum</i>)
Terreno Frumento	T 187	<i>harzianum</i> Th1 (<i>T. harzianum</i> Complex)
Rif.	T 20 (Th 1)	(<i>T. harzianum</i> Complex)
Rif.	T 7 (Th 2)	(<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaum</i>)
Rif.	T 18 (Th 3)	<i>atroviride</i>

Tab 4.1: Specie di *Trichoderma* utilizzate e relativo ospite.



Fig. 4.6: Riduzione di crescita di *A. alternata*, rispetto al testimone a destra.



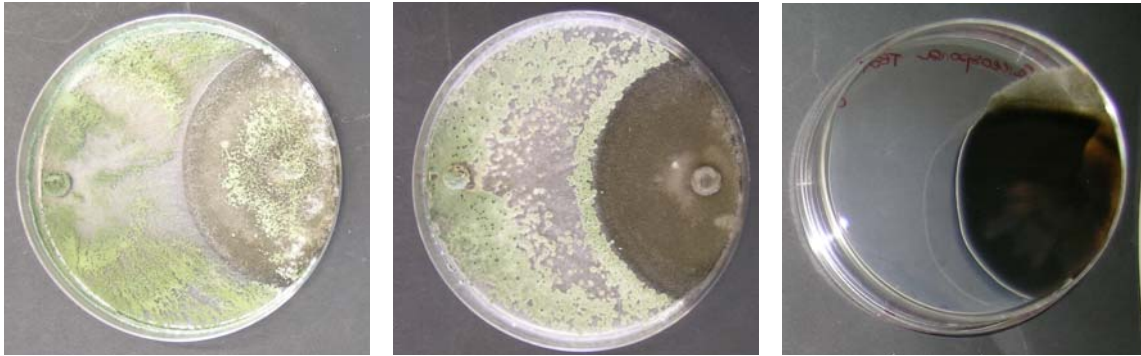


Fig. 4.8: Riduzione di crescita di *C. beticola*, rispetto al testimone a destra.

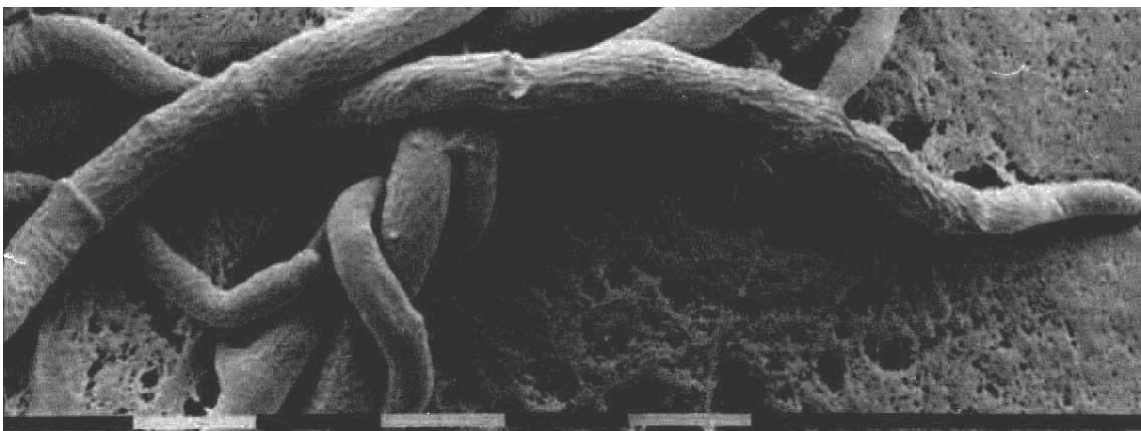
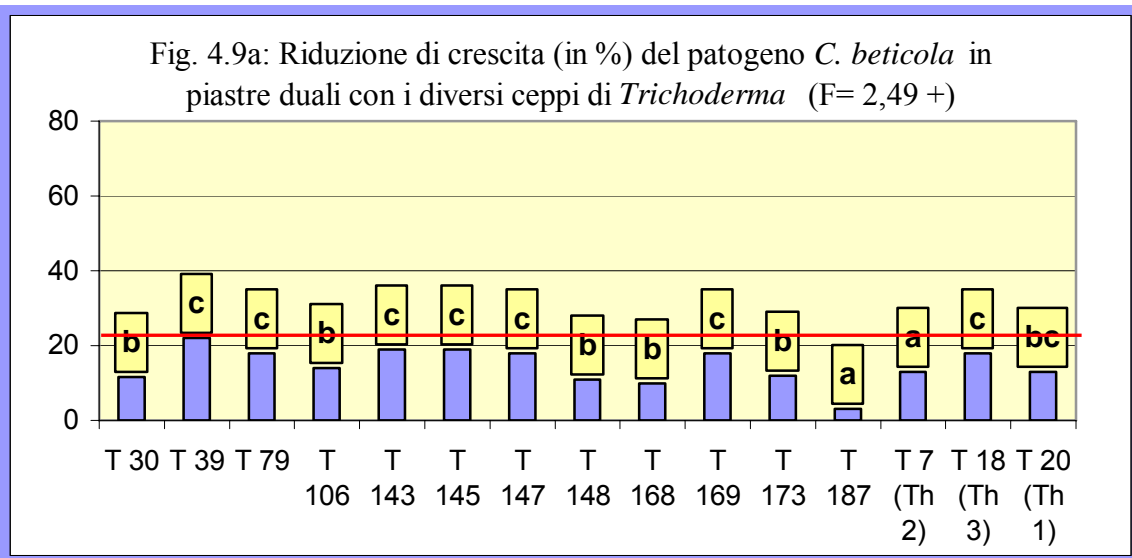


Fig. 4.9b: Foto al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM). Effetto della parassitizzazione di *Trichoderma* su *C. beticola*. Marker=10µm



Fig. 4.10: Riduzione di crescita di *R. solani*, rispetto al testimone a destra.

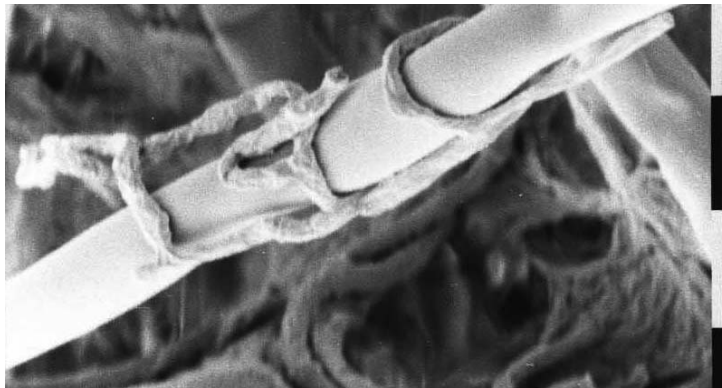
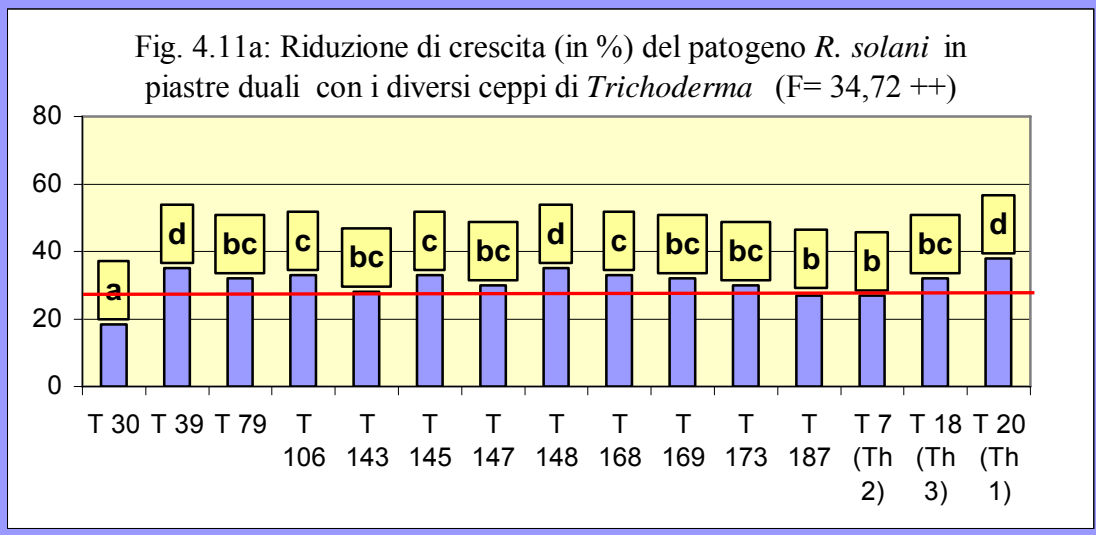
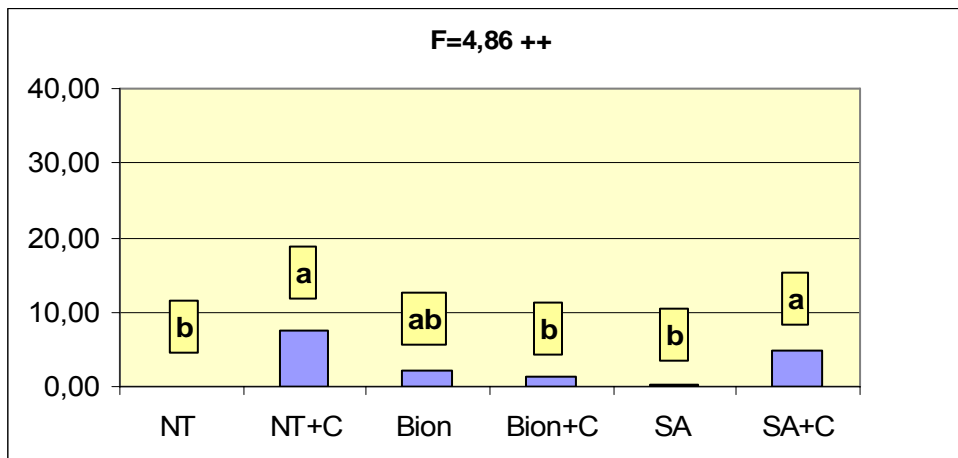
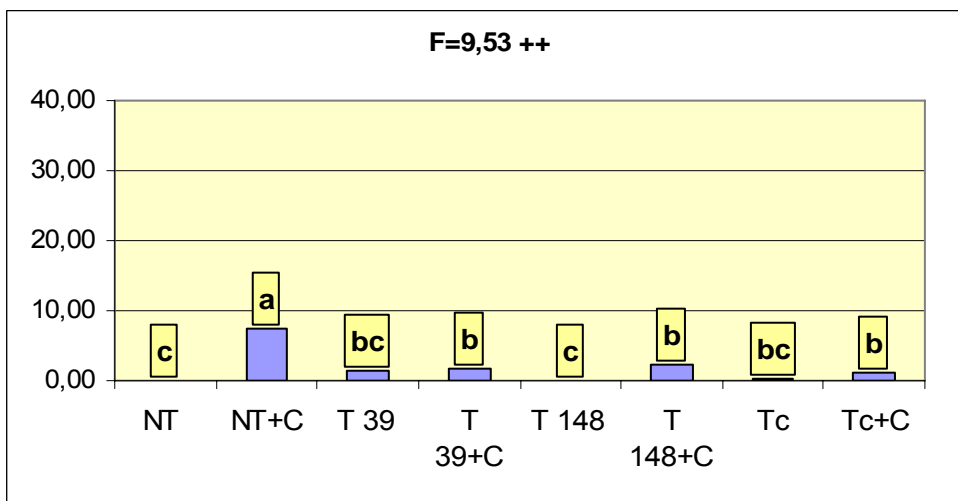


Fig. 4.11b: Foto al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM). Effetto della parassitizzazione di *Trichoderma* su *R. solani*. Marker=10µm

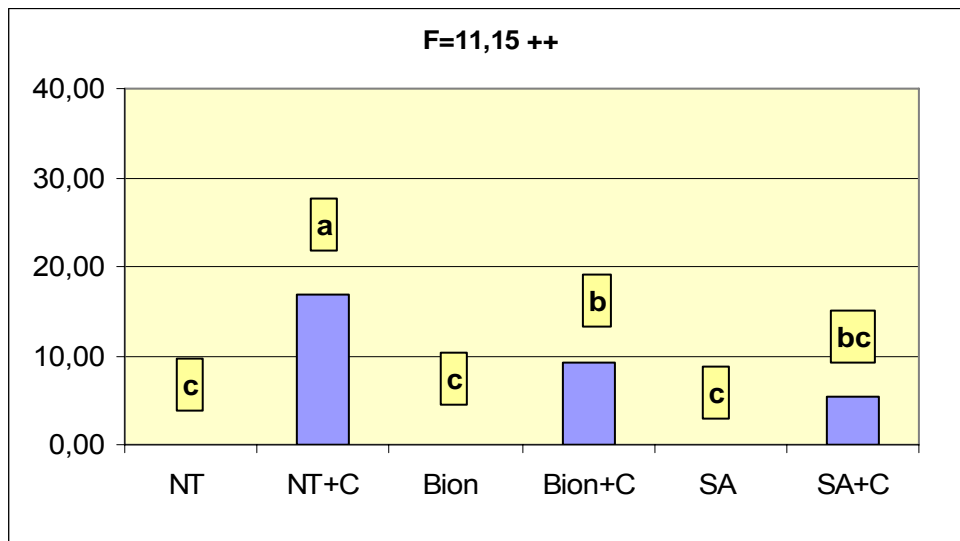


a)

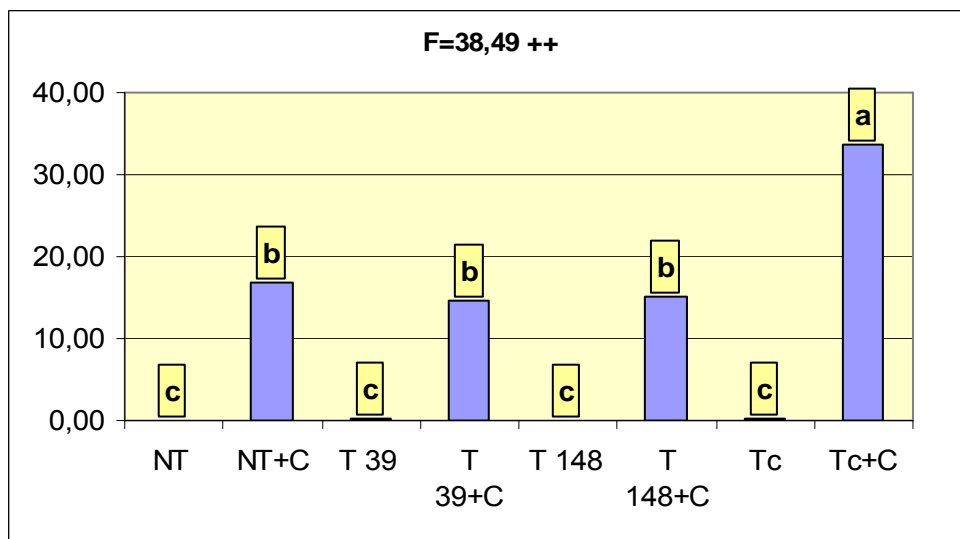


b)

Fig. 4.12: In alto (a) le tesi della cv Faro trattate con gli elicitori chimici; in basso (b) quelle trattate con i biologici. Per l'elaborazione statistica si riportano il valore di F e le lettere risultanti dal test di Duncan con $p=0,05$. Lettere uguali non contraddistinguono le tesi statisticamente.



a)



b)

Fig. 4.13: In alto (a) le tesi della cv Aaron trattate con gli elicitori chimici; in basso (b) quelle trattate con i biologici. Per l'elaborazione statistica si riportano il valore di F e le lettere risultanti dal test di Duncan con $p=0,05$. Lettere uguali non contraddistinguono le tesi statisticamente.

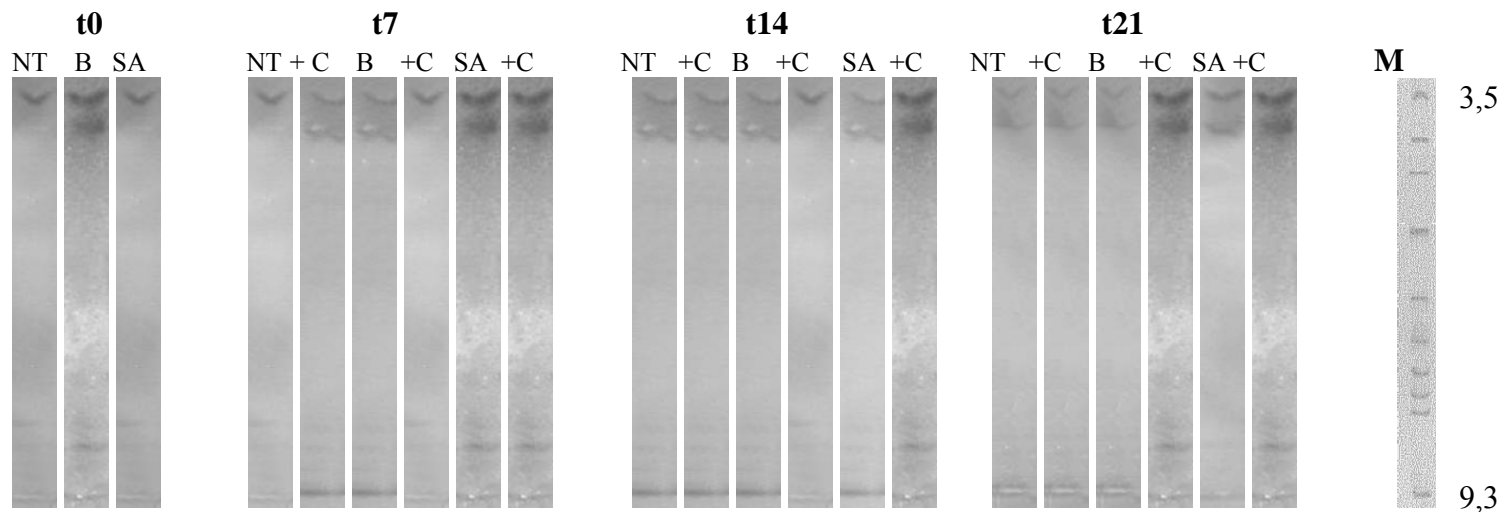


Fig. 4.14: Profilo isoenzimatico di chitinasi in piante di barbabietola cv Faro in seguito a trattamento con acqua (NT), Bion® (B) e Acido salicilico (SA) al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

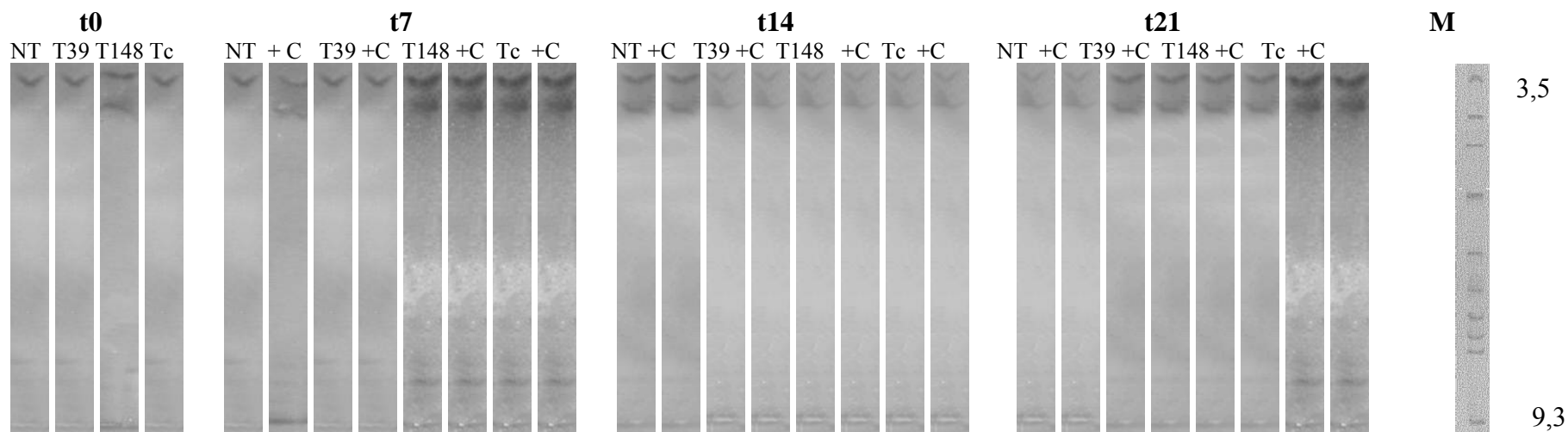


Fig. 4.15: Profilo isoenzimatico di chitinasi in piante di barbabietola cv Faro in seguito a trattamento con acqua (NT) T 39, T148, T. commerciale (Tc) e al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

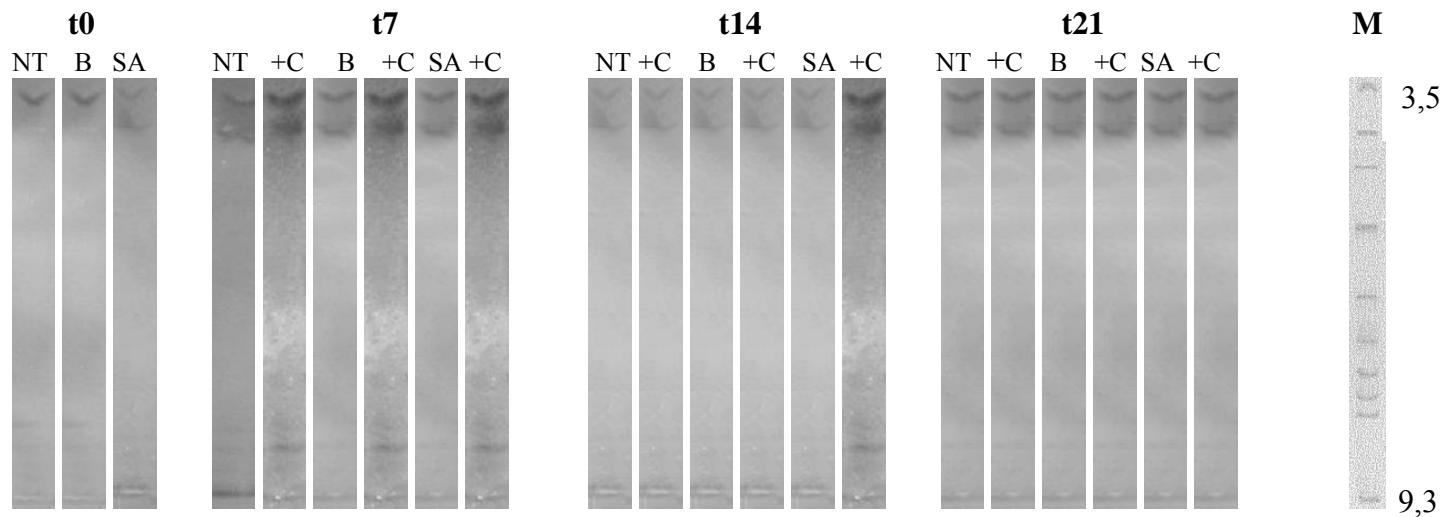


Fig. 4.16: Profilo isoenzimatico di chitinasi in piante di barbabietola cv Aaron in seguito a trattamento con acqua (NT), Bion® (B) e Acido salicilico (SA) al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

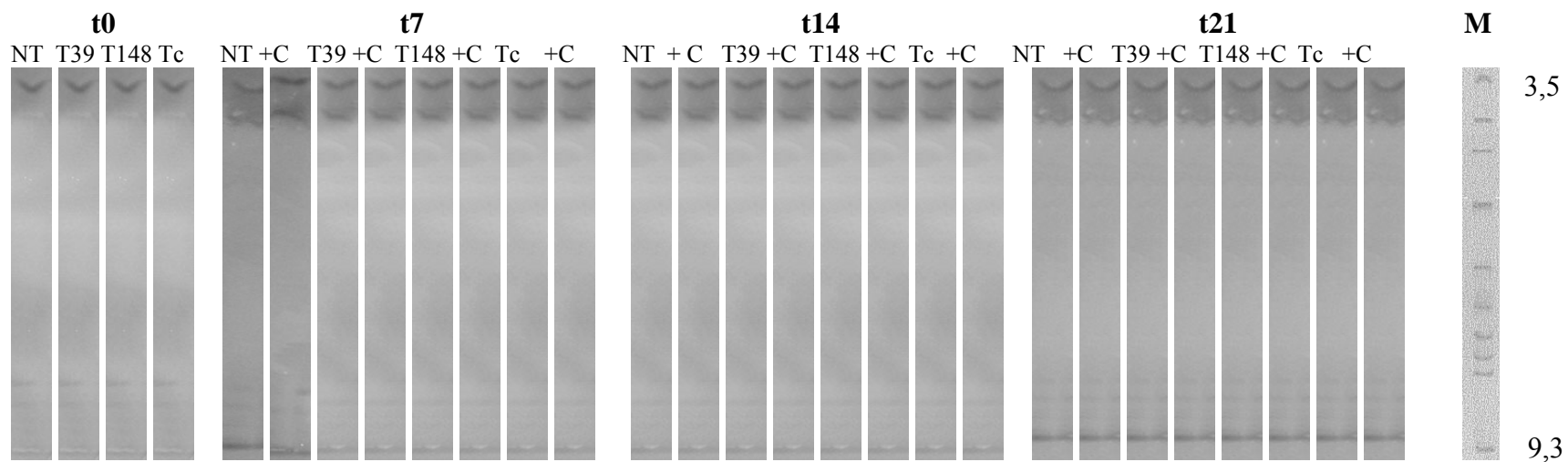


Fig. 4.17: Profilo isoenzimatico di chitinasi in piante di barbabietola cv Aaron in seguito a trattamento con acqua (NT) T 39, T148, T. commerciale (Tc) e al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

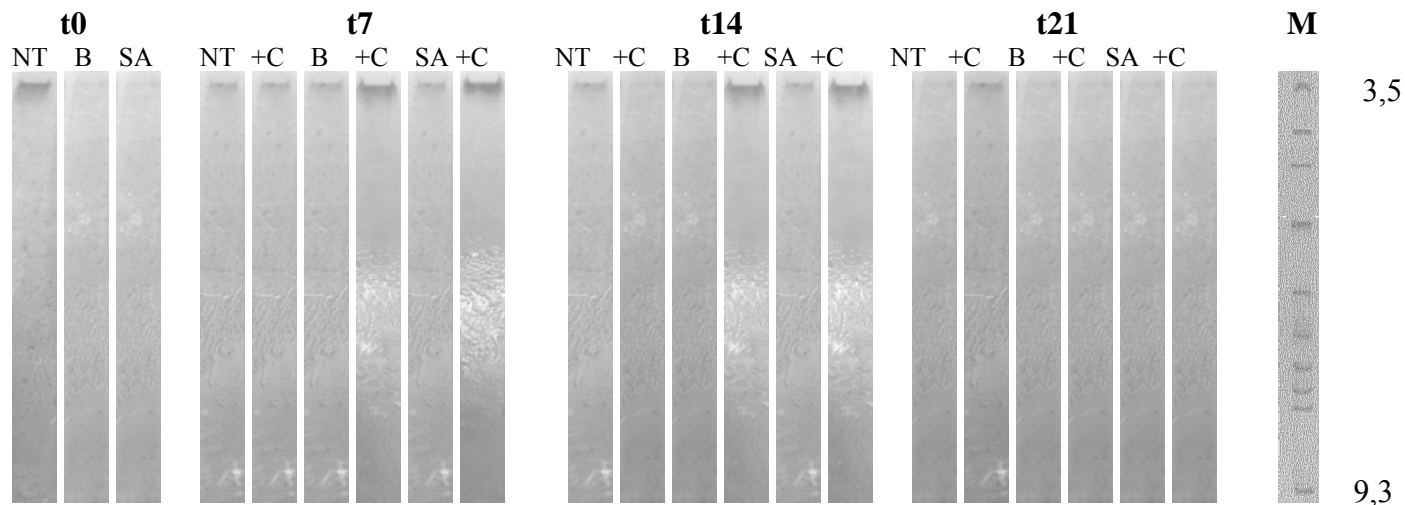


Fig. 4.18: Profilo isoenzimatico di β -1,3-glucanasi in piante di barbabietola cv Faro in seguito a trattamento con acqua (NT), Bion® (B) e Acido salicilico (SA) al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento(M).

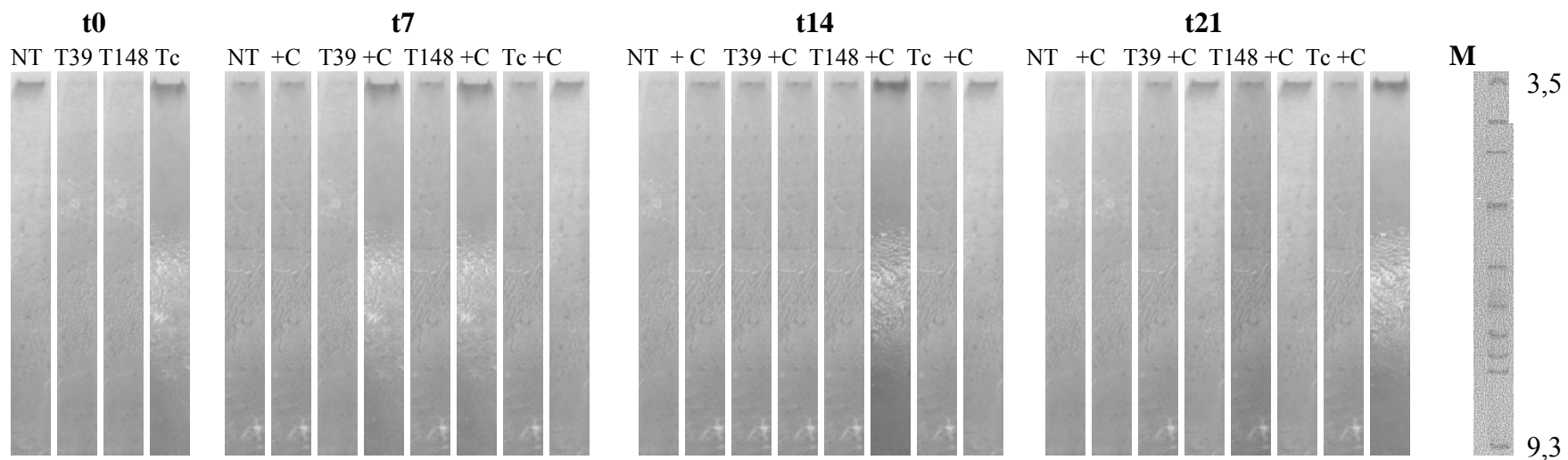


Fig. 4.19: Profilo isoenzimatico di β -1,3-glucanasi in piante di barbabietola cv Faro in seguito a trattamento con acqua (NT) T 39, T148, T. commerciale (Tc) e al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

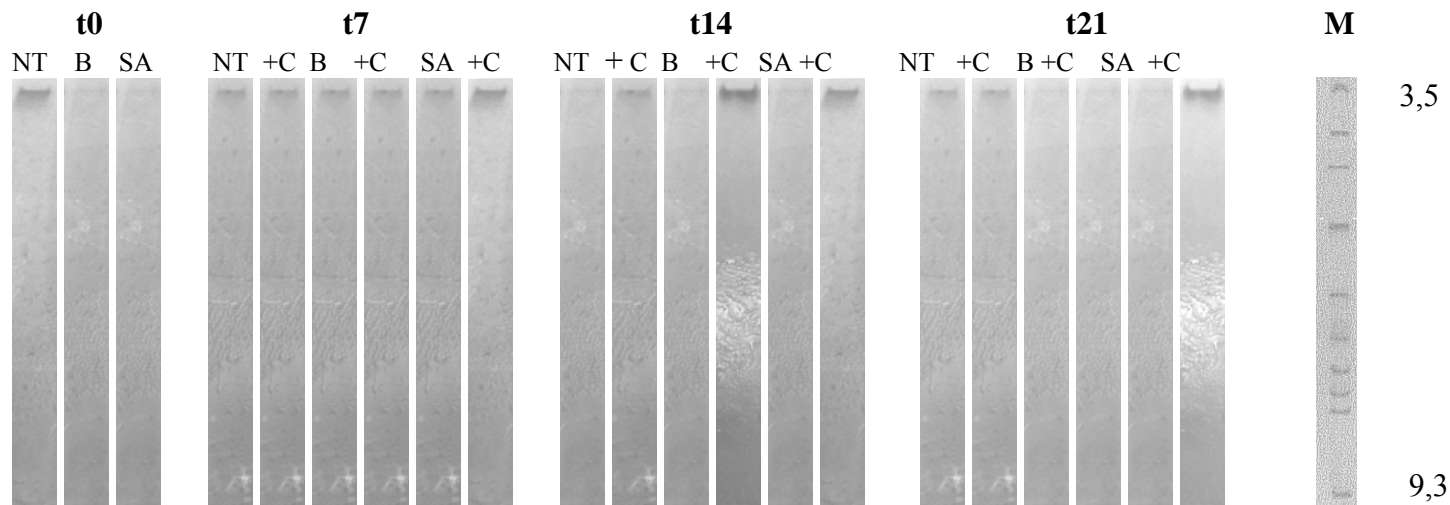


Fig. 4.20: Profilo isoenzimatico di β -1,3-glucanasi in piante di barbabietola cv Aaron in seguito a trattamento con acqua (NT), Bion® (B) e Acido salicilico (SA) al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento(M).

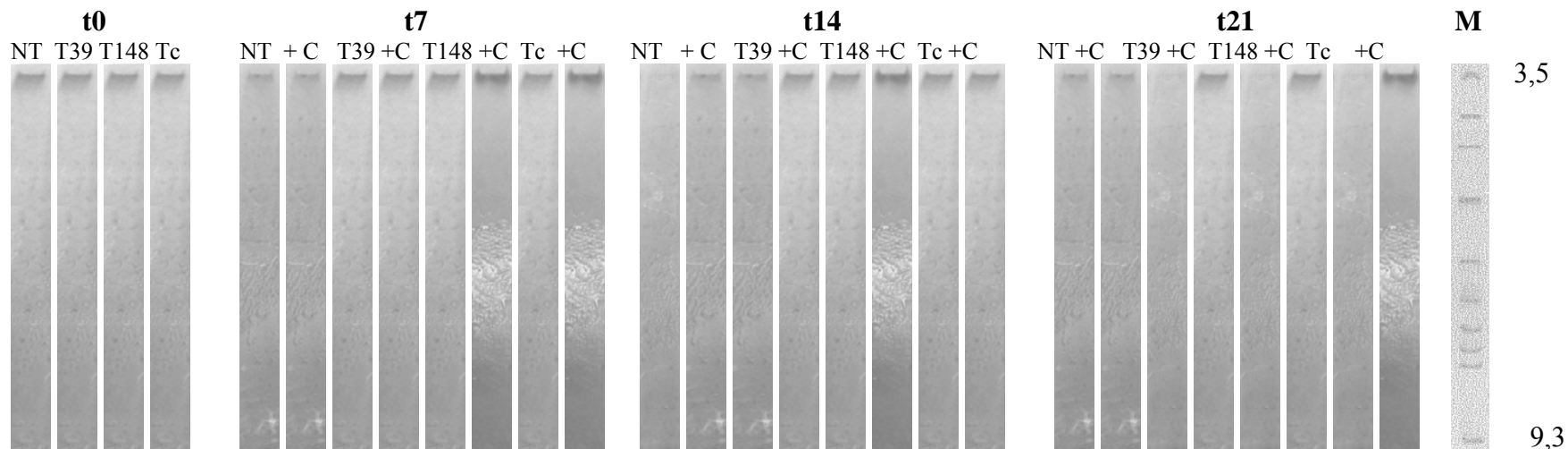


Fig. 4.21: Profilo isoenzimatico di β -1,3-glucanasi in piante di barbabietola cv Aaron in seguito a trattamento con acqua (NT) T 39, T148, T. commerciale (Tc) e al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

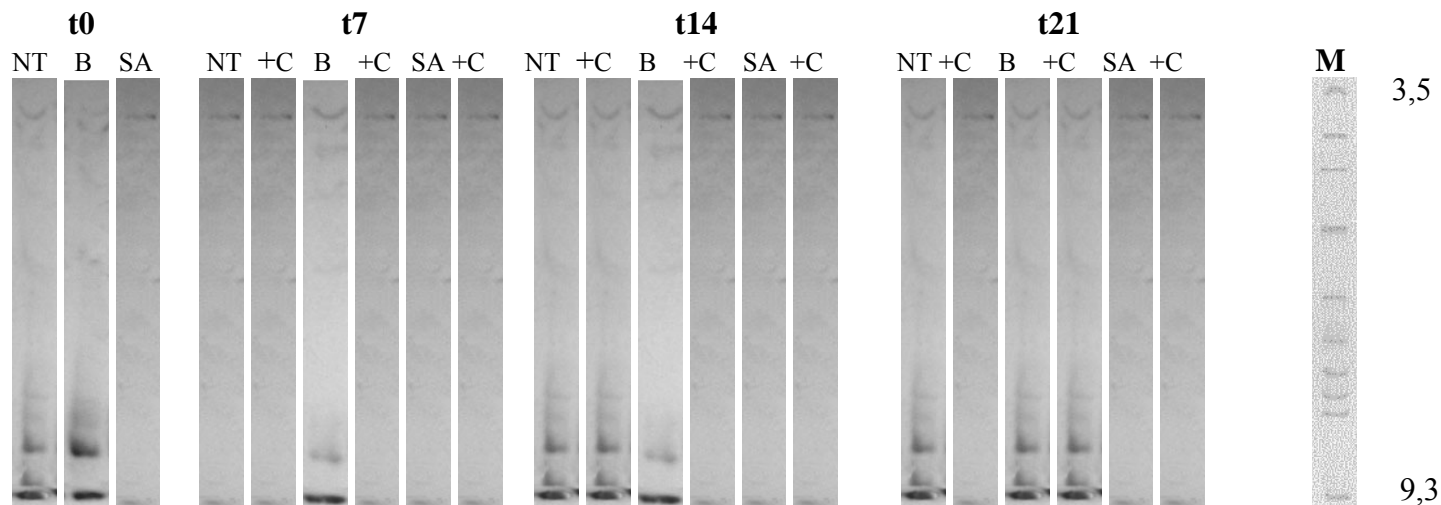


Fig. 4.22: Profilo isoenzimatico di perossidasi in piante di barbabietola cv Faro in seguito a trattamento con acqua (NT), Bion® (B) e Acido salicilico (SA) al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento(M).

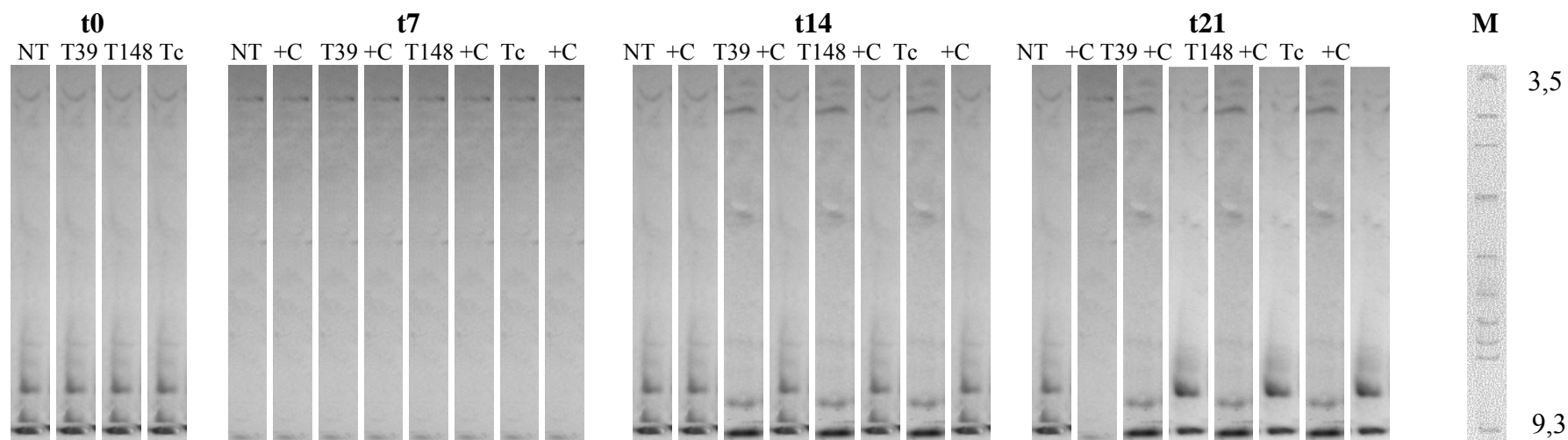


Fig. 4.23: Profilo isoenzimatico di perossidasi in piante di barbabietola cv Faro in seguito a trattamento con acqua (NT) T 39, T148, T. commerciale (Tc) e al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

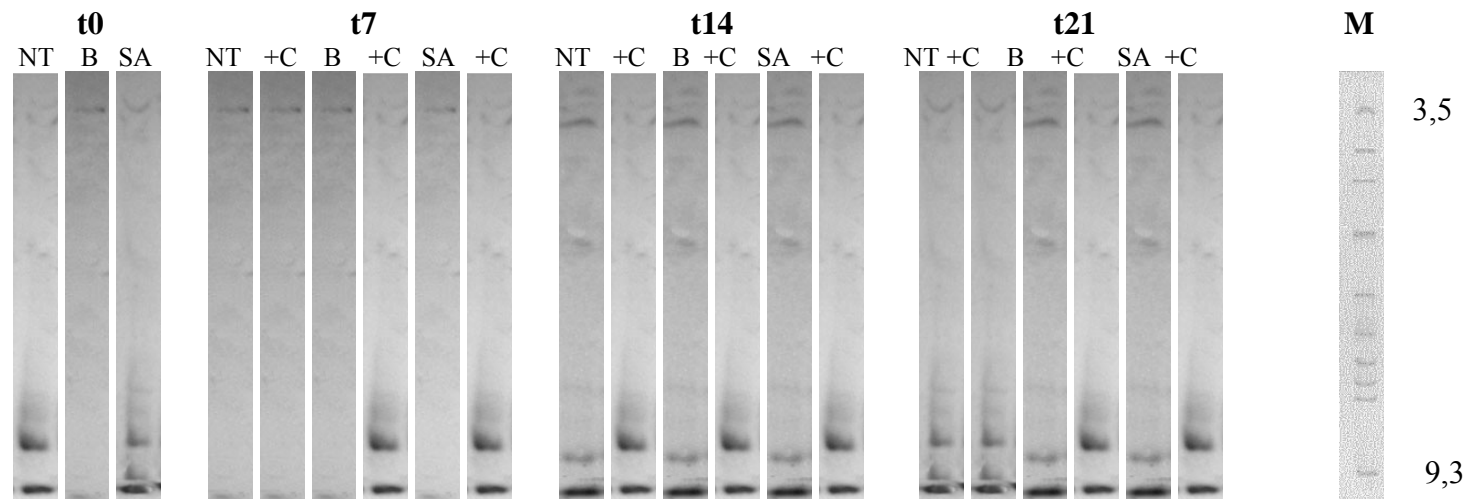


Fig. 4.24: Profilo isoenzimatico di perossidasi in piante di barbabietola cv Aaron in seguito a trattamento con acqua (NT), Bion® (B) e Acido salicilico (SA) al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento(M).

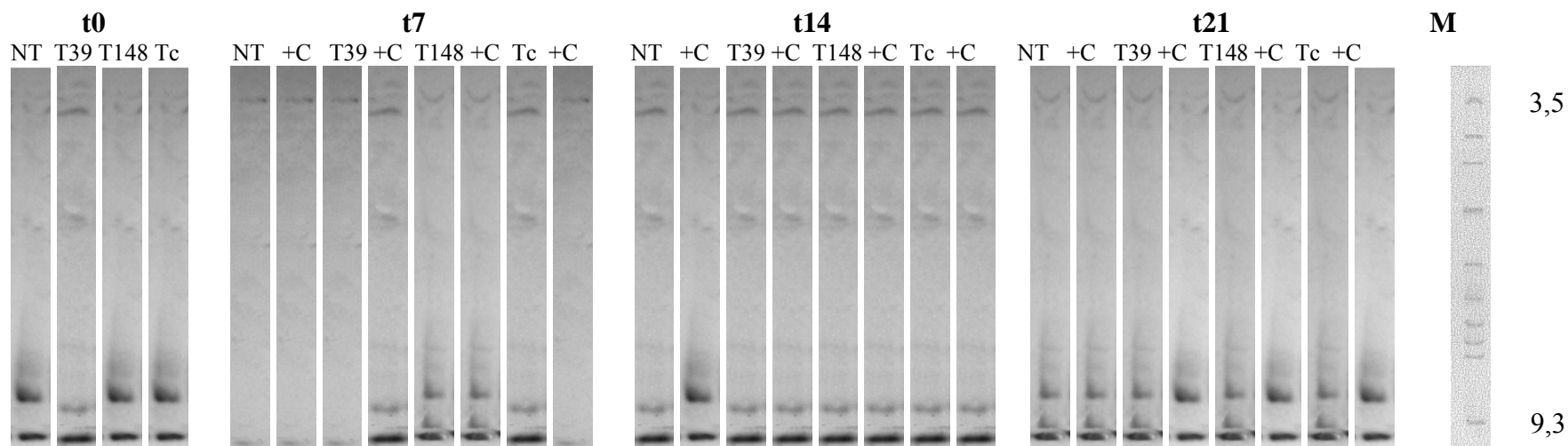


Fig. 4.25: Profilo isoenzimatico di perossidasi in piante di barbabietola cv Aaron in seguito a trattamento con acqua (NT) T 39, T148, T. commerciale (Tc) e al tempo 0 (t0) e dopo 7 (t7), 14 (t14) e 21 gg (t21) dall'inoculo con *C. beticola* nelle tesi solo trattate e trattate-inoculate (+C). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A destra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (M).

5. CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Specie di *Hypocrea* ed il suo anamorfo *Trichoderma* Pers. sono ubiquitarie. *Trichoderma* spp. è normalmente presente nei terreni, mentre in natura assai rara risulta la forma perfetta *Hypocrea*. *Trichoderma* spp. è principalmente conosciuto come un antagonista, utilizzato in lotta biologica verso i funghi fitopatogeni (Papavizas 1985; Roberti *et al.*, 1993; Chet e Inbar, 1994; Hjeljord e Tronsmo, 1998) ed ha la capacità di stimolare la crescita delle piante inducendo resistenza (Harman e Bjorkman, 1998). *T. harzianum* ed anche le altre specie di *Trichoderma* hanno una elevata abilità di colonizzare i substrati a base vegetale per l'alto tasso di crescita, di sviluppo e la capacità di secernere enzimi idrolitici come chitinasi, β -glucanasi e cellulasi.

Il loro impiego come BCAs implica conoscenze sull'inquadramento tassonomico e sulla modalità d'azione. *T. harzianum* era ritenuta una specie parafiletica (Grondona *et al.*, 1997) a causa dell'elevata variabilità fenotipica e genotipica, mentre è stato dimostrato che *T. harzianum* è una specie complessa monofiletica, cioè una specie che comprende linee fenotipicamente multiple e indistinguibili nella loro evoluzione. Anche *T. atroviride* risulta essere monofiletica in studi filogenetici (Dodd *et al.*, 2003).

Nei risultati dei saggi di biocontrollo *in vitro* la forma di antagonismo più frequentemente esplicita dai ceppi in studio è quella del micoparassitismo. Durante l'osservazione al SEM è stato riscontrato che le ife di *T. atroviride*, fungo antagonista, avvolgono quelle di *R. solani*, fungo bersaglio, grazie alla formazione di caratteristiche strutture simili a ganci ed appressori. Tale diretta attività di *Trichoderma* risulta anche in bibliografia come il meccanismo di azione più frequente verso i funghi fitopatogeni (Chet, 1987). L'attività micoparassitaria dei diversi ceppi di *Trichoderma* si differenzia in funzione del patogeno. In particolare verso *A. alternata* e *R. solani* l'azione di inibizione è risultata pressochè costante da parte di tutti i ceppi in prova, mentre verso *C. beticola* si è notata un'attività di inibizione diversa fra i ceppi antagonisti.

Poiché non sempre però sussiste una correlazione fra isolati di *Trichoderma* con attività antagonistica e produzione di isoforme enzimatiche di chitinasi, β 1,3-glucanasi e proteasi (Chet *et al.*, 1989), nel presente lavoro si è optato verso la

selezione di un ceppo ad alta capacità antagonistica (T39) e media (T148) da utilizzare nelle prove *in vivo* verso *C. beticola*.

È stato, inoltre, dimostrato che la colonizzazione da parte di *Trichoderma* dei primi strati cellulari dell'epidermide radicale attiva una resistenza sistemica indotta (ISR) che rende l'intera pianta meno suscettibile all'attacco di patogeni e stress ambientali (Bigirimana *et al.*, 1997; Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2003).

L'uso di induttori chimici di resistenza, inoltre, rappresenta una interessante opportunità per controllare le malattie fungine all'interno di programmi di lotta integrata. Questa realtà, individuata circa 40 anni fa, ha destato dapprima scarso interesse scientifico e ha avuto, nel settore della Patologia vegetale, pochi riscontri applicativi fino alla fine del XX secolo. Gli induttori chimici esogeni, comprovatamente noti attivatori di geni di resistenza in alcuni tipi di piante, sono principalmente una quindicina di molecole chimicamente diverse ma tra le più studiate tra cui ricordiamo SA e BTH.

La SAR è stata studiata nella presente tesi in un modello barbabietola da zucchero/*C. beticola*/elicitori biologici e chimici. Dai dati ottenuti, tramite analisi computerizzata, si può sottolineare che nella prova in cella climatica le piante della cv Faro, si sono confermate più tolleranti, evidenziando una minor percentuale di area fogliare malata rispetto a quelle di Aaron, più suscettibili, nelle tesi inoculate in assenza di trattamento (NT+C).

I trattamenti con gli elicitori biologici si sono dimostrati meno efficaci degli elicitori chimici, ma hanno comunque portato ad una riduzione della malattia rispetto al testimone. La loro azione comunque non si è dimostrata lineare nei confronti delle due cultivar: in particolar modo il biofungicida commerciale (Tc) ha fatto registrare i migliori risultati con la cv Faro e T39 con la cv Aaron; SA ha contenuto maggiormente l'infezione cercosporica nelle piante della cv Aaron e Bion® in quelle della cv Faro. E' stato constatato un effetto negativo di Bion® sull'estensione del lembo fogliare in barbabietola. Questa alterazione è stata notata anche su altri ospiti, ed è stata interpretata come una conseguenza del costo di allocazione risultante da competizione metabolica fra processi coinvolti nella

crescita della pianta e composti di nuova sintesi legati alla difesa (Heil *et al.*, 2001).

Dai nostri risultati è, inoltre, emerso che a seguito dell'infezione cercosporica, le due cultivar trattate con i diversi elicitori, accumulavano in modo ed in tempi diversificati differenti proteine di patogenesi (PR) quali chitinasi, β -1,3-glucanasi e perossidasi. In studi effettuati è stata riscontrata, infatti, nell'intera frazione proteica una diversa tipologia di proteine di difesa, quali β -1,3-glucanasi, perossidasi, chitinasi, PR4 (Caruso *et al.*, 1999).

Tra gli enzimi principali implicati nella risposta di difesa della piante, le β -glucanasi e le chitinasi giocano un ruolo chiave. Le loro attività sono correlate con la resistenza della pianta in quanto, β -1,3-glucano e chitina, sono i principali componenti della parete cellulare di molti funghi e degradano le giovani ife fungine durante la loro penetrazione nei tessuti dell'ospite (Van Loon, 1997).

Le chitinasi, appartenenti alle famiglie **PR-3**, **PR-8** e **PR-11**, sono fortemente espresse in risposta ad agenti abiotici quali etilene e SA, e ad elicitori di origine fungina o endogena. Spesso l'induzione delle chitinasi è accompagnata dall'accumulo di β -1,3-glucanasi e di altre proteine PR.

Nella presente tesi l'analisi IEF ha permesso la separazione delle chitinasi in quattro tipi di isoforme con punti isoelettrici: 3,5 - 4,5 - 8,80 e 9,30, prevalentemente espresse a t7 dall'inoculo patogeno. Sono risultate predominanti quelle di tipo prevalentemente acido (pI 3,5 e 4,4) indipendentemente dalla cultivar, dai trattamenti e dall'inoculo. In particolare, possiamo evidenziare che le isoforme ritrovate, principalmente acide, sono espresse nell'apoplasto. Anche Kang e Buchenauer (2002), durante il tentativo d'infezione di varietà di frumento con minore suscettibilità a *F. culmorum*, hanno sottolineato l'accumulo in modo consistente di chitinasi e β 1,3-glucanasi con localizzazione apoplastica. Inoltre, l'espressione di chitinasi acide da parte di *T. harzianum* secrete in diversi mezzi di crescita è stata descritta da Haran *et al.* (1996).

Le β -1,3-glucanasi, appartenenti alla famiglia **PR-2**, garantiscono un effetto inibente sull'accrescimento del patogeno tramite la loro capacità di catalizzare l'idrolisi dei β -glucani, principali costituenti della parete cellulare della maggior parte dei funghi fitopatogeni (Legrand *et al.*, 1987; Kombrink e Samssich, 1997;

Joosten *et al.*, 1989). Questi enzimi sono ritenuti anche responsabili della lisi dell'apice ifale, con conseguente inibizione della crescita fungina e del rilascio di sostanze che elicitano le risposte di difesa della pianta (Sahai e Manocha, 1993). Esistono svariate isoforme che differiscono nel peso molecolare, punto isoelettrico, struttura primaria, localizzazione cellulare e regolazione genica.

L'attività delle β -1,3-glucanasi, riscontrata nella presente tesi, è espressa con una isoforme di tipo acido (pI 3,5) indipendentemente dalla cultivar e dall'inoculo. Nelle tesi trattate con induttori biologici tale isoforma è risultata evidente più o meno in tutti i tempi e in tutte le tesi sia trattate inoculate che trattate non inoculate tranne a t21 per i soli trattati non inoculati.

Gottschalk *et al.* (1998) hanno isolato e caratterizzato glucanasi prodotte in barbabietola da zucchero durante risposte di resistenza sistemica, ma contrariamente a questi risultati hanno ritrovato l'espressione di due distinte isoforme con punti isoelettrici basici 9,4 e 9,5. I dati ritrovati, però, concordano con la presenza di isoforme attive nei tessuti di piante sane (Punja, 2001).

Per quanto riguarda le perossidasi, famiglia **PR-9**, sono glicoproteine catalizzanti l'ossidazione di un gran numero di substrati, tramite il perossido di idrogeno. Sono note diverse isoforme, coinvolte in un gran numero di processi cellulari tra cui i fenomeni di resistenza (Gaspar *et al.*, 1985). Cambiamenti nell'attività delle perossidasi durante le reazioni di resistenza e suscettibilità sono stati osservati in molte interazioni pianta-patogeno ed è stato visto che isoforme acide extracellulari di perossidasi possano aumentare la resistenza mediante la costruzione o il rafforzamento delle barriere fisiche.

Nel modello preso in esame le perossidasi sono risultate nettamente basiche per entrambe le cultivar e indipendentemente dalla natura dell'elicitore. L'attività perossidasi è incrementata dal 14° giorno in poi nel trattamento biologico in particolar modo per la cv Faro. Nella cv Aaron le differenze indotte da elicitori chimici e biologici sono meno diversificate. E' bene ricordare che le isoforme basiche, espresse nei vacuoli, sono coinvolte nella difesa delle piante (Bargabus, 2002) e il loro ritrovamento nel modello adottato implica attivazioni di risposte SAR. L'attivazione di resistenza correlata con accumulo di isoenzimi di perossidasi e chitinasi è stata rilevata in altri sistemi ospite-patogeno quali

melone-*Dydimella bryoniae* a seguito di trattamenti di BTH e MeJA (Buzi *et al.*, 2004).

In generale la cv Aaron presenta un'attività enzimatica più intensa rispetto alla cv Faro, riscontrata principalmente nell'espressione di chitinasi e perossidasi. Tale espressione più evidente nelle piante più suscettibili di barbabietola non è in linea con quanto ritrovato da altri Autori (Botha *et al.*, 1998) seppur su una specie botanica molto distante tassonomicamente (grano), in cui i livelli più alti di induzione risultavano nelle cultivar resistenti.

Gli aspetti biochimici e strutturali della SAR, chiariti per alcuni modelli di pianta ospite-agente-patogeno, possono verificarsi quindi anche nella barbabietola poiché essa si è rivelata pianta suscettibile alla stimolazione di una condizione di SAR. Alcuni esempi di induzione di resistenza nei confronti di *C. beticola*, sia attraverso molecole-segnale endogene (SA e analoghi) che attraverso l'applicazione di diversi preparati a base di microrganismi o parti di questi, sono oggetto di ricerca da parte di diversi Autori (Bargabus, 2002; Roberti *et al.*, 2003; Galletti *et al.*, 2004). Questi dati lasciano comunque intravedere la possibilità di attivare per via esogena processi biochimici in grado di conferire una resistenza sistemica alle infezioni di *C. beticola* in barbabietola da zucchero. Sfruttare meccanismi di difesa innati alla pianta risulta una prospettiva allettante, non è possibile però considerare tale possibilità al di fuori di una più vasta visione degli equilibri metabolici coinvolti. La lotta tramite meccanismi di resistenza indotta, se ottimizzati, si potrebbe inserire in un'ottica di riduzione degli input economico-ambientali.

6.BIBLIOGRAFIA

- Abeles F.B., Forrence L.E., 1970. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Physiology* 45: 395-400.
- Bargabus R.L., Zidack N.K., Sherwood J.E., Jacobsen B.J., 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61, 289-298.
- Benhamou N., Chet I., 1996. Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 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: Pandalai SG (ed) Recent research developments in microbiology, vol. 2. Research Signpost, Trivandrum, pp. 129-150.
- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* [online] 7: 249-260.
- Bernier F., Berna A., 2001. Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiol. Biochem.* 39: 545–548.
- Bigirimana J., De Meyer G., Poppe J., Elad Y., Höfte M., 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 62: 1001-1007.
- Bissett J., 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infragenetic classification. *Can. J. Bot.* 69: 2357-2372.

Bostock R.M., Karban R., Thaler J.S., Weyman P.D., Gilchrist D., 2001. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European Journal of Plant Pathology* 107: 103-111.

Botha A.M., Nagel M.A.C., Van der Westhuizen A.J., Botha F.C., 1998. Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene and mechanical wounding. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39:99–106

Bradford M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Broekaert W. F., Terras F. R. G., Camue B. P. A., Osborn W., 1995. Plant defensin: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* 108:1353-1358.

Buchanan B., Gruissem W., Jones R., 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. Eds American Society of Plant Physiologists 21:1102-1147.

Buzi A. Chilosi G., De Sillo D., Magro P., 2004. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Phytopathology* 152: 34-42.

Canova A., 1959. Ricerche sulla biologia ed epidemiologia della *Cercospora beticola*. *Ann. Istituto Patologia Vegetale*, Bologna.

Caruso C., Caporale C., Chilosi G., Vacca F., Bertini L., Magro P., Poerio E., Buonocore V., 1996. Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel. *J. Prot. Chem.* 15: 35-44.

Caruso C., Chilosi G., Caporale C., Bertini L., Magro P., Buonocore V., 1999. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 140: 87-97.

Caruso C., Chilosi G., Leonardi L., Bertini L., Magro P., Buonocore V., Caporale C., 2001. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry* 58: 743-750.

Chaverri P., Samuels G.J., 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycologia* 48. CBS - Baarn, pp. 116.

Chet I., 1987. *Trichoderma*. Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil born pathogenic fungi. In: Innovative approaches to plant disease control (Chet Ed.) John Wiley & Sons., 137-160.

Chet I., Ordentlich A., Migheli Q., Sivan A., 1989. Mechanism involved in biological control by *Trichoderma*. *Phytoparasitica*, 17: 2.

Chet I., Inbar J., 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.

Chet I., Inbar J., Hadar I., 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow D.T., Söderström B. (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 165-184.

Christensen A.B., Ho Cho B., Naesby M., Gregersen P.L., Brandt J., 2002. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol. Plant Pathol.* 3: 135–144.

Datta S.K., Muthukrishnan S., 1999. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton, FL- CRC Press. pp. 1- 288.

Delgado-Jarana J., Moreno-Mateos M.A., Benítez T., 2003. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of gtt1. *Euk. Cell* 2: 708-717

Dennis D., Webster J., 1974a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 25-39.

Dennis D., Webster J., 1974b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 41-48.

D'Ercole N., Sportelli M. e Nipoti P., 1983. Prove di antagonismo in vitro tra miceti di interesse fitopatologico *Inf. Fitopatol.* 33(1), 55-58.

Dingley J. M., 1952. The *Hypocreales* of New Zealand. III. The genus *Hypocrea*. *Trans. Roy. Soc. N. Z.* 79: 323-327.

Dingley J. M., 1957. Life history studies in the genus *Hypocrea* Fr. *Trans. Roy. Soc. N. Z.* 84: 689-693.

Dodd S.L., Lieckfeldt E., Samuels G.J., 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov. the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.

Domsch K.H., Gams W., Anderson T., 1980. Compendium of Soil Fungi. New York, Academic Press.

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

Felix G., Meins F., 1987. Ethylene regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta* 172: 386-392.

Ferrari M., Marcon E., Menta A., 1992. Fitopatologia ed entomologia agraria. Edagricole, Bologna.

Flor H. H., 1955. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implication. *Phytopathology* 45: 680-685.

Galletti S., Cerato C., Burzi P. L., Marinello S., Stevanato P., 2004. *Trichoderma* applications on sugar beet leaves reduce lesion size and sporulation of *Cercospora beticola* and increase sucrose yield. IOBC/WPRS Bull. vol. 27 (8), 211-214.

Gaspar T., Penel C., Castillo F.J., Greppin H., (1985). A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development *Physiologia Plantarum* 64 (3), 418–423.

Gaspar T., Penel C., Hagege D., Greppin H., 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases. Lobarzewski J., Greppin H., Penel C. and Gaspar Th. eds. University M.Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland, pp. 249-281.

Goodwin S.B., Dunkle I.D., Zismann V.L., 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648-658.

Gottschalk T.E., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Brunstedt J., 1998. Immunolocalization and characterization of a β -1,3-glucanase from sugar beet, deduction of its primary structure and nucleotide sequence by cDNA and genomic cloning. *Plant Science* 132: 153-167.

Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M. D., Mateos P. F., Bridge P. D., Monte E., Garcia-Acha I., 1997. Physiological and biochemical characterization

of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8): 3189–3198.

Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G., 1996. Resistance gene-dependant plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791.

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

Harman G.E., Latorre B., Agosin E., San Martin R., Riegel D.G., Nielsen P.A., Tronsmo A., Pearson R.C., 1996. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological Control* 7: 259–266.

Harman G. E., Bjorkman T., 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: *Trichoderma and Gliocladium*. C. K. Kubicek and G. E. Harman (ed.), Taylor and Francis, London, England. pp. 229–265.

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

Heil M., 2001. The ecological cost of induced systemic resistance (ISR). *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 137-146.

Higgins D.G., Sharp P.M., 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* 5: 151–153.

Hitton D. M., Pressey R., 1980. Glucanases in fruits and vegetables. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105: 499-502.

Hjeljord L., Tronsmo A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman G. E., Kubicek, C. P., eds. *Trichoderma* and

Gliocladium. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. London, Taylor & Francis: 131-151.

Hjeljord L. G., Stensvand A., Tronsmo A., 2000. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biol. Control* 19: 149-160.

Howell C.R., Stipanovich R.D., 1995. Mechanism in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85: 469-472.

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

Howell C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87: 4-10.

Joosten M, De Wit P., 1988. Isolation, purification and preliminary characterization of a protein specific for compatible *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*)-tomato interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 241-253.

Jung G., Bruckner H., Schmitt H., 1981. Structure and activity of natural peptides. Ed. W. Voelter and G. Weitzel, Berlin, pp.75-114.

Kang Z., Buchernauer H., 2002. Studies on infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of tricothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* 108: 653-660.

Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P., Fritting, B., 1987. Biological function of “pathogenesis-related proteins”: four PR-proteins have β -1,3-glucanase activity. *The EMBO Journal* 6: 3209-3212.

Kinderman J., El-Ayouti Y., Samuels G. J., Kubicek C.P., 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacers region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genet. Biol.* 24: 298-309.

Koch G., Jung C., 1998. Mapping of QTL of *Cercospora beticola* resistance in sugar beet. Int. Plant and Animal Genome Conference VI, San Diego, Abstr. W056.

Koch G., Jung, C., 2000. Genetic localization of *Cercospora* resistance genes. *Adv. Sugar Beet Res. IIRB* 2: 197–210.

Koiwa H., Sato F., Yamada Y., 1994. Characterization of accumulation of tobacco PR-5 proteins by IEF-immunoblot analysis. *Plant Cell Physiology* 35: 821-827.

Kombrink E., Somssich I.E., 1997. Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: *The Mycota V, Part A. Plant Relationships*, ed. G. Carroll, P. Tudzynski, Berlin, Springer-Verlag, pp. 107–128.

Kubicek C.P, Messner R., Fritscher C., Strauss J., Kubicek-Pranz E.M., 1990. Regulatory aspects of formation and secretion of cellulases by *Trichoderma reesei*. In: *Trichoderma reesei* cellulases: Biochemistry, genetics, physiology and applications. Kubicek *et al.* (eds). Royal Chem. Society, Cambridge, UK

Kulling-Gradinger C.M., Szakacs G., Kubicek C.P., 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106: 757–767.

Lamb C. J., 1994. Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell* 76: 419-422.

Lamb C. J., Lawton M. A., Dron M., Dixon R. A., 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215- 224.

Legrand M., Kauffmann S., Geoffroy P., Fritig B., 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. of the National Academy of the Sciences, USA* 84: 6750-6754.

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

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

Lieckfeldt E., Seifert K. A., 2000. An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the *Hypocreales*. *Studies in Mycology* 45: 35–44.

Linthorst H. J. M., 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Review Plant Science* 10:113-150.

Lo C.T., Liao T.F., Deng T.C., 2000. Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 90 (Suppl): 47.

Lohdi M. A., Ye G., Weeden F., Reisch B. I., 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant molecular biology reporter* 12: 6-13.

Lorito M., Hayes C. K., Di Pietro A., Woo S. L., Harman G. E., 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84 (4): 398-405.

Lorito M., Robert L. M., Sposato P., Strauss J., Peterbauer C. K., Kubicek P.C., 1996. Mycoparasitic interaction relieves binding of the *Cre1* carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 93: 14868-14872.

Lunati F., 2006. Lo sviluppo dei biocarburanti in Europa. *Agricoltura* 30, Supplemento giugno: 9-13.

Mach R.L., Zeilinger S., 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 515-522.

Manzali D., Nipoti P., Pisi A., Filippini G., D'Ercole N., 1993. Scanning electron microscopy study of *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. strains against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Phytopath. Medit.* 32: 1-6.

Matta A., 2000. Fondamenti di Patologia Vegetale Patron Editore Bologna.

Melchers L.S., Apotheker-de Groot M., van der Knaap J.A., Ponstein A.S., Sela-Buurlage M.B., Bol J.F., Cornelissen B.J.C., van den Elzen P.J.M., Linthorst H. J. M., 1994. A new classes of tobacco chitinases homologous to bacterial exochitinases display antifungal activity. *Plant Journal* 5: 469-480.

Melchers L.S., Stuiver M.H., 2000. Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 147-152.

Molano J., Duran A., Cabib E., 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analytical Biochemistry* 83: 648-656.

Molla A.H., Fakhru'l-Razi A., Abd-Aziz S., Hanafi M.M., Roychoudhury P.K., Alam M.Z., 2002. A potential resource for bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresour. Technol.* 85 (3): 263–272.

Nilsen K.K., Bojsen K., Roepstorff P., Mikkelsen J.D., 1994. A hydroxylproline containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose. *Plant Molecular Biology* 25: 241-257.

Nilsson N.O., Hansen M., Panagopoulos A.H., Tuveesson S., Ehilde M., Christiansson M., Rading I.M., 1999. QTL analysis of *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet. *Plant Breed* 118: 327– 334.

Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T., 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. of Plant Pathology* 107 (1): 19-28.

Ospina-Giraldo M.D. Royse D.J., Thon M.R., Chen X., Romaine C.P., 1998. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from world – wide sources. *Mycologia* 90(1): 76-81.

Otieno W., Termorshuizen A., Jeger M., Otieno C.O., 2003. Efficacy of soil solarization, *Trichoderma harzianum*, and coffee pulp amendment against *Armillaria* sp. *Crop Protection* 22: 325–331.

Pan S. Q., Ye X. S., Kuc J., 1989. Direct determination of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Analytical Biochemistry* 182: 136-140.

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

Passardi F., Penel C., Dunand C., 2004. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9: 534–540.

Persoon C. H., 1794. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme (Diposito methodica fungorum). *Römer's Neues Mag. Bot.* 1: 63-128.

Pisi A., Filippini G., 1994. La microscopia elettronica a scansione in micologia *Mic. Ital.* 1: 17-26.

Punja Z.K., 2001. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. *Can. J. of Plant pathology* 23: 216-235.

Rehner S.A., Samuels G.J., 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625–634.

Rehner S.A., Samuels G.J., 1995. Molecular sytematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Can. Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): 816–823.

Rifai M. A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia Pap.* 116: 1-56.

Roberti R., Ghisellini L., Pisi A., Flori P., Filippini G., 1993. Efficacy of two species of *Trichoderma* as a biological control against *Rhizoctonia solani* Kuhn isolated from string bean root rot in Italy. *Adv. Hort. Sci.* 7:19-25.

Roberti R., 1998. La concia biologica. *Inf.tore fitopatol.* 48 (12): 3-11.

Roberti R., Marinello S., Cerato C., Burzi P.L., Cesari A., 2003. Chitinase and peroxidase isozymes in sugar beet leaves treated with *Trichoderma* against *Cercospora beticola*. *J. Plant Pathol.* 85, 278.

Roberts W. K., Selitrennikoff C. P., 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen. Microbiol.* 136 (9): 1771-1778.

Roos A.F., 1961. Systemic acquired resistance induced localized virus infection in plant. *Virology* 14: 340-358.

Rossi V., Battilani P., 1991. A forecasting model for primary infections of *Cercospora* leaf spot of sugarbeet. *OEPP/EPPO Bull.* 00: 527–531.

Ryan C. A., 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiology* 24:173-196.

Sahai A.S., Manocha M.S., 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 11: 317-338.

Samuels G. J., Petrini O., Kuhls K., Lieckfeld E., Kubicek C. P., 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud. Mycol* 41: 1-54.

Samuels G.J., Dodd S.L., Gams W., Castlebury L.A., Petrini O., 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146–170.

Schäfer-Pregl R., Borchard D.C., Barzen E., Glass C., Mechelke W., Seitzer J.F., Salamini F., 1999. Localization of QTLs for tolerance to *Cercospora beticola* on sugar beet linkage groups. *Theor. Appl. Genet.* 99: 829–836.

Setiawan A., Koch G., Barnes S.R., Jung C., 2000. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Cercospora* leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.) in sugar beet. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1176–1182.

Skaracis G.N., Biancardi E., 2000. Breeding for *Cercospora* resistance in sugar beet. *Adv. Sugar Beet Res. IIRB*, 2: 177–196.

Spatafora J. W., Blackwell M., 1993. Molecular systematics of unitunicate perithecial ascomycetes: the Clavicipitales-Hypocreales connection. *Mycologia* 85: 912–922.

Terras F.R.G., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N. V., Osborn R. W., Kester A., Rees S. B., Torrekens S., Van Leuven F., Vanderleyden J., Camue B. P. A., Broekaert W. F., 1995. Small cystein-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7: 573-588.

Tonti S., Nipoti P., Rubies Autonell C., Canova A., 2006. Risposta ad infezione cercosporica di due varietà di barbabietola da zucchero trattate con elicitori chimici. Progetto MiPAF “Miglioramento della barbabietola da zucchero per l’ambiente mediterraneo”, Bologna, 2 marzo 2006, 21-32.

Trudel J., Asselin A., 1989. Detection of chitinase activity after polyacrilamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 178: 362-366.

Tugnoli, Biasco, 2005. Annuario generale della bieticoltura italiana. Edagricole Bologna.

Van den Bulcke, Bauw C., Castresana C., Van Montagu M., Vandekerckhove J., 1989. Characterization of vacuolar and extracellular β -1,3-glucanases of tobacco: evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 2673–2677.

Van Loon L. C., Van Kammen A., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40(2):190-211.

Van Loon L.C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 753-765

Van Loon L.C., Van Strien E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85– 97.

Van Loon L.C., 2000. Systemic induced resistance. See Ref. 133, . : 521–574

Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., 2006. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Ed. ZA Siddiqui, Dordrecht: Springer: 39–66.

Van Wees S.C.M., De Swart E.A.M., Van Pelt J.A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J., 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 8711–8716.

Vannacci G., Gullino M.L., (2000) Use of biocontrol agents against soil-borne pathogens: results and limitations. *Acta Horticulturae* 532: 79-87.

Vey A., Hoagland R.E., Butt T.M., 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. Butt, Jackson, Magan (eds) CAB International.

Viterbo A., Ramot O., Chemin L., Chet I., 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81: 549-556.

Vyas S.C., Vyas S., 1995. Integrated control of dry root of soybean. In: Modern fungicides and antifungal compounds. Lyr, Russell and Sisler (eds). Intercept, Andover: 565-572.

Webster J., 1964. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. I. Comparison of perfect and imperfect states of *H. gelatinosa*, *H. rufa* and *Hypocrea* sp. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 47: 75–96.

Webster J., Rifai M. A., 1968. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* IV. *Hypocrea pilulifera* sp.nov. *Trans. Br. Myc. Soc.* 51: 511–514.

White T. J., Burns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to method and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White (eds), Academic Press New York, USA: 315-322.

Woo S. L., Donzelli B., Scala F., Mach R., Kubicek C. P., Del Sorbo G., Lorito M., 1999. Disruption of ech2 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molec. Plant Microbe Interac.* 12 (5): 419-429.

Wright J. M., 1956. The production of antibiotic in soil III. Production of gliotoxin in wheatstraw buried in soil. *Ann. Appl. Biol.* 44: 461-466.

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

Yedidia I., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet. I., 2000. Induction and accumulation of pathogenesis related protein activity during the early stages of root colonization by *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (12): 7343-53.