

VINCENZO ANTIGNANI*, GIULIANO BONANOMI*, SHERIDAN L. WOO*,
FELICE SCALA*

Strumenti biotecnici

I. INTRODUZIONE

L'agricoltura moderna, basandosi sull'utilizzazione di fertilizzanti e anticrittogamici di sintesi e varietà resistenti, ha fatto sì che gli agricoltori interrompessero il legame tra ammendamenti organici, microflora tellurica e fertilità del suolo. La conseguenza di tali azioni è stato un progressivo depauperamento del contenuto in sostanza organica dei suoli e, quindi, della loro fertilità biologica, con la diffusione di patogeni difficili da contenere. Inoltre, l'impiego reiterato di strumenti invasivi quali i fumiganti ha indotto un ulteriore impoverimento della biodiversità della microflora che, in diversi casi, ha portato all'abbandono dei suoli e all'adozione della coltivazione su substrati artificiali. L'uso massiccio di agrofarmaci ha determinato anche altri gravi problemi riguardanti l'ambiente e la salute dell'uomo e degli animali. Tra questi ricordiamo l'inquinamento dei suoli e delle falde acquifere, l'accumulo di residui nelle derrate alimentari e la generazione di organismi resistenti ai principi attivi.

Sulla base di queste constatazioni, è evidente che l'individuazione di strategie di lotta innovative alle malattie delle piante che siano al tempo stesso efficaci, economiche, a basso impatto ambientale e di facile applicazione, è l'obiettivo fondamentale dell'agricoltura del futuro. Ciò è tanto più necessario ove si consideri che a livello europeo è in atto una revisione dei principi attivi di sintesi molti dei quali, per la loro pericolosità, sono già stati esclusi dall'uso e molti lo saranno nei prossimi anni. D'altronde, basti pensare al caso del

* *Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia vegetale, Università di Napoli Federico II*

bromuro di metile e alle difficoltà che si hanno nel trovare adeguate soluzioni alternative al suo impiego come fumigante.

La complessità e la variabilità delle problematiche fitopatologiche impongono l'ottimizzazione continua delle tecniche adottate e uno studio sempre più dettagliato dei fenomeni patologici, al fine di mettere a punto valide alternative agli attuali metodi di lotta alle malattie delle piante. Lo sviluppo delle biotecnologie, nell'accezione più ampia di questo termine, ha permesso di individuare numerosi strumenti con grandi potenzialità applicative. Appare sempre più chiaro, comunque, che per avere successo nella lotta contro le malattie è necessario attuare approcci basati sulla gestione complessiva delle colture e non soltanto sull'uso di mezzi di difesa diretti. In questa ottica, per esempio, la rivalutazione della fertilità biologica è un elemento fondamentale non solo per migliorare la qualità dei prodotti agricoli, ma anche per la loro protezione. Così pure, altri strumenti quali la diagnostica fitopatologica e la modellistica previsionale sono di primaria importanza per ottenere produzioni di qualità e senza rischi per la salute e per l'ambiente.

In questo lavoro saranno discussi gli aspetti innovativi relativi ad alcuni strumenti biotecnici utili per la lotta ai patogeni. In particolare, saranno analizzati i risultati della ricerca più recente relativi all'applicazione di microrganismi utili, sostanze naturali, induttori di resistenza e matrici organiche complesse.

2. MICRORGANISMI MULTIFUNZIONALI E CONSORZI MICROBIOLOGICI

Le moderne tecniche di indagine hanno permesso di individuare e identificare una lunga lista di microrganismi definiti "benefici" (Lorito et al., 2006). I microrganismi benefici possono favorire lo sviluppo delle piante attraverso la promozione della crescita (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Smith e Goodman, 1999), l'induzione di resistenza (van Loon et al., 1998), oppure attraverso l'antagonismo diretto contro i patogeni (Fravel, 1988). Numerosi microrganismi benefici sono stati studiati in maniera dettagliata e per essi è disponibile una descrizione precisa dei meccanismi attraverso i quali esplicano la loro attività quali l'antagonismo, la competizione, la predazione e l'attivazione anticipata delle reazioni di difesa della pianta (Duffy et al., 2003; Haas e Keel, 2003; Morris e Monier, 2003; Harman et al., 2004; Bent e Mackay, 2007).

Tra i microbi maggiormente studiati vi sono agrobatteri, attinomiceti, bacilli, pseudomonadi e funghi dei generi *Ampelomyces*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Glomus* (fungo micorrizico) e *Trichoderma*. Alcuni di questi sono disponibili

in commercio come bioagrofarmaci e vengono utilizzati per la lotta contro differenti patogeni. I bioagrofarmaci presentano diversi vantaggi rispetto ai tradizionali prodotti chimici di sintesi: sono più specifici verso l'organismo bersaglio, sono efficaci anche a basse concentrazioni e presentano bassi livelli di ecotossicità. Tuttavia, nonostante questi vantaggi e il gran numero di formulati oggi disponibili, gli agrofarmaci a base di microrganismi riescono ad affermarsi come prodotti di largo consumo solo nell'agricoltura biologica. La difficoltà nell'ottenimento di packaging con una "shelf life" commercialmente significativa e la variabilità dei risultati ottenuti in differenti condizioni colturali, sono due fattori fortemente limitanti la diffusione di questi prodotti. A tale proposito, sono state condotte numerose sperimentazioni finalizzate a ottimizzare i prodotti già presenti sul mercato. Attualmente lo scenario commerciale è costituito da una miriade di formulati con campi d'applicazione piuttosto circoscritti, in relazione alla coltura e alle condizioni di coltivazione (Lorito et al., 2006). Per superare i limiti sopra citati, una delle tendenze attuali è quella di selezionare ceppi microbici con caratteristiche di multifunzionalità, ovvero capaci di proteggere le piante attraverso differenti meccanismi d'azione. Questi microbi dovrebbero distinguersi per la capacità di operare in differenti condizioni ambientali e contro un'ampia gamma di fitopatogeni. Particolarmente interessanti sono quei microbi che fungono sia da promotori della crescita, che da agenti di lotta biologica. Tra le specie studiate, le pseudomonadi fluorescenti sono quelle che sembrano garantire le prestazioni migliori. La multifunzionalità di tali batteri risiede nella loro capacità di agire sulle piante producendo ormoni e sostanze ad azione ormone-simile, sui patogeni come agenti di lotta biologica e sull'ambiente influenzando il ciclo dei nutrienti (Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Compant et al., 2005; Upadhyay e Srivastava, 2008).

Anche i microrganismi che instaurano simbiosi mutualistiche con le piante possono essere utilizzati per la loro protezione. Tra questi i più noti e studiati sono sicuramente i funghi micorrizici. Tali microrganismi instaurano una stretta associazione con le piante e rendono possibile, grazie alla loro capacità di formare una sottile ed estesa rete di ife nel suolo, un assorbimento efficiente dell'acqua e degli elementi nutritivi come fosforo e azoto (Smith e Read, 1997). Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che le micorrize possono proteggere le piante da patogeni tellurici e fogliari (Graham, 2001). L'applicazione di inoculi micorrizici è già una realtà commerciale, ma negli ultimi anni è cresciuto l'interesse anche nei riguardi delle endosimbiosi batteriche e, in particolare, di quelle degli attinomiceti. Gli attinomiceti sono noti come produttori di antibiotici e di sostanze capaci di stimolare l'allungamen-

to cellulare, la crescita di radici avventizie e la formazione di calli di cicatrizzazione (Igarashi et al., 2004). In alcuni esperimenti questi microbi hanno evidenziato la capacità di contenere alcune patologie come il mal del piede del grano (Franco et al., 2003) e la fusariosi del banano (Cao et al., 2005). Gli attinomiceti, rispetto ad altre categorie di simbionti, come le micorrize, hanno il vantaggio di essere coltivabili, il che semplifica enormemente il lavoro di manipolazione e di selezione delle specie da utilizzare. Lo sviluppo di tecniche per la produzione di piante e sementi infettate da endosimbionti sarebbe di sicuro interesse, oltre che per gli agricoltori, per le numerose aziende vivaistiche coinvolte nella produzione di sementi certificate. Queste realtà produttive infatti, a fronte di investimenti ridotti (acquisto di fermentatori e attrezzature di base per le colture microbiche) potrebbero fornire prodotti molto richiesti.

In forte crescita appare anche l'interesse per lo sviluppo e l'applicazione di bioagrofarmaci contenenti più microbi benefici, prodotti presentati in commercio con la dicitura di "consorzi microbiologici". Su questi formulati attualmente non esistono studi approfonditi riguardanti i meccanismi d'azione alla base della loro efficacia. Uno degli aspetti su cui sarà necessario indagare è quello della compatibilità ecologica e fisiologica tra le differenti specie che compongono il consorzio. Ad oggi è disponibile una limitata bibliografia al riguardo che, tra l'altro, prende in esame comunità microbiche molto semplici (Gaur et al., 2004). Anche nella ricerca applicata all'agricoltura va sviluppata, quindi, quella che in altri settori (medico, alimentare, *environmental-remediation*) viene definita "ingegneria dei consorzi microbiologici" (Brenner et al., 2008). Questa branca della ricerca studia la possibilità di creare combinazioni microbiche ideali e stabili nell'espressione di determinate funzioni ecologiche, anche in condizioni ambientali variabili (Burmolle et al., 2006). Il principio cardine su cui si basa l'idea di consorzio microbiologico è che la presenza di un'elevata biodiversità microbica e metabolica garantisce una maggiore affidabilità in condizioni ambientali mutevoli. La maggiore resistenza e resilienza alle perturbazioni ambientali è determinata dalla complementarità funzionale, fenomeno importante soprattutto nello svolgere processi complessi come la degradazione di composti recalcitranti. Al riguardo, di particolare attualità sono gli studi volti a identificare consorzi microbici in grado di degradare in maniera efficiente molecole inquinanti come gli idrocarburi e i policlorobifenili (Abraham et al., 2002; Jaques et al., 2008). Inoltre, in specifiche condizioni agricole è stato dimostrato che l'azione dei Plant Growth Promoting Rhizobacteria viene maggiormente stimolata quando questi microbi sono presenti in consorzio. Recenti studi correlano questo

fenomeno a una maggiore disponibilità di nutrienti (soprattutto fosforo) e allo stimolo diretto della crescita dovuto alla produzione di acido indolacetico (Pandey e Maheshwari, 2007). Alla base della vita nel consorzio c'è la capacità dei microbi di comunicare attraverso semiochimici specifici (*quorum sensing*). Lo studio e la comprensione dei meccanismi su cui si basa la comunicazione microbica è un punto di partenza per la costruzione di un consorzio microbiologico efficace. Pertanto, i consorzi microbici, grazie alla capacità di svolgere funzioni complesse, precluse alle monoculture, potrebbero divenire uno strumento centrale anche per la lotta alle malattie delle piante.

3. NOVITÀ NELL'USO DELLE SOSTANZE NATURALI E DEGLI INDUTTORI DI RESISTENZA

Le piante sono coinvolte in una moltitudine di interazioni parassitarie e mutualistiche con i microrganismi e altre piante superiori (Gray e Smith, 2005). In particolare, le piante devono affrontare una grande varietà di nemici naturali come virus, batteri, funghi e insetti. Nonostante ciò, soltanto una piccola quota di patogeni riesce a indurre malattie grazie alla presenza nelle piante di un formidabile arsenale difensivo. Le difese dei vegetali includono: il rafforzamento meccanico delle pareti cellulari (Develey-Rivière e Galiana, 2007), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Apel e Hirt, 2004) e la produzione di molecole con attività antimicrobica (Smith, 1996; Morrissey e Osbourn, 1999; Hammerschmidt, 1999; Wittstock e Gershenzon, 2002). La produzione di molecole chimiche è una delle strategie chiave evolute delle piante per gestire questa diversità d'interazioni e in particolar modo, per combattere i patogeni. Difatti, le piante superiori producono un'enorme varietà di composti chimici, tradizionalmente chiamati metaboliti secondari o prodotti naturali (Field et al., 2006; Hartmann, 2008).

Negli ultimi decenni, migliaia di metaboliti secondari con attività antimicrobica sono stati isolati, identificati e caratterizzati (Dixon, 2001). Tra questi composti rientrano molecole organiche come terpeni, saponine, fenoli e fenilpropanoidi, stilbeni, alcaloidi, glucosinolati, indoli e, come unico composto inorganico, lo zolfo elementare (Cooper et al., 1996). Comunemente, i metaboliti secondari con attività antimicrobica sono classificati come costitutivi, se già presenti nei tessuti vegetali (fitoanticipine) o inducibili, se prodotti a seguito dell'attacco dei patogeni (fitoalessine). I glucosinolati, le saponine e i glicocaloidi sono le più comuni fitoanticipine. Ad esempio, le cellule epidermiche di numerose specie d'avena accumulano la saponina avenacina

A-1 a una concentrazione tale da inibire il patogeno tellurico *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Osbourn et al., 1994). Le fitoalessine, fra cui le più comuni hanno la struttura degli stilbeni, polichetidi, sesquiterpeni e flavoni, sono invece composti a basso peso molecolare caratterizzate da attività antimicrobica con un ampio spettro d'azione. Gli isoflavoni pisatina, maackiaina e kievitone sono tra le fitoalessine più note e meglio caratterizzate (Zhang e Smith, 1983; VanEtten et al., 1989). Sebbene l'attività antimicrobica di numerosi metaboliti secondari sia stata dimostrata attraverso studi in vitro, solo in alcuni casi è stato dimostrato con chiarezza il loro ruolo nella resistenza delle piante (Morrissey e Osbourn, 1999).

Durante un evento patologico si osserva una differente regolazione nel metabolismo capace di attivare risposte di autodifesa nella pianta, anche a distanza dal punto di infezione (resistenza sistemica acquisita o SAR). Negli anni '90 è stato dimostrato che i meccanismi di resistenza inducibili in realtà possono essere attivati anche da microbi non patogeni, quali i Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In questo caso si parla di resistenza sistemica indotta (ISR). I principali fattori molecolari capaci di attivare la ISR nelle piante sono i lipopolisaccaridi batterici, i siderofori e l'acido salicilico. Lo status di ISR di fatto non condiziona in maniera evidente la normale fisiologia del vegetale, piuttosto intensifica e rende più rapida la sua risposta agli eventuali attacchi da parte dei patogeni. Tra i microbi particolarmente attivi nell'indurre la ISR vi sono le pseudomonadi fluorescenti, note anche per le loro capacità antagonistiche. Altri importanti induttori di resistenza sono i prodotti della parziale degradazione della parete cellulare dei vegetali. Queste molecole, definite oligogalatturonidi, in quanto oligomeri dell'acido galatturonico, inducono nelle piante meccanismi di difesa biochimica attraverso la produzione di acidi organici volatili, la produzione di specie reattive dell'ossigeno, l'accumulo di inibitori delle proteasi dei patogeni e la sintesi di etilene (De Lorenzo et al., 2001). In recenti studi è stata dimostrata l'effettiva efficacia dei trattamenti a base di oligogalatturonidi nel controllo di numerose patologie dovute soprattutto a funghi e virus (Klarzynski et al., 2001; He et al., 2006). Gli oligogalatturonidi, così come i lipopolisaccaridi derivanti dalla lisi di cellule batteriche, potrebbero essere utilizzati per realizzare una nuova classe di induttori di resistenza, da affiancare ai prodotti già presenti sul mercato.

La disponibilità di una vastissima gamma di prodotti naturali con attività antimicrobica suggerisce la possibilità di applicare tali molecole per la difesa delle piante. In realtà, l'applicazione al settore produttivo è stata molto scarsa. La difficoltà di individuare molecole con una potente attività antimicrobica anche a bassa concentrazione e gli elevati costi per l'estrazione a

livello industriale sono solo alcuni dei fattori limitanti. Per superare questi problemi, è stata proposta la possibilità di utilizzare estratti vegetali non purificati. Comunque, sebbene tali estratti siano spesso risultati efficaci a livello sperimentale (Bajpai et al., 2008; Tegegne et al., 2008), le applicazioni sono rese difficoltose dalla necessità di reperire materiali omogenei da cui ottenere prodotti standardizzati. Un esempio applicativo è quello della propoli che dal punto di vista chimico è una miscela di differenti sostanze spesso molto diverse tra di loro, comprendenti sostanze ceroso-resinose, composti chetonici (cristina, tetrocristina, acacetina, apigenina, betuletolo, galangina, ramnocitrina, isalpinina, ermanina, kaempferolo, 3,5-diidrossi-7,4-dimetossiflavone) e flavonoidi (quercetina, ramnetina, isoramnetina, ramnazina, quercetina-3,7-dimetiletere). La propoli viene utilizzata in maniera estensiva nella medicina etnica per curare affezioni di vario genere dovute a batteri (sia gram positivi, sia gram negativi), funghi e lieviti (Quiroga et al., 2006). Da qualche anno si sta indagando sulla possibilità di applicare la propoli nel campo agricolo come prodotto per il controllo dei microbi fitopatogeni. Recenti studi mostrano che tale sostanza parzialmente purificata riduce in maniera significativa lo sviluppo di funghi (Ozino et al., 1996; Drago et al., 2007) e batteri fitopatogeni (Basin et al., 2005; Mohammadzadeh et al., 2006). Gli studi di campo condotti con rigore scientifico sono invece pochi, ma forniscono indicazioni sull'efficacia del prodotto nel contenere i danni da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* e *Xanthomonas vesicatoria* (Varvaro et al., 2002). Un altro aspetto interessante riguarda l'attività contro ceppi batterici multiresistenti agli antibiotici. Ciò assume una certa rilevanza in medicina, ma sicuramente è di rilievo anche nel settore agricolo, dove spesso si registrano casi di tolleranza, se non di resistenza, dei microbi fitopatogeni ai presidi fitosanitari correntemente in uso. I meccanismi attraverso i quali la propoli agisce non sono ancora chiari, ma appare evidente l'esistenza di una sinergia tra meccanismi biochimici e fisici.

Un'altra molecola naturale con ottime prospettive applicative è il chitosano, polimero della δ -glucosamina. Il chitosano può anche essere ottenuto dalla deacetilazione alcalina della chitina, polimero molto comune in natura in quanto presente nei crostacei, negli insetti e in molti funghi (Hadwiger, 1999). Numerosi studi hanno dimostrato che l'applicazione esogena di chitosano permette di controllare diverse fitopatie causate da funghi e batteri (Bautista-Banos et al., 2006), tanto che sono oggi disponibili diversi formulati commerciali (Sharathchandra et al., 2004). Non essendo tossico per gli organismi superiori risulta un prodotto a basso impatto ambientale (Kumar, 2000). Il chitosano possiede attività antibiotica contro numerosi microrgani-

smi batterici (Liu et al., 2004; Tikhonov et al., 2006) e fungini (Park et al., 2002; Palma-Guerrero et al., 2007) e, oltre a non essere tossico per le piante, è in grado di aumentare la resistenza di semi (Lafontaine e Benhamou, 1996), frutti (Benhamou, 2004) e foglie (Trotel-Aziz et al., 2006). Questa molecola è stata utilizzata con successo anche per il controllo di malattie del post-raccolta (Liu et al., 2007). Sulla base di queste sue proprietà, il chitosano potrebbe divenire un prodotto di largo impiego per la protezione delle piante.

Uno dei sistemi per migliorare l'efficacia dei composti naturali è quello di abbinarli a microrganismi antagonisti. Ad esempio, è stato dimostrato che l'uso combinato di Plant Growth Promoting Rhizobacteria (*Bacillus cereus*) con induttori di resistenza ne aumenta l'efficacia nel contenere *Phytophthora* e *Pythium* (van Loon et al., 1998). Altri studi evidenziano che, in specifici patosistemi, l'efficacia degli induttori di resistenza è evidente solo in presenza di batteri antagonisti (Postma et al., 2005) mentre la combinazione di enzimi con spore di *Trichoderma* incrementa l'attività di biocontrollo del formulato (Lanzuise et al., 2007). Nonostante in letteratura siano riportati molti studi che attestano la validità di tali miscele (Dezhong, 2000; Hamanaka et al., 2006), sono necessari ulteriori studi per ottimizzarne l'efficacia.

Un ulteriore approccio volto a sfruttare l'attività antimicrobica dei metaboliti secondari è basato sull'aumento della resistenza dei vegetali. Tale obiettivo è stato ottenuto con successo trasformando le piante in modo da intensificare la produzione di composti antimicrobici o addirittura produrne di nuovi (Dixon et al., 1996; Dixon, 2001). Ad esempio, Hipskind e Paiva (2000) hanno ottenuto piante di *Medicago sativa* capaci di produrre in maniera costitutiva il resveratrolo, una fitoalessina della vite, determinando resistenza al fungo *Phoma medicaginis*. Risultati simili sono stati ottenuti attraverso la sovra-espressione del gene codificante per la isoflavone *O*-metiltransferasi che determina un più rapido e intenso accumulo dell'isoflavone medicarpina (He e Dixon, 2000). Studi futuri dovranno affrontare la sfida di inserire un elevato numero di geni, coordinati fra loro, in maniera tale da indurre resistenza a più patogeni contemporaneamente (Dixon, 2001). Quest'ultima strategia permetterebbe di ridurre il rischio dell'insorgenza di ceppi patogeni resistenti alle neo-tossine prodotte dalle piante. Un aspetto specifico di tale biotecnica è che, a dispetto dei notevoli sforzi della ricerca, le restrizioni legislative presenti in molti Paesi ne limitano sia la sperimentazione in pieno campo, che le conseguenti applicazioni.

Nuove possibilità applicative di sostanze naturali sono offerte dagli studi sul quorum sensing (QS). Il QS è un meccanismo che permette ai batteri di coordinare alcune funzioni metaboliche attraverso la capacità di monitorare la propria densità di popolazione. Questo meccanismo è basato su molecole

segnale (Holden et al., 1999; Chen et al., 2002), principalmente gli acilomoserino-lattoni nei batteri gram negativi (Zhang e Dong, 2004; Williams, 2007). Nei batteri patogeni il QS controlla numerosi fattori di virulenza quali il trasferimento dei plasmidi Ti negli agrobatteri, la motilità, la produzione di enzimi extracellulari, antibiotici e tossine e la capacità di formare biofilm (van Bodman et al., 2003). Conseguentemente, gli studi si sono concentrati nella ricerca di molecole capaci di interferire con il meccanismo del QS al fine di controllare batteri patogeni oltre che per altre applicazioni finalizzate a limitare la formazione di biofilm sui potenziali siti di infezione. Studi recenti indicano che anche le piante sono in grado di produrre metaboliti interferenti col QS, sebbene tali molecole non siano state ancora identificate (Teplitski et al., 2000; Gao et al., 2003). L'unico caso conosciuto è quello dell'alga marina *Delisea pulchra* che produce furanoni alogenati (Manefield et al., 1999) in grado di prevenire la formazione di biofilm batterici sulla propria superficie fogliare (Givskov et al., 1996).

4. MATRICI ORGANICHE COMPLESSE

L'applicazione di matrici organiche complesse come compost, residui colturali e scarti di lavorazione di industrie agro-alimentari è stato proposto, in molti casi con successo (Scheuerell et al., 2005; Termorshuizen et al., 2007; Bonanomi et al., 2007), per il controllo dei patogeni tellurici. Numerosi studi hanno dimostrato che l'ammendamento è in grado di controllare patogeni quali *Rhizoctonia solani* (Tuitert et al., 1998; Diab et al., 2003), *G. graminis* f. sp. *tritici* (Tilston et al., 2002), *Macrophomina phaseolina* (Lodha, 1995), *Thielaviopsis basicola* (Papavizas, 1968), *Verticillium dahliae* (Lazarovits et al., 1999; López-Escudero et al., 2007) oltre che diverse specie di *Fusarium* (Szczech, 1999; Ros et al., 2005), *Phytophthora* (Szczech e Smolińska, 2001), *Pythium* (McKellar e Nelson, 2003; Veeken et al., 2005), *Sclerotinia* (Boulter et al., 2002) e *Sclerotium* (Coventry et al., 2005).

Differenti meccanismi, spesso complementari fra loro, determinano le capacità soppressive delle matrici organiche. Fra questi, il principale meccanismo d'azione è indubbiamente l'incremento dell'attività microbica complessiva (Pérez-Piqueres et al., 2006) e/o di particolari gruppi di microrganismi con attività antagoniste verso i patogeni (Hoitink e Boehm, 1999). In particolare, è stato dimostrato il ruolo centrale dell'ammendamento con sostanza organica nel sostenere l'attività di microbi antagonisti che, in assenza di una sufficiente disponibilità di substrati organici, non sono in grado di esplicare la

propria attività di biocontrollo (Boehm et al., 1997). In quest'ottica, una strategia possibile per la lotta alle malattie è quella di applicare materiali organici in grado di stimolare selettivamente i microbi del suolo, con effetti positivi verso gli organismi benefici e negativi verso i patogeni.

L'efficacia dell'ammendamento organico può essere determinata dal rilascio di composti fungitossici: in tal caso gli ammendanti organici sono indicati come biofumiganti. Tra i biofumiganti più noti abbiamo i residui vegetali di specie appartenenti alla famiglia delle Brassicacee (Lazzeri e Manici, 2001) o i residui organici a elevato contenuto proteico con un basso rapporto C/N, usualmente inferiore a 10 (Tenuta e Lazarovits, 2002). Nel primo caso, l'azione fungitossica è esplicata da particolari molecole organiche derivanti dai glucosinolati. Questi composti, in seguito alla lacerazione dei tessuti vegetali in presenza dell'enzima mirosinasi, sono idrolizzati a formare composti fungitossici quali isotiocianati, nitrili, tiocianati, ecc. (Sarwar et al., 1998). Nel secondo caso, le molecole attive contro i patogeni tellurici derivano dalla degradazione dei composti proteici che, quando presenti in elevata quantità e in suoli a pH alto, determinano l'accumulo di ammoniaca per brevi periodi. Tali ammendanti sono risultati particolarmente efficaci nel controllo di *T. basicola* (Candole e Rothrock, 1997) e, soprattutto, di *V. dahliae* (Tenuta e Lazarovits, 2004), fungo difficile da lottare anche con i più moderni fungicidi. Un'ulteriore meccanismo di azione delle matrici organiche è l'induzione di resistenza nelle piante (Zhang et al., 1996). In tal caso, l'attività è determinata sia da molecole presenti nella sostanza organica tal quale che da molecole prodotte dalla microflora ivi presente.

L'applicazione di ammendanti organici ha riportato numerosi successi, anche nel mondo produttivo, soprattutto in Olanda (Tuitert et al., 1998) e negli Stati Uniti (Scheuerell et al., 2005). Una delle applicazioni di maggiore interesse è relativa al comparto vivaistico. In tali sistemi produttivi il substrato di coltivazione elettivo è la torba per l'omogeneità delle sue caratteristiche fisico-chimiche, oltre che per l'elevata capacità di ritenzione idrica. Sfortunatamente però, la torba solo raramente ha un'attività soppressiva (Hoitink e Boehm, 1999; Bonanomi et al., 2007) e, di conseguenza, per il controllo della maggior parte dei patogeni è richiesto l'impiego massiccio di agrofarmaci. La limitata soppressività della torba rispetto ai compost è imputabile alla ridotta quantità di composti carboniosi che sostengono l'attività dei batteri antagonisti (Boehm et al., 1997). L'opportunità di indurre condizioni di soppressività nella torba, mantenendone però le caratteristiche positive, ha stimolato notevolmente la ricerca negli ultimi anni. Gli studi hanno individuato due principali strategie: a) l'aggiunta di aliquote, anche molto ri-

dotte (fino all'1% in volume), di compost soppressivi alla torba (van Os e van Ginkel, 2001) e b) l'applicazione combinata di organismi antagonisti e compost ad azione sinergica (Whipps, 1997; Krause et al., 2001; Trillas et al., 2006). Un'altra applicazione è quella dei cosiddetti *compost tea* (Scheuerell e Mahafee, 2002), i quali consistono in un estratto acquoso diluito (concentrazione variabile tra l'1 e il 10%) dei compost. Tali materiali sono applicati, attraverso le comuni tecniche di aspersione, all'apparato epigeo per la lotta ai patogeni fogliari. Notevoli successi nell'applicazione di compost tea sono stati raggiunti soprattutto negli Stati Uniti, mentre sono praticamente assenti gli studi sia scientifici, sia applicativi in Italia. L'efficacia dei compost tea spesso si è dimostrata paragonabile a quella degli agro farmaci di sintesi (Scheuerell e Mahafee, 2002). Buoni risultati sono stati conseguiti nella lotta a *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* (Cronin et al., 1996), *Plasmopara viticola* (Ketterer, 1990) e numerose specie di oidio quali *Erysiphe* spp., *Uncinula necator* e *Sphaerotheca fuliginea* (Budde e Weltzien, 1988; Scheuerell, 2003).

Nonostante la mole di ricerca e i promettenti risultati ottenuti anche in condizioni di campo e in sistemi produttivi reali, rilevanti sono state le difficoltà nell'applicazione delle matrici organiche nei sistemi produttivi agricoli su larga scala (Whipps, 1997; Bonanomi et al., 2007). La limitata diffusione di tali mezzi tecnici è imputabile sostanzialmente all'elevata variabilità dei risultati ottenuti e alla sostanziale incapacità di predirne l'efficacia in relazione alle variabili ambientali e di tecnica colturale. Ciò ha determinato disaffezione e in molti casi sfiducia degli agricoltori nei confronti di questi strumenti produttivi che, sebbene dotati di grandi potenzialità, devono essere ancora compresi per essere correttamente gestiti. Ad esempio, l'ammendamento con residui colturali tal quali è reso problematico sia dalla fitotossicità che spesso caratterizza i residui vegetali (Bonanomi et al., 2006), sia dal loro potenziale ruolo come fonte di inoculo per funghi e batteri fitopatogeni. Il compostaggio dei residui permette però di superare entrambi questi problemi. Tale processo determina sia la perdita della fitotossicità durante la decomposizione (Zucconi et al., 1981), sia l'eradicazione dei patogeni durante la fase termofila del compostaggio (Noble e Roberts, 2004). Una volta compostati, i residui colturali possono essere riapplicati sui suoli apportando esclusivamente benefici per la fertilità dei terreni. È importante rilevare che con il continuo incremento dei costi dei fertilizzanti di sintesi aumenta anche la competitività commerciale delle matrici organiche, soprattutto considerando la possibilità congiunta di ridurre i patogeni tellurici e migliorare la fertilità dei suoli.

Per numerose combinazioni di sostanza organica e patogeni (torba-*Pythium*, compost-*Pythium*, residui ad alto contenuto di azoto-*V. dahliae*, com-

post-*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) sono stati compresi i meccanismi attraverso i quali si realizza la soppressività (Boehm et al., 1997; McKellar e Nelson, 2003; Borrero et al., 2004; Tenuta e Lazarovits, 2004). In ogni modo, fino a quando le capacità soppressive dei differenti tipi di sostanza organica non saranno identificabili con tecniche di analisi semplici e poco costose, gli agricoltori saranno portati a preferire gli agro farmaci di sintesi agli ammendanti organici. Conseguentemente, l'attività di ricerca futura si dovrà concentrare nello studio di parametri e indici utili all'identificazione degli ammendanti organici con maggiori capacità soppressive.

RIASSUNTO

Il principale obiettivo dell'agricoltura moderna è quello di garantire elevati livelli produttivi operando nella salvaguardia della salute umana e dell'ambiente. In questo contesto, la ricerca scientifica svolge il fondamentale ruolo di proporre tecnologie innovative caratterizzate da una elevata efficacia nel controllo dei patogeni e da un ridotto impatto ambientale. Tra gli approcci alternativi a quelli tradizionali, basati soprattutto sull'uso di bioagrofarmaci, particolarmente promettenti appaiono l'applicazione di microbi benefici (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, micorrize e antagonisti) combinati in consorzi microbici multifunzionali, di sostanze naturali capaci di indurre resistenza nella pianta o con azione antibiotica (es. chitosano, propoli) e di ammendanti organici con capacità soppressive. Ulteriori studi sono comunque necessari affinché questi strumenti di lotta innovativi possano essere utilizzati nella pratica. Solo chiarendo completamente i meccanismi d'azione e individuando i parametri che sono alla base della loro attività antimicrobica, sarà possibile arrivare alla formulazione di prodotti commerciali efficaci per la difesa delle colture allevate nelle più diverse condizioni ambientali.

ABSTRACT

The increasing public interest toward environment protection and human health prompted the research of agronomic strategies with low requirements of pesticides, herbicides and fertilizers. In this context, the search for alternative control methods with high efficiency, low cost and limited environmental impact is an urgent requirement for an eco-sustainable agriculture. The combination of beneficial microbes (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, mycorrhizae and antagonists) in multifunctional consortia, the application of natural compounds capable to induce plant resistance or with antibiotic effects (e.g. chitosan, propolis), and the use of suppressive organic amendments are among the most promising strategies. More studies, however, are needed for these innovative tools to be practically applied. In particular, they require the individuation of reliable parameters that may allow the prediction of their effectiveness in different environmental conditions.

REFERENZE

- ABRAHAM W.R., NOGALES B., GOLYSHIN P.N., PIEPER D.H., TIMMIS K.N. (2002): *Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments*, «Current Opinion in Microbiology», 5, pp. 246-253.
- APEL K., HIRT H. (2004): *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction*, «Annual Review of Plant Biology», 55, pp. 373-399.
- AZCÓN-AGUILAR C., BAREA J.M. (1997): *Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved*, «Mycorrhiza», 6, pp. 457-464.
- BAJPAI V.K., SHUKLA S., KANG S.C. (2008): *Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of Silene armeria L.*, «Bioresource Technology», 99, pp. 8903-8908.
- BASIM E., BASIM H., OZCAN M. (2006): *Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens*, «Journal of Food Engineering», 77, pp. 992-996.
- BAUTISTA-BANOS S., HERNANDEZ-LAUZARDO A.N., VELAZQUEZ-DEL VALLE M.G., HERNANDEZ LOPEZ M., BARKA E.A., BOSQUEZ-MOLINA E., WILSON C.L. (2006): *Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities*, «Crop Protection», 25, pp. 108-118.
- BENHAMOU N. (2004): *Potential of the mycoparasite, Verticillium lecanii, to protect citrus fruit against Penicillium digitatum, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan*, «Phytopathology», 94, pp. 693-705.
- BENT A.F., MACKEY D. (2007): *Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions*, «Annual Review of Phytopathology», 45, pp. 399-436.
- BLOEMBERG G.V., LUGTENBERG B.J. (2001): *Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria*, «Current Opinion in Plant Biology», 4, pp. 343-350.
- BOEHM M.J., WU T., STONE A.G., KRAAKMAN B., IANNOTTI D.A., WILSON G.E., MADDEN L.V., HOITINK H.A. (1997): *Cross-polarized magic-angle spinning ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained biological control of Pythium Root Rot*, «Applied Environmental Microbiology», 63, pp. 162-168.
- BONANOMI G., SICUREZZA M.G., CAPORASO S., ESPOSITO A., MAZZOLENI S. (2006): *Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials*, «New Phytologist», 169, pp. 571-578.
- BONANOMI G., ANTIGNANI V., PANE C., SCALA F. (2007): *Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments*, «Journal of Plant Pathology», 89 pp. 311-340.
- BORRERO C., TRILLAS M.I., ORDOVÁS J., TELLO J.C., AVILÉS M. (2004): *Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of tomato in plant growth media*, «Phytopathology», 94, pp. 1094-1101.
- BOULTER J.I., BOLAND G.J., TREVORS J.T. (2002): *Evaluation of composts for suppression of dollar spot (Sclerotinia homoeocarpa) of turfgrass*, «Plant Disease», 86, pp. 405-410.
- BRENNER K., YOU L., ARNOLD F.H. (2008): *Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology*, «Trends in Biotechnology», 26, pp. 483-489.
- BUDDER K., WELTZIER H.C. (1988): *Untersuchungen zur wirkung von Kompostextrakten und kompostsubstraten im pathosystem getreide-echter mehitau (Erysiphe graminis)*, «Mitteilungen der Biologischer Bundesanst», 245, p. 366.
- BURMOLLE M., WEBB J.S., RAO D., HANSEN L.H., SØRENSEN S.J., KJELLEBERG S. (2006):

- Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms*, «Applied Environmental Microbiology», 72, pp. 3916-3923.
- CANDOLE B.L., ROTHROCK C.S. (1997): *Characterization of the suppressiveness of hairy vetch-amended soils to Thielaviopsis basicola*, «Phytopathology», 87, pp. 197-202.
- CAO L., QIU Z., YOU J., TAN H., ZHOU S. (2005): *Isolation and characterization of endophytic actinomycetes antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots*, «FEMS microbiology letters», 247, pp. 147-152.
- CHEN X., SCHAUDER S., POTIER N., VAN DROSSELAER A., PELCZER I., BASSLER B.L., HUGHSON F.M. (2002): *Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron*, «Nature», 415, pp. 545-549.
- COMPANT S., DUFFY B., NOWAK J., CLEMENT C., BARKAL E.A. (2005): *Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects*, «Applied Environmental Microbiology», 71, pp. 4951-4959.
- COOPER R.M., RESENDE M.L.V., FLOOD J., ROWAN M.G., BEALE M.H., POTTER U. (1996): *Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of Theobroma cacao*, «Nature», 379, pp. 159-162.
- COVENTRY E., NOBLE R., MEAD A., WHIPPS J.M. (2005): *Suppression of Allium white rot (Sclerotium cepivorum) in different soils using vegetable wastes*, «European Journal of Plant Pathology», 111, pp. 101-112.
- CRONIN M.J., YOHALEM D.S., HARRIS R.F., ANDREWS J.H. (1996): *Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen Venturia inaequalis by compost extracts*, «Soil Biology & Biochemistry», 28, pp. 1241-1249.
- DEVELEY-RIVIÈRE M., GALIANA E. (2007): *Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom*, «New Phytologist», 175, pp. 405-416.
- DEZHONG S. (2000): *Beneficial microorganisms and metabolites derived from agriculture wastes in improving plant health and protection*, «Journal of Crop Production», 3, pp. 349-366.
- DIAB H., HU S., BENSON D.M. (2003): *Suppression of Rhizoctonia solani on impatiens by enhanced microbial activity in composted swine waste amended potting mixes*, «Phytopathology», 93, pp. 1115-1123.
- DIXON R.A., LAMB C.J., MASOUD S., SEWALT V.J.H., PAIVA N.L. (1996): *Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review*, «Gene», 179, pp. 61-71.
- DIXON R.A. (2001): *Natural products and plant disease resistance*, «Nature», 411, pp. 843-847.
- DRAGO L., DE VECCHI E., NICOLA L., GISMONDO M.R. (2007): *In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis)*, «Journal of Applied Microbiology», 103, pp. 1914-1921.
- DUFFY B., SCHOUTEN A., RAAIJMAKERS J.M. (2003): *Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism*, «Annual Review of Phytopathology», 41, pp. 501-538.
- FIELD B., JORDÁN F., OSBOURN A. (2006): *First encounters-deployment of defence-related natural products by plants*, «New Phytologist», 172, pp. 193-207.
- FRANCO C.A., MICHELSEN C.P.A., PERCY N.A., CONN V.A., LISTIANA E.A., MOLL S.A., LORIA R.B., COOMBS J.A. (2007): *Actinobacterial endophytes for improved crop performance*, «Australasian Plant Pathology», 36, pp. 524-531.

- FRAVEL D.R. (1988): *Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases*, «Annual Review of Phytopathology», 26, pp. 75-91.
- GAO M., TEPLITSKI M., ROBINSON J.B., BAUER W.D. (2003): *Production of substances by Medicago truncatula that affect bacterial quorum sensing*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16, pp. 827-834.
- GAUR R., SHANI N., JOHRI K.B.N., ROSSI P., ARAGNO M. (2004): *Diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads do not influence AM fungi in wheat rhizosphere*, «Current Science», 86, pp. 453-457.
- GIVSKOV M., NYS R.D., MANEFIELD M., GRAM L., MAXIMILIEN R., EBERL L., MOLIN S., STEINBERG P.D., KYELLEBERG S. (1996): *Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling*, «Journal of Bacteriology», 178, pp. 6618-6622.
- GRAHAM J.H. (2001): *What do root pathogens see in mycorrhizas?*, «New Phytologist», 149, pp. 357-359.
- GRAY E.J., SMITH D.L. (2005): *Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes*, «Soil Biology & Biochemistry», 37, pp. 395-412.
- HAAS D., KEEL C. (2003): *Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease*, «Annual Review of Phytopathology», 41, pp. 117-153.
- HADWIGER L.A. (1999): *Host-parasite interactions: elicitation of defense responses in plants with chitosan, in Chitin and Chitinases*, Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 185-200.
- HAMANAKA Y., TOYOTA K., HAYASHY-IKEDA K.P. (2006): *Screening of fungal strains responsible for strong fungistasis against Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in a coffee compost-amended soil*, «Soil Science and Plant Nutrition», 52, pp. 133-134.
- HAMMERSCHMIDT R. (1999): *Phytoalexins: what have we learned after 60 years?*, «Annual Review of Phytopathology», 37, pp. 285-306.
- HARMAN E., HOWELL R., VITERBO A., CHET I., LORITO M. (2004): *Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts*, «Nature Reviews», 2, pp. 43-56.
- HARTMANN T. (2008): *The lost of origin of chemical ecology in the late 19th century*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 105, pp. 4541-4546.
- HE P.Q., TIAN L., CHEN K.S., HAO L.H., LI G.Y. (2006): *Induction of volatile organic compounds of Lycopersicon esculentum Mill. and its resistance to Botrytis cinerea Pers. by burdock oligosaccharide*, «Journal of Integrative Plant Biology», pp. 48, 550-557.
- HE X.Z., DIXON R.A. (2000): *Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances the biosynthesis of 48-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa*, «Plant Cell», 12, pp. 1689-1702.
- HIPSKIND J.D., PAIVA N.L. (2000): *Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to Phoma medicaginis*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 13, pp. 551-562.
- HOITINK H.A.J., BOEHM M.J. (1999): *Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon*, «Annual Review of Phytopathology», 37, pp. 427-446.
- HOLDEN M.T.G., CHHABRA S.R., DE NYS R., STEAD P., BAINTON N.J., HILL P.J., MANEFIELD M., KUMAR N., LABATTE M., ENGLAND D., RICE S., GIVSKOV M., SALMOND G.P.C., STEWART G.S.A.B., BYCROFT B.W., KJELLEBERG S., WILLIAMS P. (1999): *Quorum-sensing cross-talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from Pseudomonas aeruginosa and other gram-negative bacteria*, «Molecular Microbiology», 33, pp. 1254-1266.

- IGARASHI Y., YOSHIDA R., MIURA S., FURUMAI T. (2004): *Plant growth promoting activity of secondary metabolites of endophytic actinomycetes*, «The abstract of 18th International Conference on Plant Growth Substances», p. 59.
- JACQUES R.J.S., OKEKE B.C., BENTO F.M., TEIXEIRA A.S., PERALBA M.C.R., CAMARGO F.A.O. (2008): *Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil*, «Bioresource Technology», pp. 99, 2637-2643.
- KETTERER N. (1990): *Studies on the effect of a compost extraction on the leaf infections of potatoes and tomatoes by Phytophthora infestans as well as on the infection of grape vines by Plasmopara viticola, Pseudopeziza tracheiphila and Uncinula necator*, PhD Thesis, Bonn, Germany.
- KLARZYNSKI O., DESCAMPS V., PLESSE B., YVIN J.C., KLOAREG B., FRITIG B. (2003): *Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16, pp. 115-122.
- KRAUSE S.M., MADDEN L.V., HOITINK H.A.J. (2001): *Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of Rhizoctonia damping off of radish and Rhizoctonia crown and root rot of poinsettia*, «Phytopathology», 91, pp. 1116-1123.
- KUMAR M.N.V.R. (2000): *A review of chitin and chitosan applications*, «Reactive and Functional Polymers», 46, pp. 1-27.
- LAFontaine P.J., BENHAMOU N. (1996): *Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, «Biocontrol Science and Technology», 6, pp. 111-124.
- LANZUISE S., RUOCCO M., WOO S., ALOJ V., TURRA D., VINALE F., MARRA F., LORITO M. (2007): *Optimization of an industrial fermentation process for the production of novel Trichoderma-based formulations*, «Journal of Plant Pathology», 89, p. S42.
- LAZAROVITS G., CONN K.L., POTTER J.W. (1999): *Reduction of potato scab, Verticillium wilt, and nematodes by soy meal and meat and bone meal in two Ontario potato fields*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 21, pp. 345-353.
- LAZZERI L., MANICI L.M. (2001): *Allelopathic effect of glucosinolate-containing plant green manure on Pythium sp. and total fungal population in soil*, «Hort Science», 36, pp. 1283-1289.
- LIU H., DU Y., WANG X., SUN L. (2004): *Chitosan kills bacteria through cell membrane damage*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 145-155.
- LIU J., TIAN S., MENG X., XUA Y. (2007): *Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit*, «Postharvest Biology and Technology», 44, pp. 300-306.
- LODHA S. (1995): *Soil solarization, summer irrigation and amendments for the control of Fusarium oxysporum f. sp. cumini and Macrophomina phaseolina in arid soils*, «Crop protection», 14, pp. 215-219.
- LÓPEZ-ESCUDERO F.J., MWANZA C., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2007): *Reduction of Verticillium dahliae microsclerotia viability in soil by dried plant residues*, «Crop Protection», 26, pp. 127-133.
- LORITO M., WOO S., IACCARINO M., SCALA F. (2006): *Microrganismi antagonisti*, In *Microrganismi benefici per le piante*, IDELSON-GNOCCHI, pp. 146-175.
- MANEFIELD M., DE NYS R., KUMAR N., READ R., GIVSKOV M., STEINBERG P., KJELLEBERG S. (1999): *Evidence that halogenated furanones from Delisea pulchra inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein*, «Microbiology», 145, pp. 283-291.

- McKELLAR M.E., NELSON E.B. (2003): *Compost-induced suppression of Pythium damping-off is mediated by fatty-acidmetabolizing seed-colonizing microbial communities*, «Applied and Environmental Microbiology», 69, pp. 452-460.
- MOHAMMADZADEH S., SHARIATPANAH M., HAMED M., AHMADKHANIHA R., SAMADI N., OSTAD S.N. (2007): *Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis*, «Food Chemistry», 103, pp. 1097-1103.
- MORRIS C.E., MONIER J.M. (2003): *The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 41, 429-453.
- MORRISEY J.P., OSBOURN A.E. (1999): *Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis*, «Microbiology and Molecular Biology Reviews», 63, pp. 708-724.
- NOBLE R., ROBERTS S.J. (2004): *Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: a review*, «Plant Pathology», 53, pp. 548-568.
- OSBOURN A.E., CLARKE B.R., LUNNESS P., SCOTT P.R., DANIELS M.J. (1994): *An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by Gaeumannomyces graminis var. tritici*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 45, pp. 457-467.
- OZINO O.I., MERLETTI F., FERRO P. (1996): *The action of propolis on certain microorganisms isolated from various mediums*, «Apiacta», 31, pp. 97-102.
- PALMA-GUERRERO J., JANSSON H.B., SALINAS J., LOPEZ-LLORCA L.V. (2008): *Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi*, «Journal of Applied Microbiology», 104, pp. 541-553.
- PANDEY P., MAHESHWARI D.K. (2007): *Two-species microbial consortium for growth promotion of Cajanus cajan*, «Current Science», 92, pp. 1137-1142.
- PAPAVIZAS G.C. (1968): *Survival of root-infecting fungi in soil. IV. Effect of amendments on bean root rot caused by Thielaviopsis basicola and on inoculum density of the causal organism*, «Phytopathology», 58, pp. 421-428.
- PARK R.D., JO K.J., JO Y.Y., JIN Y.L., KIM K.Y., SHIM J.H., KIM, Y.W. (2002): *Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens*, «Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology», 12, pp. 84-88.
- PÉREZ-PIQUERES A., EDEL-HERMANN V., ALABOUVETTE C., STEINBERG C. (2006): *Response of soil microbial communities to compost amendments*, «Soil Biology & Biochemistry», 38, pp. 460-470.
- POSTMA, J., WIEGERS, G.L., STEVENS, L., (2005): *Lysobacter enzymogenes in combinatie met chitosan bestrijdt Pythium aphanidermatum*, «Gewasbescherming», 36, p. 268.
- QUIROGA E.N., SAMPIETRO D.A., SOBERO J.R., SPARIGLIA M.A., VATTUONE M.A. (2006): *Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles*, «Journal of Applied Microbiology», 101, pp. 103-110.
- ROS M., HERNANDEZ M.T., GARCIA C., BERNAL A., PASCUAL J.A. (2005): *Biopesticide effect of green compost against Fusarium wilt on melon plants*, «Journal of Applied Microbiology», 98, pp. 845-854.
- SARWAR M., KIRKEGAARD J.A., WONG P.T.W., DESMARCHELIER J.M. (1998): *Biofumigation potential of brassicas III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens*, «Plant and Soil», 201, pp. 103-112.
- SCHEUERELL S., MAHAFFEE W. (2002): *Compost tea: principles and prospect for plant disease control*, «Compost Science and Utilization», 10, pp. 313-338.
- SCHEUERELL S. (2003): *Understanding how compost tea can control disease*, «BioCycle», 44, pp. 20-25.
- SCHEUERELL S.J., SULLIVAN D.M., MAHAFFEE W.F. (2005): *Suppression of seedling damping-off caused by Pythium ultimum, P. irregulare, and Rhizoctonia solani in container*

- media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources*, «Phytopathology», 95, pp. 306-315.
- SHARATHCHANDRA R.G., NIRANJAN RAJ S., SHETTY N.P., AMRUTHESH K.N., SHEKAR SHETTY H. (2004): *A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet*, «Crop Protection», 23, pp. 881-888.
- SMITH C.J. (1996): *Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system*, «New Phytologist», 132, pp. 1-45.
- SMITH K.P., GOODMAN R.M. (1999): *Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes*, «Annual Review of Phytopathology», 37, pp. 473-491.
- SMITH S.E., READ D.J. (1997): *Mycorrhizal symbiosis. Second Edition*, Academic Press, London.
- SZCZECHE M. (1999): *Suppressiveness of vermicompost against Fusarium wilt of tomato*, «Journal of Phytopathology», 147, pp. 155-161.
- SZCZECHE M., SMOLIŃSKA U. (2001): *Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against Phytophthora nicotianae Breda de Haan var. nicotianae*, «Journal of Phytopathology», 149, pp. 77-82.
- TEGEGNE G., PRETORIUS G.C., SWART W.J. (2008): *Antifungal properties of Agapanthus africanus L. extracts against plant pathogens*, «Crop Protection», 27, pp. 1052-1060.
- TENUTA M., LAZAROVITS G. (2002): *Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of Verticillium dahliae*, «Phytopathology», 92, pp. 255-264.
- TENUTA M., LAZAROVITS G. (2004): *Soil properties associated with the variable effectiveness of meat and bone meal to kill microsclerotia of Verticillium dahliae*, «Applied Soil Ecology», 25, pp. 219-236.
- TEPLITSKI M., ROBINSON J.B., BAUER W.D. (2000): *Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 13, pp. 637-648.
- TERMORSHUIZEN A.J., VAN RIJN E., VAN DER GAAG D.J., ALABOUVETTE C., CHEN Y., LAGERLÖF J., MALANDRAKIS A.A., PAPLOMATAS E.J., RÄMERT B., RYCKEBOER J., STEINBERG C., ZMORA-NAHUM S. (2007): *Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response*, «Soil Biology & Biochemistry», 38, pp. 2461-2477.
- TIKHONOV V.E., STEPNOVA E.A., BABAK V.G., YAMSKOV I.A., PALMA-GUERRERO J., JANSOHN H.B., LOPEZ-LLORCA L.V., SALINAS J., GERASIMENKO D.V., AVDIENKO I.D., VARLAMOV V.P. (2006): *Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec- 2-enyl)succinoyl/-derivatives*, «Carbohydrate Polymers», 64, pp. 66-72.
- TILSTON E.L., PITT D., GROENHOF A.C. (2002): *Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of field crops*, «New Phytologist», 154, pp. 731-740.
- TRILLAS M.I., CASANOVA E., COTXARRERA L., ORDOVÁS J., BORRERO C., AVILÉS M. (2006): *Composts from agricultural waste and the Trichoderma asperellum strain T-34 suppress Rhizoctonia solani in cucumber seedlings*, «Biological Control», 39, pp. 32-38.
- TROTEL-AZIZ P., COUDERCHET M., VERNET G., AZIZ A. (2006): *Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of Botrytis cinerea*, «European Journal of Plant Pathology», 114, pp. 405-413.
- TUITERT G., SZCZACH M., BOLLEN G.J. (1998): *Suppression of Rhizoctonia solani in potting mixtures amended with compost made from organic household waste*, «Phytopathology», 88, pp. 764-773.

- UPADHYAY A., SRIVASTAVA S. (2008): *Characterization of a new isolate of Pseudomonas fluorescens strain Psd as a potential biocontrol agent*, «Letters in Applied Microbiology», 47, pp. 98-105.
- VAN LOON L.C., BAKKER P.A.H.M., PIETERSE C.M.J. (1998): *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 453-483.
- VAN OS G.J., VAN GINKEL J.H. (2001): *Suppression of Pythium root rot in bulbous Iris in relation to biomass and activity of the soil microflora*, «Soil Biology & Biochemistry», 33, pp. 1447-1454.
- VAN ETTEN H.D., MATTHEWS D.E., MATTHEWS P.S. (1989): *Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications*, «Annual Review of Phytopathology», 27, pp. 143-164.
- VARVARO L., ANTONELLI M., BALESTRA G.M., FABÍ A., SCERMINO D., VUONO G. (2002): *Investigations on the bactericidal activity of some natural products*, International Congress "Biological products": which guarantees for the consumers.
- VEEKEN A.H.M., BLOK W.J., CURCI F., COENEN G.C.M., TEMORSHUIZEN A.J., HAMELERS H.V.M., (2005): *Improving quality of composted biowaste to enhance disease suppressiveness of compost-amended, peat based potting mixes*, «Soil Biology & Biochemistry», 37, pp. 2131-2140.
- VON BODMAN S.B., BAUER W.D., COPLIN D.L. (2003): *Quorum-sensing in plant pathogenic bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 41, 455-482.
- WHIPPS J.M. (1997): *Development in the biological control of soil-borne plant pathogens*, «Advances in Botanical Research», 26, pp. 1-84.
- WITTSTOCK U., GERSHENZON J. (2002): *Constitutive plant toxins and their role in defence against herbivores and pathogens*, «Current Opinion in Plant Biology», 5, pp. 1-8.
- ZHANG L., DONG Y. (2004): *Quorum sensing and signal interference: diverse implications*, «Molecular Microbiology», 53, pp. 1563-1571.
- ZHANG W., DICK W.A., HOITINK H.A.J. (1996): *Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to Pythium root rot and anthracnose*, «Phytopathology», 86, pp. 1066-1070.
- ZHANG Y., SMITH D.A. (1983): *Concurrent metabolism of the phytoalexins phaseollin, Kievitone and phaseollinisoflavan by Fusarium solani f.sp. phaseoli*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 23, pp. 89-100.
- ZUCCONI F., FORTE M., MONACO A., DE BERTOLDI M. (1981): *Evaluating toxicity of immature compost*, «Biocycle», 22, pp. 54-57.

