

Applicazione di microorganismi antagonisti per il controllo delle malattie delle piante e prospettive di sviluppo

STATO DELL'ARTE SUI PRODOTTI A BASE DI AGENTI DI CONTROLLO BIOLOGICO

Il numero di prodotti a base di microorganismi e sostanze naturali autorizzati a oggi in Italia per il controllo delle malattie delle piante è ancora abbastanza limitato. Complessivamente si hanno una ventina di prodotti contenenti microorganismi e circa venticinque prodotti con sostanze naturali di origine botanica e semiochimici. Se si considera che tra questi prodotti vi sono anche quelli utilizzati per il controllo biologico degli insetti dannosi, appare chiaro che il numero di prodotti biologici disponibili per il controllo delle malattie è ben lungi dal poter rispondere in modo adeguato alle esigenze fitosanitarie del nostro Paese. Anche se in Europa i prodotti biologici autorizzati sono di più (vedi tabella sotto), il loro numero è, comunque, inferiore a quello di altri paesi, come gli Stati Uniti, che in questo settore hanno un mercato più sviluppato, anche in virtù di procedure autorizzative più snelle e rapide. Attualmente sul mercato mondiale sono disponibili qualche centinaio di prodotti registrati nei vari paesi come “Plant Protection Products” a base di microorganismi antagonisti che sono impiegati per il controllo di svariate malattie delle piante. Si tratta di una quantità ancora lontana da quella dei prodotti fitosanitari di sintesi: è stato stimato che i prodotti fitosanitari biologici hanno un mercato di alcuni miliardi di dollari mentre i prodotti di sintesi superano i 110 miliardi di dollari (de Vrieze, 2015).

* *Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II*

PRINCIPI ATTIVI: CEPPI E/O MOLECOLE BIOATTIVE

Prodotti commerciali

Per completare uno sviluppo commerciale, ceppi antagonisti e molecole bioattive vengono sottoposti, nella maggior parte dei casi, a un processo di selezione laborioso e complesso. Innanzitutto devono essere soddisfatti criteri di sicurezza in termini di tossicità verso animali, piante, organismi indicatori, ecc. e di effetti collaterali indesiderati. Ad esempio, buoni candidati per il mercato devono possedere una efficacia accettabile contro i patogeni da controllare, essere attivi in aree geografiche diverse e durante gran parte della stagione, rimanere stabili durante la conservazione e avere costi competitivi con gli agrofarmaci di sintesi. Identificare ceppi e molecole che rispettino i principali requisiti di selezione è compito piuttosto arduo. Molti dei formulati attualmente in commercio contengono ceppi che sono stati selezionati senza tener conto di tutti o gran parte di questi criteri e, spesso, si rivelano inefficaci a causa di fattori legati al tipo di suolo, al clima e all'ecosistema. Altri problemi possono riguardare l'affidabilità e la ripetibilità dei risultati, aspetti relativi alla formulazione, il controllo qualità dell'inoculo, ecc.

La ricerca è fortemente impegnata nel trovare soluzioni a questi problemi. Kohl et al. (2011) hanno proposto di selezionare i microorganismi per il biocontrollo di malattie batteriche e fungine con uno screening basato sulla valutazione di vari criteri contro uno o più patogeni. Questi criteri, oltre naturalmente all'efficacia, includono le caratteristiche ecologiche necessarie per una buona attività in pieno campo, il profilo tossicologico, i costi di una produzione massiva e, non da ultimi, gli aspetti relativi ai diritti di proprietà e al marketing (Blum, 2007). Lo screening si realizza attraverso una serie di passaggi successivi impostati inizialmente su una valutazione poco costosa e rapida di molti microorganismi e, successivamente, su quella complessa e costosa di pochi candidati.

Cepi multifunzionali

Per rendere i prodotti biologici più competitivi rispetto agli agrofarmaci di sintesi, molti studi sono stati condotti per la selezione di ceppi con più funzioni utili sia per lo sviluppo e sia per la protezione delle piante.

Funghi antagonisti del genere *Trichoderma* rappresentano una buona fonte per la ricerca di ceppi multifunzionali. Molti di essi possiedono un'elevata

“competenza rizosferica”, cioè la capacità di colonizzare e crescere in associazione con le radici della pianta (Harman, 2000), sono in grado di produrre colonie micoparassitiche e litiche, degradano gli inquinanti del suolo. Essi stabiliscono un rapporto simbiotico con la pianta durante il quale producono una quantità di segnali chimici tra cui piccole proteine, peptidi, metaboliti, composti volatili, ecc. Questi segnali sono di tipo sistemico perché, pur interagendo solo con le radici, producono effetti che si rilevano su tutta la pianta. I ceppi più efficaci possono conferire una serie di benefici quali:

- aumento della crescita della pianta, specialmente delle radici e in condizioni di stress (Harman, 2000; Shores et al., 2010);
- induzione di resistenza sistemica della pianta alle malattie, anche attraverso meccanismi diversi da quelli descritti per la resistenza sistemica indotta (ISR) e la resistenza sistemica acquisita (SAR) (Bae et al., 2011; Lorito et al., 2010);
- induzione di resistenza sistemica agli stress abiotici tra cui la siccità, la salinità e la temperatura (Mastouri et al., 2010; Shores et al., 2010);
- aumento del vigore di semi di scarsa qualità (Mastouri et al., 2010; Shores et al., 2010);
- aumento dell’efficienza della pianta nell’uso dell’azoto (Mastouri et al., 2010; Shores et al., 2010).

Oltre ai funghi del genere *Trichoderma*, effetti benefici simili a quelli sopra riportati possono essere indotti anche da altri microorganismi che vivono in associazione con le radici come i rizobatteri promotori della crescita della pianta (PGPR), i funghi micorrizici e il fungo endofita *Piriformaspora indica*.

Nuovi metodi di selezione

La selezione di ceppi con le caratteristiche sopra riportate oggi è possibile perché si dispone di nuove tecnologie che consentono di eseguire protocolli sperimentali che fino a poco tempo fa erano impensabili. Attraverso la tecnica dell’high throughput, per esempio, è possibile effettuare in poco tempo lo screening di centinaia di ceppi per individuare quelli dotati di una particolare caratteristica come la capacità di secernere un determinato metabolita o quella di aumentare la crescita delle piante. Tecniche di genomica funzionale come la metabolomica e altre “omics”, sono impiegate per migliorare l’applicazione dei microbi benefici (Lorito et al., 2010). La selezione di ceppi più efficaci può essere, per esempio, condotta sulla base a) delle informazioni relative all’identificazione dei geni che si esprimono in differenti condizioni di inte-

razione; b) dell'individuazione di metaboliti coinvolti nel micoparassitismo, nella degradazione di tossine, nell'aumento della resistenza della pianta ai patogeni e agli stress abiotici, nella promozione della crescita, ecc.; c) della caratterizzazione molecolare della risposta della pianta ai microorganismi benefici e dell'identificazione delle migliori combinazioni ceppi-cultivar di pianta in termini di produttività (Harman, 2000). In particolare, la metabolomica e la proteomica possono fornire informazioni sulla possibilità di utilizzare estratti colturali contenenti miscele di metaboliti bioattivi per ottenere effetti simili a quelli causati dal microorganismo benefico che li produce (Lorito, 2010).

Negli anni più recenti, è stato messo in evidenza il ruolo cruciale che le comunità microbiche hanno per la fisiologia e lo sviluppo della pianta. Il microbioma della rizosfera contiene microorganismi benefici per la crescita, ma anche patogeni che sono in grado di superare le difese della pianta e causare malattia. Il benessere della pianta e la sua produttività dipendono molto dalla composizione del microbioma rizosferico ed endofita, e dalle interazioni tra i suoi componenti. Rispetto alle strategie tradizionali che hanno studiato le interazioni principalmente tra la pianta e uno o due gruppi di microorganismi, la ricerca attuale cerca di chiarire le relazioni tra pianta e la sua intera comunità microbica e di come quest'ultima possa aumentare la produttività. È noto che la composizione e l'abbondanza dei microorganismi che costituiscono il microbioma rizosferico dipendono dal genotipo della pianta e, quindi, dai suoi essudati radicali e dal tipo di suolo. La possibilità di modificare l'assetto complessivo della comunità microbica residente nella rizosfera in favore dei microorganismi che migliorano la produttività è diventato un obiettivo di grande interesse anche per l'industria (Mendes et al., 2013). Una possibile strategia per modificare positivamente il microbioma rizosferico è quella di introdurre nel suolo comunità sintetiche di microorganismi benefici in grado di recuperare la diversità microbica e la soppressività generale. È stato osservato, comunque, che quando sono introdotti in un ambiente nuovo, molti ceppi microbici non sopravvivono a lungo, oppure non sono in grado di proliferare raggiungendo livelli di densità nella rizosfera tali da controllare i patogeni (Raaijmakers et al., 2009). Per superare questo ostacolo, si sta sperimentando la possibilità di somministrare al suolo consorzi microbici, cioè, comunità costituite da diversi microorganismi con tratti complementari o sinergici. Questi consorzi possono consentire al microbioma di rafforzarsi per escludere competitivamente i patogeni (Bakker et al., 2012). Il problema principale nell'assemblaggio di questi consorzi risiede nella selezione di ceppi compatibili fra loro. Spesso sono stati utilizzati microorganismi che erano già noti come antagonisti e capaci di controllare da soli, con meccanismi diversi,

i patogeni. È importante osservare, però, che anche microorganismi che da soli non sono antagonisti, quando si trovano a far parte di un consorzio possono esplicare attività antimicrobiche e di stimolo della crescita e resistenza agli stress (Garbeva e de Boer, 2009). Alcuni studi hanno messo in evidenza che nei suoli soppressivi sono presenti batteri appartenenti ad alcuni generi e che la soppressività non dipende dalla presenza esclusiva di certi gruppi ma è determinata dalla loro abbondanza relativa. Sulla base delle informazioni sulla composizione dei microbiomi rizosferici di piante in diversi agrosistemi e sull'impatto che essi hanno sulle malattie è possibile disegnare microbiomi formati da set di microorganismi in grado di proteggere la pianta dai patogeni (Mendes et. al., 2013). Nella pratica, anche per semplificare la composizione del set, questi microbiomi sintetici possono essere disegnati per proteggere la pianta contro singoli gruppi di patogeni (batteri, oomiceti o funghi) e non contro i patogeni in generale.

Per le applicazioni pratiche sono stati messi a punto dei metodi che consentono di selezionare i microorganismi che sono accumulati dalle piante nei suoli dove esse crescono. Scegliendo le piante con il fenotipo migliore per il tratto desiderato (maggiore crescita e produttività, resistenza più alta, ecc.) è possibile identificare mediante un high throughput screening i microorganismi a esse associati e utilizzarli per formare dei consorzi con cui effettuare i trattamenti.

Nuovi specie utili

Oltre alla selezione di ceppi multifunzionali di specie già note, molte ricerche sono state indirizzate verso l'individuazione di nuove specie microbiche per la realizzazione di prodotti che possono essere utili anche contro patogeni di nuova introduzione. È noto, per esempio, che i funghi endofiti in associazione con la pianta ne migliorano la fitness e lo sviluppo, la tolleranza agli stress e la resistenza alle malattie (Achatz et al., 2010; Deshmukh et al., 2006; Redman, et al., 2011; Rodriguez et al., 2008; Saari e Faeth, 2012; Yue et al., 2000).

Tra gli endofiti, sono stati recentemente descritti i funghi appartenenti all'ordine *Sebacinales* (Selosse et al., 2007; Weiß et al., 2004, 2011) che sono in grado di colonizzare un gran numero di specie di piante tra cui anche quelle di grande rilevanza economica come grano, mais, soia e pomodoro (Riess et al., 2014). I *Sebacinales* sono caratterizzati da una notevole diversità filogenetica e possono avere un ruolo importante negli ecosistemi delle

piante. Poiché possono produrre effetti positivi sulle piante con cui sono in associazione (Barazani, 2005; Oberwinkler et al., 2013; Waller et al., 2005), essi rappresentano una promettente fonte di ceppi utili sia per la protezione e sia per lo sviluppo delle piante.

Anche la selezione di ceppi di microorganismi benefici ottenuti da suoli soggetti a climi desertici o freddi può essere di grande aiuto per la protezione delle piante da stress abiotici come la siccità, il caldo, le gelate, ecc. In un recente studio (Marasco et al., 2012) condotto in aziende agricole situate in zone desertiche, è stato dimostrato che anche una pianta molto sensibile al caldo come il peperone, riesce a sopravvivere e a produrre, arricchendo la propria rizosfera con batteri promotori della crescita che aumentano la capacità fotosintetica e la sintesi di biomassa in condizioni di siccità.

Molecole bioattive

Come sopra accennato, anche estratti colturali di microorganismi antagonisti possono essere utilizzati per proteggere le piante dalle malattie o per favorirne lo sviluppo. I filtrati colturali contengono miscele di molecole bioattive (proteine, metaboliti secondari, ecc.) che possono essere purificate e utilizzate sia da sole, sia in associazione con altre sostanze o con microorganismi. Le molecole bioattive possono agire inibendo la crescita dei patogeni direttamente e/o attraverso la risposta di difesa indotta nella pianta. Gli enzimi degradativi della parete cellulare dei funghi patogeni e delle piante prodotti dagli antagonisti possono attivare entrambi i meccanismi: da un lato bloccano lo sviluppo delle strutture di diffusione e moltiplicazione del patogeno e dall'altro, consentono, durante la lisi della lamella mediana e della parete primaria del tessuto vegetale, il rilascio di oligonucleotidi che sono noti induttori di resistenza (Hanson e Howell, 2004; Lorito et al., 1994, 1996). I funghi antagonisti del genere *Trichoderma* sono tra i produttori più attivi di molecole con proprietà antimicrobiche. Tra queste, diverse sono risultate coinvolte nei meccanismi di induzione della resistenza: a) proteasi, cellulasi e xilanasi (Martinez et al., 2001; Collen et al., 2005; Hanson e Howell, 2004); elicitori proteici (Djonovic et al., 2006; Seidl et al., 2006; Wang et al., 2013); una proteina espansina-simile (Brotman et al., 2008); metaboliti secondari come il 6-pentil-alfa-pirone e l'harzianolide (Malmierca et al., 2012; Vinale et al., 2012); una idrofobina di tipo II (Ruocco et al., 2014). Quest'ultima, prodotta da *Trichoderma longibrachiatum*, ha mostrato di avere una diretta attività antifungina, di funzionare

da MAMP e di promuovere la crescita di una varietà di piante quando è stata usata a dosi basse. Interessante anche la sua capacità di stimolare la formazione di radici. La distruzione del gene che la codifica ha ridotto significativamente la capacità antagonistica del fungo e la sua attività come promotore della crescita (Ruocco et al., 2014).

Per l'impiego commerciale di metaboliti secondari prodotti da microrganismi antagonisti, è necessario procedere a un'attenta analisi per valutare i possibili effetti tossici che questi composti potrebbero avere sull'ambiente e sulla salute dell'uomo. Tuttavia, diversi metaboliti prodotti sia da funghi, sia da batteri antagonisti sono attualmente in valutazione per essere impiegati come potenziali nuovi biopesticidi (Vinale et al., 2012).

MIGLIORAMENTO DELLE FORMULAZIONI

L'efficacia di un ceppo selezionato per il controllo di uno o più patogeni non è sufficiente a garantirne il successo fino a che non se ne registrano le prestazioni in condizioni commerciali. Solo quando l'agente di biocontrollo è prodotto su larga scala e utilizzato come formulato in prove di campo è possibile valutarne pienamente la validità.

Per mettere a punto una formulazione efficace è necessario avere una conoscenza profonda dell'agente di biocontrollo, del patogeno, dell'ambiente e delle interazioni con altri organismi. Lo sviluppo commerciale di un prodotto richiede anche la conoscenza delle pratiche di applicazione e degli strumenti con cui esse si eseguono. In linea di massima, un buon prodotto industriale dovrebbe conservare le caratteristiche iniziali del/i ceppo/i in esso contenuto/i quali la vitalità delle cellule microbiche, la purezza, la stabilità genetica, la capacità di colonizzare l'ospite, ecc. Queste proprietà, infatti, possono subire delle alterazioni durante i processi di produzione, formulazione, confezione, conservazione e in fase di applicazione (Leggett et al., 2011).

A differenza dei prodotti fitosanitari di sintesi che normalmente hanno una shelf-life piuttosto lunga, i prodotti biologici possono diventare inattivi perdendo la vitalità dei microorganismi in essi contenuti. Ciò, naturalmente, costituisce un serio ostacolo alla commercializzazione del prodotto che deve avere una shelf-life di almeno un anno a temperatura ambiente. La shelf-life dipende, oltre che dalla temperatura, dall'umidità. A basse temperature e in ambienti secchi, i processi metabolici di crescita dei propagoli del microrganismo conservato si rallentano, prevenendo anche l'accumulo di sostanze tossiche e il consumo di nutrienti. Se la formulazione è liquida, la vitalità dei

microorganismi deve essere preservata con la refrigerazione, il congelamento o la deidratazione se si vuole prolungare la shelf-life del prodotto. La liofilizzazione funziona anche meglio, ma è piuttosto costosa. Altri metodi includono l'incapsulazione delle cellule microbiche attraverso il loro mescolamento con materiali polisaccaridici o lipidici. È stato osservato che formulazioni ottenute con pellet di grano o caolino in gel di alginato contenente spore, conidi o biomassa di diversi isolati di *Trichoderma* aumentano la vitalità di questi nel prodotto conservato (Narayanasamy, 2013).

Le formulazioni possono variare considerevolmente in rapporto all'uso a cui sono destinate, ma devono presentarsi in una forma facilmente somministrabile e non essere tossiche. In generale, per i prodotti commerciali a base di antagonisti fungini (ceppi del genere *Trichoderma*, *Coniothyrium minitans*, *Ampelomyces quisqualis*, ecc.) sono state messe a punto diverse preparazioni sotto forma di granuli disperdibili in acqua, polvere bagnabile, polvere, microgranuli e pellets. Per gli agenti di biocontrollo batterici (ceppi dei generi *Bacillus* e *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*), le formulazioni più comuni si trovano sotto forma di granuli disperdibili in acqua, liquido, polvere bagnabile, concentrato di spore liquido, massa batterica sospesa in acqua clorurata, polvere secca, pasta, ecc.

Le formulazioni contenenti Pseudomonadi fluorescenti perdono rapidamente la loro efficacia perché questi batteri non producono endospore, cioè le strutture che assicurano una vitalità più lunga. Per questo motivo l'attenzione si è concentrata su ceppi del genere *Bacillus* che producono endospore in grado di resistere ad avverse condizioni ambientali di temperatura, pH e siccità. Ceppi di *Pseudomonas* sono, comunque, selezionati e commercializzati per la loro capacità di indurre resistenza e promozione della crescita nelle piante.

APPLICAZIONE

I metodi per somministrare i prodotti biologici per il controllo delle malattie delle piante, in molti casi sono gli stessi che si utilizzano per distribuire gli agrofarmaci di sintesi e, cioè, quelli che si basano sull'uso di irroratori, spruzzatori, sistemi per i trattamenti a immersione, ecc. Le esigenze per distribuire un prodotto biologico che contiene spore, conidi e/o micelio vivi sono, comunque, diverse. Occorrono sistemi di irrorazione a bassa pressione per salvaguardare la vitalità dei microorganismi e modalità di applicazione che possano assicurare una copertura ottimale della superficie vegetale da proteggere.

La somministrazione dei prodotti biologici può effettuarsi attraverso trattamenti dei semi, del suolo, delle radici e della parte aerea. Ognuno di questi trattamenti ha le sue specificità e dipende da opportune formulazioni dei prodotti. Per il trattamento dei semi, il coating è uno dei metodi più semplici ed efficaci e si effettua con formulazioni in polvere o in liquido. I propagoli dei microorganismi germinano sulla superficie del seme e, successivamente, colonizzano le radici delle piantine e la rizosfera svolgendo la propria attività proteggente e di promozione della crescita. È anche possibile, dopo il trattamento con l'agente di biocontrollo, incubare i semi a temperature più calde e in presenza di umidità fino a poco prima della germinazione. Questa tecnica ha il vantaggio rispetto al semplice coating di indurre una rapida e uniforme emergenza delle piantine. Inoltre, i semi così trattati sono in grado di tollerare meglio le avverse condizioni del suolo. In alcuni casi per il coating si fa ricorso a particolari sostanze che migliorano l'adesività dell'agente di biocontrollo. Per esempio, la carbossimetilcellulosa e la metilcellulosa sono state molto utili per applicare diversi agenti di biocontrollo a tuberi di patata e a semi di piante come barbabietola, grano, pomodoro, ecc. (Burges, 1998).

I trattamenti al suolo per il controllo di numerosi patogeni terricoli si possono condurre con svariati tipi di formulazioni sia solide che liquide. Le radici delle piantine possono essere trattate con spore o cellule di antagonisti in sospensione sia immergendovi le radici prima del trapianto, sia bagnando a saturazione i letti del vivaio su cui saranno allevate le piantine (Singh e Zaidi, 2002). Contro alcuni patogeni quali *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Botryodiplodia theobromae*, *A. alternata* and *R. solani* è stato osservato che l'applicazione dell'agente di biocontrollo risulta più efficace se effettuata in associazione con sostanza organica (Mustafa et al., 2009). Per i trattamenti aerei, bisogna tener presente che l'attività di microorganismi vivi dipende molto dalle condizioni climatiche come le variazioni di temperatura, l'umidità relativa, la pioggia, il vento, ecc. Questi parametri variano anche su piccola scala come, ad esempio, tra le foglie situate al centro della pianta e quelle che si trovano nelle zone più esterne. Formulati sotto forma di sospensioni liquide o di polvere sono i più adatti per questo tipo di trattamenti (Sharma et al., 2012). In alcuni casi si possono effettuare anche trattamenti multipli, per esempio ai semi e alle foglie, per controllare malattie come l'alternariosi (Singh et al., 2013). Per migliorare la somministrazione degli agenti di biocontrollo si può ricorrere anche ad altre tecniche. Per esempio, un sistema di veicolazione a base di lignite è stato utilizzato per applicazioni al suolo di *T. harzianum* contro il damping-off causato da *Rhizoctonia solani* su arachidi. Il

vantaggio di questa tecnica risiede nel fatto che mentre altri carrier come la vermiculite e la torba sono costituiti da particelle di grandezza non adatta alla somministrazione meccanica, la lignite può essere frantumata in particelle della dimensione voluta, consentendo di applicare il prodotto a una densità maggiore (Jones et al., 1984). Gli agenti di biocontrollo, in un'ottica di lotta integrata, possono essere utilizzati in combinazione con altri prodotti quali biostimolanti, ammendanti, compost soppressivi, ecc. Risultati migliori si possono ottenere associando l'uso degli antagonisti a pratiche agronomiche adottate per la protezione delle piante contro i patogeni come l'impiego di piante e portainnesti resistenti, l'eliminazione di residui vegetali infetti, il controllo dei parametri agro-meteorologici, ecc.

Attualmente sono in corso ricerche per migliorare alcuni aspetti legati alla distribuzione dei prodotti con i metodi spray e di immersione e alle modalità di applicazione.

REGISTRAZIONE

Anche la registrazione di prodotti a base di sostanze naturali e organismi e microorganismi da impiegare per il biocontrollo delle malattie delle piante, al pari degli prodotti fitosanitari di sintesi, è soggetta al Regolamento (CE) 1107/2009, che è entrato in vigore dal 14 giugno 2011. Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati tutti i macro e microorganismi e le sostanze naturali attualmente registrate per il controllo biologico in Europa e in Italia.

PROSPETTIVE FUTURE

La richiesta sempre più forte di alimenti privi di residui da prodotti fitosanitari e di un ridotto impatto di questi ultimi sull'ambiente impone un maggiore impiego di tecniche di produzione e difesa ecosostenibili. Tali esigenze sono alla base della nuova normativa europea che con la Direttiva 2009/128/CE ha predisposto una serie di misure per il corretto uso dei prodotti fitosanitari. Questa Direttiva è stata recepita in Italia con DL del 14 agosto 2012 e ha portato all'adozione del Piano d'Azione Nazionale (PAN) sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari (DL del 22 gennaio 2014). In sintesi, con il PAN ci si prefigge di *“assicurare lo sviluppo e la promozione di metodi di produzione agricola a basso apporto di prodotti fitosanitari, realizzare un uso sostenibile dei prodotti fitosanitari riducendone i rischi e gli impatti sulla salute umana e*

ANTAGONISTI MICROBICI E VIRUS IN EUROPA E IN ITALIA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	
<i>Adoxophyes orana</i> GV strain BV-0001	
<i>Agrotis segetum</i> granulosus virus	
<i>Ampelomyces quisqualis</i> strain AQ10	1
<i>Aureobasidium pullulans</i> (strains DSM 14940 and DSM 14941)	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI 600	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain FZB24	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747	1
<i>Bacillus firmus</i> I-1582	1
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	
<i>Bacillus sphaericus</i>	
<i>Bacillus subtilis</i> str. QST 713	1
<i>Bacillus subtilis</i> strain IBE 711	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> strains ABTS-1857 and GC-91	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Israeliensis</i> (serotype H-14) strain AM65-52	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA12 and EG 2348	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i> strain NB 176 (TM 14 1)	1
Baculovirus GV	
<i>Beauveria bassiana</i> strain 147	
<i>Beauveria bassiana</i> strain NPP111B005	
<i>Beauveria bassiana</i> strains ATCC 74040 and GHA	1
<i>Beauveria brongniartii</i>	
<i>Candida oleophila</i> strain O	
<i>Coniothyrium minitans</i>	1
<i>Cydia pomonella</i> Granulovirus (CpGV)	1
<i>Equisetum arvense</i> L.	
<i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus (HearNPV)	1
<i>Lecanicillium muscarium</i> (formerly <i>Verticillium lecanii</i>) strain Ve6	1
<i>Mamestra brassica</i> nuclear polyhedrosis virus	
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> strain BIPESCO 5/F52	1
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Apopka strain 97	
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> strain Fe9901	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain 251	1
Pepino Mosaic Virus, CH2 strain, isolate 1906	
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (several strains)	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain MA342	1
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain DSMZ 13134	
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain LAS02	
<i>Spodoptera exigua</i> nuclear polyhedrosis virus	

Tab. 1 Macro- e Microorganismi (inclusi i virus) antagonisti registrati in Europa e in Italia (segue)

ANTAGONISTI MICROBICI E VIRUS IN EUROPA E IN ITALIA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
<i>Spodoptera littoralis</i> nucleopolyhedrovirus	1
<i>Streptomyces</i> K61 (formerly <i>S. griseoviridis</i>)	1
<i>Streptomyces</i> lydicus WYEC 108	
<i>Trichoderma asperellum</i> (formerly <i>T. harzianum</i>) strains ICC012, T25 and TV1	1
<i>Trichoderma asperellum</i> (strain T34)	
<i>Trichoderma atroviride</i> (formerly <i>T. harzianum</i>) strains IMI 206040 and T11	1
<i>Trichoderma atroviride</i> strain I-1237	
<i>Trichoderma atroviride</i> strain SC1	
<i>Trichoderma gamsii</i> (formerly <i>T. viride</i>) strain ICC080	1
<i>Trichoderma harzianum</i> strains T-22 and ITEM 908	
<i>Trichoderma polysporum</i> strain IMI 206039	
<i>Verticillium albo-atrum</i> (formerly <i>Verticillium dahliae</i>) strain WCS850	
Zucchini Yellow Mosaik Virus, weak strain	
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV mild strain)	
PIANTE	
<i>artemisia absinthium</i> L.	
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	
<i>Rheum officinale</i>	
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	

Tab. 1 *Macro- e Microorganismi (inclusi i virus) antagonisti registrati in Europa e in Italia*

sull'ambiente, promuovendo l'uso della difesa integrata e di approcci o tecniche alternativi, quali il metodo dell'agricoltura biologica e le alternative non chimiche ai prodotti fitosanitari". In un siffatto contesto sociale e legislativo, lo sviluppo di metodi alternativi a quelli fondati sull'uso di prodotti di sintesi per la difesa delle colture sta subendo un notevole impulso destinato ad aumentare sempre più. Inoltre, è stata attuata la revisione europea delle registrazioni delle sostanze attive adoperate per la difesa fitosanitaria in agricoltura, operata con la direttiva 91/414/CEE: delle circa 1000 sostanze attive utilizzabili negli anni '90, solo il 26% di esse è stato incluso nel cosiddetto Allegato I, condizione necessaria per l'immissione in commercio dei formulati. Una tale drastica riduzione delle sostanze attive di sintesi e la contemporanea difficoltà a commercializzarne di nuove con i requisiti richiesti dalla recente normativa hanno ovviamente reso molto più problematica la difesa fitosanitaria e necessario ricorrere a metodi alternativi a quelli basati sull'uso degli agrofarmaci di sintesi. In questa ottica, sostanze naturali, microorganismi antagonisti e loro derivati costituiscono importanti risorse per sviluppare nuovi strumenti biotecnici utili per far fronte ai problemi fitosanitari. La registrazione di nuovi prodotti, comunque, rimane uno dei problemi più seri da affrontare

SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
(4Z-9Z)-7,9-Dodecadien-1-ol	
(E)-10-Dodecen-1-yl acetate	
(E)-11-Tetradecen-1-yl acetate	
(E)-2-Methyl-6-methylene-2,7-octadien-1-ol (myrcenol)	
(E)-2-Methyl-6-methylene-3,7-octadien-2-ol (isomyrcenol)	
(E)-5-Decen-1-ol	1
(E)-5-Decen-1-yl acetate	1
(E)-8-Dodecen-1-yl acetate	1
(E)-9-Dodecen-1-yl acetate	
(E,E)-7,9-Dodecadien-1-yl acetate	
(E,E)-8,10-Dodecadien-1-ol	1
(E,E)-8,10-Dodecadien-1-yl acetate	
(E,Z)-2,13-Octadecadien-1-yl acetate	1
(E,Z)-4,7-Tridecadien-1-yl acetate	
(E,Z)-7,9-Dodecadien-1-yl acetate	1
(E,Z)-8,10-Tetradecadien-1-yl	
(E,Z)-8-Dodecen-1-yl acetate	1
(E,Z)-9-dodecen-1-yl acetate; (E,Z)-9-Dodecen-1-ol; (Z)-11-Tetradecen-1-yl acetate	
(IR)-1,3,3-Trimethyl-4,6-dioxatricyclo[3.3.1.0 ^{2,7}]nonane (lineatin)	
(Z)-11-Hexadecen-1-ol	
(Z)-11-Hexadecen-1-yl acetate	
(Z)-11-Hexadecenal	
(Z)-11-Tetradecen-1-yl acetate	1
(Z)-13-Hexadecen-11-yn-1-yl acetate	
(Z)-13-Octadecenal	
(Z)-3-Methyl-6-isopropenyl-3,4-decadien-1-yl acetate	
(Z)-3-Methyl-6-isopropenyl-9-decen-1-yl acetate	
(Z)-5-Dodecen-1-yl acetate	
(Z)-7-Tetradecanole	
(Z)-7-Tetradecenal	
(Z)-8-Dodecen-1-ol	1
(Z)-8-Dodecen-1-yl acetate	1
(Z)-9-Dodecen-1-yl acetate	1
(Z)-9-Hexadecenal	
(Z)-9-Tetradecen-1-yl acetate	1
(Z)-9-Tricosene (formerly Z-9-Tricosene)	
(Z,E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol (aka Farnesol)	
(Z,E)-7,11-Hexadecadien-1-yl acetate	
(Z,E)-9,12-Tetradecadien-1-yl acetate	
(Z,Z)-7,11-Hexadecadien-1-yl acetate	

Tab. 2 Sostanze naturali (di origine botanica e semiochimici) attive registrate in Europa e in Italia (segue)

SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
(Z,Z)-Octadien-1-yl acetate	
(Z,Z,Z,Z)-7,13,16,19-Docosatetraen-1-yl isobutyrate	
1,7-Dioxaspiro-[5.5]-undecane	
1-Decanol	
Ascorbic acid	
Biohumus	
Blood meal	
Bone Oil	
Capric acid (CAS 334-48-5)	1
Caprylic acid (CAS 124-07-2)	1
Casein	
Cerevisane	
Chinin hydrochlorid	
Citrus extract	
Citrus extract/grapefruit extract	
Citrus extract/grapefruit seed extract	
Conifer needle powder	
Dodecan-1-ol	1
Dodecyl acetate	1
Extract from Menta piperita	
Extract from Plant Red oak, Prickly pear cactus, Fragrant sumac, Red mangrove	
Extract from tea tree	
FEN 560 (Fenugreek seed powder)	1
Garlic extract	
Garlic pulp	
Gelatine	
Gentian violet	
Geraniol	
Grease (bands, fruit trees)	
Hydrolysed proteins	1
Lactic acid	
Lactofen	
Laminarin	1
Lanolin	
Lauric acid (CAS 143-07-7)	
Lecithin	
Lecithins	
Maleic hydrazide	1
Maleic hydrazide and its salts, other than its choline, K and Na salts	
Maltodextrin	

Tab. 2 Sostanze naturali (di origine botanica e semiochimici) attive registrate in Europa e in Italia (segue)

SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
Milk albumin	1
Mimosa tenuiflora extract	
Onion extract	
Orange oil	
Papaine	
Pepper	
Plant oils / Blackcurrant bud oil	
Plant oils / Citronella oil	
Plant oils / Citronellol	
<i>Plant oils / Clove oil</i>	
Plant oils / Coconut oil	
Plant oils / Daphne oil	
Plant oils / Eucalyptus oil	
Plant oils / Gaiac Wood oil	
Plant oils / Garlic oil	
Plant oils / Lemongrass oil	
Plant oils / Maize oil	
Plant oils / Marjoram oil	
Plant oils / Olive oil	
Plant oils / Peanut oil	
Plant oils / Pinus oil	
Plant oils / Soya oil	
Plant oils / Soybean oil, epoxylated	
<i>Plant oils / Spear mint oil</i>	
Plant oils / Sunflower oil	
Plant oils / Ylang-Ylang oil	
<i>Plant oils/ Rape seed oil</i>	
Propolis	1
Putrescine (1,4-Diaminobutane))	
Repellent (by taste) of vegetal and animal origin/extract of food grade/ phosphoric acid and fish flour	
Repellents by smell of animal or plant origin/ fish oil	
<i>Repellents by smell of animal or plant origin/ sheep fat</i>	
Repellents by smell of animal or plant origin/ tall oil crude	
Repellents by smell of animal or plant origin/ tall oil pitch	
Repellents: Essential oils	
Repellents: Fatty acids, fish oil	
Repellents: Tall oil crude (CAS 93571-80-3)	
Rescalure	
Resins	
Resins and polymers	

Tab. 2 Sostanze naturali (di origine botanica e semiochimici) attive registrate in Europa e in Italia (segue)

SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
Reynoutria sachalinensis extract Sea-algae extract (formerly sea-algae extract and seaweeds) Sebacic acid Soybean extract <i>Straight Chain Lepidopteran Pheromones</i> Streptomycin Strychnine Sucrose Tagetes oil Tar acids Tar oils Trichloronat cis-Zeatin delta-endotoxin of <i>Bacillus thuringiensis</i>	1

Tab. 2 *Sostanze naturali (di origine botanica e semi chimici) attive registrate in Europa e in Italia*

sia a livello europeo, sia in Italia per le difficoltà tecniche da superare, per la complessità dell'iter autorizzativo e per i costi. Alla fine, bisogna ottenere prodotti biologici che possano competere con i tradizionali e meno costosi prodotti chimici, per produrre più derrate, limitando o annullando l'impatto sull'ambiente e sulla salute dell'uomo. Le piante, come gli altri esseri viventi dipendono dai microbi: la sfida da affrontare nel futuro sarà quella di selezionare ceppi efficaci e commercialmente validi, specialmente perché molti di essi sono pianta-specifici e la composizione del rizobioma può variare rapidamente (Lorito, 2015).

RIASSUNTO

Le riserve dell'opinione pubblica sull'uso dei prodotti fitosanitari di sintesi e il ruolo centrale che l'Unione Europea ha assegnato alla lotta integrata alle malattie delle piante (IPM) con l'emissione della Direttiva 2009/128 hanno dato un forte impulso alla ricerca di nuovi strumenti biotecnici per far fronte alle problematiche fitosanitarie.

I microorganismi antagonisti e le molecole naturali con proprietà antimicrobiche sono tra le fonti più utili per lo sviluppo di prodotti commerciali alternativi da impiegare in programmi di protezione delle piante a minore impatto sulla salute dell'uomo e sull'ambiente. In questo lavoro sono riportate e discusse le principali strategie adottate ai nostri giorni per ottenere prodotti fitosanitari migliori rispetto a quelli attualmente in commercio, selezionando ceppi più efficaci in diverse condizioni ambientali, ottimizzando la produzione e le formulazioni, usando più efficienti sistemi di somministrazione.

Sono prese brevemente in considerazione anche le difficoltà legate alla registrazione dei prodotti biologici per la loro immissione sul mercato.

ABSTRACT

Public concern about the use of synthetic chemical pesticides and the central place that the European Union assigned to IPM within its 2009/128 Directive on the Sustainable use of pesticides are among the most important factors that require new alternative tools to control plant diseases. Antagonistic microbes and natural antimicrobial molecules represent a good source for the development of biopesticides which can be useful to make plant protection more sustainable. In this paper we report and discuss the main issues concerning the strategies adopted today to select strains more effective under different conditions, improve production and formulations, and use more efficient delivery systems. Finally, registration difficulties to commercialize microbial biopesticides are also considered.

BIBLIOGRAFIA

- ACHATZ B., VON RUDEN S., ANDRADE D., NEUMANN E., PONS-KUHNEMANN J., KOGL K.H., FRANKEN P., WALLER F. (2010): *Root colonization by Piriformospora indica enhances grain yield in barley under diverse nutrient regimes by accelerating plant development*, «Plant Soil», 333, pp. 59-70.
- BAE H., ROBERTS D.P., LIM HS, STREM M.D., PARK S.C., RYU C.M., MELNICK R.L., BAILEY B.A. (2011): *Endophytic Trichoderma isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against Phytophthora capsici in hot pepper using multiple mechanisms*, «Molecular Plant Microbe Interactions», 24, pp. 336-51.
- BAKKER M.G., MANTER D.K., SHEFLIN A.M., WEIR T.L., VIVANCO J.M. (2012): *Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management*, «Plant Soil», 360, pp. 1-13.
- BARAZANI O., BENDEROTH M., GROTEN K., KUHLEMEIER C., BALDWIN I.T. (2005): *Piriformospora indica and Sebacina vermifera increase growth performance at the expense of herbivore resistance in Nicotiana attenuata*, «Oecologia», 146, pp. 234-243.
- BLUM B.J. (2007): *Concepts and Strategies for a successful product development: the industry's development concept*, in Cost Action 850 – Conference Schloss.
- BROTMAN Y., BRIEF E., VITERBO A., CHET I. (2008): *Role of swollenin, an expansin-like protein from Trichoderma, in plant root colonization*, «Plant Physiology», 147, pp. 779-89.
- BURGES, H.D. (1998): *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*, ed. by Burges, H.D, Kluwer, Dordrecht, pp. 383.
- COLLÉN A., SALOHEIMO M., BAILEY M., PENTTILÄ M., PAKULA T.M. (2005): *Protein production and induction of the unfolded protein response in Trichoderma reesei strain Rut-C30 and its transformant expressing endoglucanase I with a hydrophobic tag*, «Biotechnology and Bioengineering», 89, pp. 335-44.
- DE VRIEZE J. (2015): *The littlest farmhands*, «Science», 349, pp. 680-683.
- DESHMUKH S., HÜCKELHOVEN R., SCHÄFER P., IMANI J., SHARMA M., WEISS M., WALLER F., KOGL K.-H. (2006): *The root endophytic fungus Piriformospora indica*

- requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley, «Proceedings of National Academy of Sciences USA», 103, pp. 18450-18457.
- DJONOVIC S., POZO M.J., DANGOTT L.J., HOWELL C.R., KENERLEY C.M. (2006): *Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus Trichoderma virens induces plant defense responses and systemic resistance*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 19, pp. 838-853.
- GARBEVA P., DE BOER W. (2009): *Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression*, «Soil Microbiology», 58, pp. 36-46.
- HANSON L.E., HOWELL C.R. (2004): *Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of Trichoderma virens*, «Phytopathology», 94, pp. 171-176.
- HARMAN G.E. (2000): *Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on Trichoderma harzianum T-22*, «Plant Disease», 84, pp. 377-93.
- JONES R.W., PETTIT R.E., TABER R.A. (1984): *Lignite and stillage: carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil*, «Phytopathology», 74, pp. 1167-1170.
- KOHL J., POSTMA, J., NICOT, P., RUOCCO M., BLUM B. (2011): *Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria*, «Biological Control», 57, pp. 1-12.
- LEGGETT M., LELAND J., KELLAR K., EPP B. (2011): *Formulation of microbial biocontrol agents- an industrial perspective*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 33, pp. 101-107.
- LORITO M. (2015): *The littlest farmhands*, «Science», 349, pp. 680-683.
- LORITO M., PETERBAUER C., HAYES C.K., HARMAN G.E. (1994): *Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination*, «Microbiology», 140, pp. 623-629.
- LORITO M., WOO S.L., D'AMBROSIO M., HARMAN G.E., HAYES C.K., KUBICEK C.P., SCALA F. (1996): *Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 9, pp. 206-213.
- LORITO M., WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E. (2010): *Translational research on Trichoderma: from 'omics to the field*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 395-417.
- MALMIERCA M.G., CARDOZA R.E., ALEXANDER N.J., MCCORMICK S.P., HERMOSA R., MONTE E., GUTIÉRREZ S. (2012): *Involvement of Trichoderma trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes*, «Applied Environmental Microbiology», 78, pp. 4856-68.
- MARASCO R., ROLLI E., ETTOUMI B., VIGANI G., MAPELLI F., BORIN S., ABOU-HADID A.F., EL-BEHAIRY U.A., SORLINI C., CHERIF A., ZOCCHI G., DAFFONCHIO D. (2012): *A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming*, «PLOS ONE», 7, e48479. doi:10.1371/journal.pone.0048479
- MASTOURI F., BJORKMAN T., HARMAN G.E. (2010): *Seed treatments with Trichoderma harzianum alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings*, «Phytopathology», 100, pp. 1213-1221.
- MENDES R., GARBEVA P., RAAIJMAKERS J. M. (2013): *The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms*, «FEMS Microbiology Reviews», 37, pp. 634-663.
- NARAYASAMI P. (2013): *Mechanisms of action of fungal biological control agents*, in Nayarannassami P. (ed), *Biological management of diseases of crops*, vol. 1, *Characteristics of biological control agents*, Springer, Dordrecht, pp. 99-200.
- OBERWINKLER F., RIESS K., BAUER R., SELOSSE M.-A., WEISS M., GARNICA S., ZUCCARO A. (2013): *Enigmatic Sebaciniales*, «Mycol Progress», 12, pp. 1-27.

- RAAIJMAKERS J.M., PAULITZ T.C., STEINBERG C., ALABOUVETTE C., MOENNE-LOCCHOZ Y. (2009): *The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms*, «Plant and Soil», 321, pp. 341-361.
- REDMAN R.S., KIM Y.-O., WOODWARD C.J.D.A., GREER C., ESPINO L., DOTY S.L., RODRIGUEZ R.J. (2011): *Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change*, «PLoS ONE», 6, e14823. doi:10.1371/journal.pone.0014823.
- RIESS K., OBERWINKLER F., BAUER R., GARNICA S. (2014): *Communities of endophytic sebacinales associated with roots of herbaceous plants in agricultural and grassland ecosystems are dominated by Serendipita herbamans sp. nov.*, «PLoS ONE», 9, e94676. doi:10.1371/journal.pone.0094676.
- RODRIGUEZ R.J., HENSON J., VAN VOLKENBURGH E., HOY M., WRIGHT L., BECKWITH F., KIM Y.O., REDMAN R.S. (2008): *Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis*, «The ISME Journal», 2, pp. 404-416.
- RUOCCO M., LANZUISE S., LOMBARDI N., WOO S.L., VINALE F., MARRA R., VARLESE R., MANGANIELLO G., PASCALE A., SCALA V., LORITO M. (2015): *Multiple roles and effects of a novel Trichoderma hydrophobin*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 28, pp. 167-179.
- SAARI S., FAETH S.H. (2012): *Hybridization of Neotyphodium endophytes enhances competitive ability of the host grass*, «New Phytologist», 195, pp. 231-236.
- SELOSSE M.-A., SETARO S., GLATARD F., RICHARD F., URCELAY C., WEISS M. (2007): *Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae*, «New Phytologist», 174, pp. 864-878.
- SEIDL V., SCHMOLL M., SCHERM B., BALMAS V., SEIBOTH B., MIGHELI Q., KUBICEK C.P. (2006): *Antagonism of Pythium blight of zucchini by Hypocrea jecorina does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolite derepression*, «Fems Microbiology Letters», 257, pp. 145-151.
- SHARMA B., SHARMA A., ARORA S., GUPTA S., BISHNOI M. (2012): *Formulation, optimization and evaluation of atorvastatin calcium loaded microemulsion*, «Journal Pharmaceutics & Drug Delivery Research», 1:3. Doi:10.4172/2325-9604.1000109.
- SHORESH M., MASTOURI F., HARMAN G. (2010): *Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 21-43.
- SINGH R.B., SINGH H.K., ARPITA PARMAR. (2014): *Yield loss assessment due to Alternaria blight and its management in linseed*, «Pakistan Journal Of Biological Sciences», 17, pp. 511-516.
- SINGH U.S., ZAIDI N.W. (2002): *Current Status of formulation and delivery of fungal and bacterial antagonists for disease management in India*, pp 168-179, in *Microbial Biopesticide Formulations and Application* (Eds Rabindra R.J., Hussaini S.S., Ramanujam B.), Project Directorate of Biological Control, Bangalore, pp. 269.
- VINALE F., SIVASITHAMPARAM K., GHISALBERTI E.L., RUOCCO M., WOO S.L., LORITO M. (2012): *Trichoderma secondary metabolites that affect plant metabolism*, «Natural Product Communication», 7, pp. 1545-1550.
- WALLER F., ACHATZ B., BALTRUSCHAT H., FODOR J., BECKER K., FISCHER M., HEIER T., HÜCKELHOVEN R., NEUMANN C., VON WETTSTEIN D., FRANKEN P., KOGEL K.H. (2005): *The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield*, «Proceedings of National Academy of Sciences USA», 102, pp. 13386-13391.
- WANG J.W., WU J.Y. (2013): *Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures*, «Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology», 134, pp. 55-89.

- WEISS M., SELOSSE M.-A., REXER K.-H., URBAN A., OBERWINKLER F. (2004): *Sebacinales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential*, «Mycological Research», 108, pp. 1003-1010.
- WEISS M., SÝKOROVÁ Z., GARNICA S., RIESS K., MARTOS F., KRAUSE C., OBERWINKLER F., BAUER R., REDECKER D. (2011): *Sebacinales everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes*, PLoS ONE 6(2): e16793. doi:10.1371/journal.pone.0016793
- YUE C., MILLER C.J., WHITE J.E.J., RICHARDSON M. (2000): *Isolation and characterization of fungal inhibitors from Epichloa festucae*, «Journal of Agricultural Food Chemistry», 48, pp. 4687-4692.