

GIOVANNI VANNACCI\*, SABRINA SARROCCO\*, SUSANNA PECCHIA\*,  
MARIAROSARIA VERGARA\*

## Innovazioni nella difesa delle colture con mezzi a basso impatto ambientale: malattie da funghi

### INTRODUZIONE

Le malattie fungine rappresentano uno dei principali fattori limitanti le produzioni agrarie. Il delicato equilibrio che si deve stabilire tra la necessità di ottenere produzioni di qualità derivanti da pratiche agricole sostenibili, ma che siano, al contempo, remunerative per i produttori e a costi accessibili per i consumatori, non consente, al momento attuale, di rinunciare completamente al supporto della chimica di sintesi. Impone, tuttavia, la ricerca e la sperimentazione di strategie e di strumenti innovativi o alternativi che vadano ad arricchire il limitato arsenale a disposizione degli agricoltori per difendere quelle colture da cui tutti noi dipendiamo per il nostro sostentamento. Ben vengano, quindi, anche nuovi principi attivi di sintesi, se a più basso impatto ambientale e tossicità.

Di seguito passeremo in rassegna strumenti tecnici già disponibili per l'agricoltore, senza per questo pretendere che sia una rassegna esaustiva, e strumenti, quali gli OGM, la cui disponibilità non sarà immediata ma la cui importanza non può essere sottaciuta. L'inclusione di questo o quel prodotto o tecnica, non implica automaticamente un giudizio acriticamente positivo; in diversi casi le ricerche e la sperimentazione in campo hanno fornito risultati contrastanti, e, quindi, per alcuni prodotti o tecniche ricordati saranno necessari approfondimenti e aggiustamenti, prima di poterli considerare come pienamente affidabili.

\* *Dipartimento di Coltivazione e difesa delle specie legnose "G. Scaramuzzi", Università degli Studi di Pisa*

## OGM

La resistenza delle piante alle malattie è un efficace meccanismo di difesa naturale dai patogeni, infatti la malattia risulta essere l'eccezione, e non la regola, in natura.

L'ingegneria genetica ha aperto nuove vie per la difesa delle piante. Il sequenziamento di genomi completi e lo sviluppo recente della genomica funzionale hanno contribuito alla comprensione dei meccanismi, sia costitutivi che indotti, utilizzati dall'ospite vegetale in seguito all'attacco del patogeno. Le informazioni sull'espressione genica rendono più facilmente realizzabile la manipolazione genetica e forniscono nuove opportunità per introdurre transgeni derivanti da sistemi diversi nelle piante coltivate. Inoltre, i dati di proteomica e di metabolomica rappresentano un valido strumento per l'analisi di funzioni geniche anche in sistemi biologici non ancora sequenziati (Collinge et al., 2008a).

Tuttavia lo sviluppo di strategie molecolari applicate alla difesa delle piante da malattie fungine risulta notevolmente più lento di quello per la resistenza agli erbicidi o agli insetti, già introdotta in molte piante transgeniche. Ciò è dovuto a vari fattori, tra cui la resistenza solo parziale spesso riscontrata nei confronti di patogeni fungini, la complessità del sistema biologico e la molteplicità dei meccanismi coinvolti nell'interazione (Collinge et al., 2008b). Per questi motivi la produzione di piante transgeniche resistenti ai funghi rappresenta uno scopo importante, ma più laborioso, da raggiungere; infatti, varietà geneticamente modificate resistenti ai funghi non sono ancora presenti sul mercato, nonostante la quantità delle informazioni scientifiche disponibili e degli sforzi impiegati nella manipolazione genetica di molte piante coltivate.

Vari approcci mirati alla produzione di piante transgeniche resistenti ai funghi patogeni sono già stati applicati con successo in laboratorio: quello più diretto consiste nell'introduzione di geni, derivati da piante o da microrganismi, codificanti per metaboliti secondari antifungini, che implicano l'interferenza diretta o indiretta con i meccanismi di patogenesi o il disturbo della fisiologia del patogeno. Nell'ambito di questa strategia sono stati utilizzati geni coinvolti nella degradazione della parete cellulare dei funghi (es. chitinasi o glucanasi) o nella detossificazione di metaboliti tossici rilasciati dal patogeno o ancora nel potenziamento delle risposte di difesa nella pianta geneticamente modificata (es. fitoalessine, inibitori di proteine o sostanze tossiche). Una strategia alternativa riguarda la regolazione dei meccanismi di difesa dell'ospite, sfruttando processi di riconoscimento del patogeno o vie di trasduzione del segnale associate all'infezione. In questo caso la modificazio-

ne genetica è attuata a carico di geni di resistenza (geni R) o di trasduzione del segnale di riconoscimento che consentono un'identificazione precoce del patogeno innescando la reazione ipersensibile (HR), oppure una produzione aumentata e rapida di segnali, come acido salicilico o jasmonico, che attivano un'efficace risposta sistemica (SAR) (Collinge et al., 2008b).

Numerosi esempi di strategie transgeniche che risultano in aumentata resistenza alle malattie fungine sono riportati in letteratura. Il riso è stato trasformato per resistenza a *Rhizoctonia solani* con geni codificanti per proteine di difesa (chitinasi e taumatina), derivati da varietà di riso resistente (Kaplana et al., 2008). Piante di cotone transgenico sono state ottenute per trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* con un gene che codifica per un peptide sintetico antimicrobico (Rajasekaran et al., 2007). Un gene isolato da melo selvatico, omologo a geni di resistenza del pomodoro a *Cladosporium fulvum*, è stato introdotto in una varietà coltivata di melo che è risultata resistente a *Venturia inaequalis* (Belfanti et al., 2004). Piante di soia e di girasole geneticamente modificate, in seguito a inserimento di un gene per l'ossalato ossidasi di grano, risultano resistenti a *Sclerotinia sclerotiorum* (l'ossalato è un importante fattore di patogenicità di *S. sclerotiorum*) (per la soia Donaldson et al., 2001; per il girasole Hu et al., 2003). Tabacco trasformato con transgeni che codificano per chitinasi e glucanasi, rispettivamente derivati da riso e medica, mostra un'aumentata capacità di difesa contro attacchi fungini (Zhu et al., 1994). Due esempi di trasformazione con un gene coinvolto nella sintesi di fitoalessine, derivato da vite, riguardano l'orzo e il grano transgenici, che esprimono stilbene sintasi per la sintesi di resveratrolo e mostrano aumentata resistenza a *Botrytis cinerea* (Leckband e Lorz, 1998), a *Puccinia recondita* e a *Septoria nodorum* (Serebriakova et al., 2005).

Particolare importanza riveste per l'Europa in generale e l'Italia in particolare la difesa della vite, data l'importanza della coltura e la gravità delle potenziali malattie (oidio e peronospora in particolare). Una recente indagine europea rivela quanto sia importante il controllo delle malattie fungine della vite, dato l'enorme impatto, da un punto di vista ambientale ed economico, in termini di utilizzo di fungicidi: mentre le vigne coprono solo il 5% dei terreni coltivati, la coltivazione della vite è responsabile del 70% dei fungicidi adoperati in Europa (Travis, 2008). Esistono circa 70 prove in campo con viti geneticamente modificate tra USA, Canada, Australia ed Europa, e alcune di queste riguardano resistenza a funghi patogeni (Grando M.S., <http://www.futuraagra.it/>). Ma anche in questo caso il problema più importante non sembra essere quello tecnico, ma la probabile non accettazione da parte del consumatore, e dei produttori, specialmente in un settore, quale quello del

vino, dove l'immagine è di fondamentale importanza ai fini della formazione del prezzo del prodotto finale.

Infine, un risvolto rilevante delle infezioni fungine riguarda la produzione di micotossine (sostanze altamente tossiche per animali e uomo) da parte di alcuni patogeni delle colture: ad esempio cereali attaccati da *Fusarium* producono granella contenente alcuni tipi di micotossine (es. fumonisine, tricoteceni e zearalenone) mentre piante attaccate da *Aspergillus* possono contenere aflatossine. La presenza dei funghi micotossigeni, e quindi di micotossine, si può riscontrare sia in campo sulla pianta sia in una qualunque delle successive fasi di conservazione e trasformazione dei prodotti vegetali; per questo è molto importante difendere già in campo le piante di interesse agronomico da questo tipo di funghi, allo scopo di prevenire la contaminazione da micotossine delle derrate. Le strategie biotecnologiche applicate alla protezione di colture di cereali sono state riportate in numerosi casi: ad esempio, per il controllo di *Fusarium* un gene di *Arabidopsis*, che regola l'attivazione di SAR, è stato inserito con successo in grano (Makandar et al., 2006) e l'introduzione in mais di un gene che codifica per un enzima che degrada lo zearalenone, ha permesso una significativa riduzione della contaminazione da questa micotossina nelle piante transgeniche (Igawa et al., 2007).

Le sperimentazioni autorizzate in campo sono poche, ad es. è stato sviluppato da Syngenta un grano GM resistente a *Fusarium*, contenente un transgene in grado di detossificare le micotossine di *Fusarium*, che potrebbe essere immesso sul mercato nel 2010; la sperimentazione della coltura è stata consentita in Germania dal 2003 (Notification Number: B/DE/02/143, richiesto dalla Germania, compagnia Syngenta Seeds GmbH, nel 2002). L'università di Zurigo ha ottenuto l'autorizzazione dall'Ufficio federale dell'ambiente per la sperimentazione in campo dal 2008 al 2010 di piante transgeniche di grano con un'accresciuta resistenza all'oidio. Pianta di grano GM resistente a *Fusarium* sono state ottenute anche in Spagna, dove sono state rilasciate in campo, per sperimentazione, dal 2004 (Notification Number: B/ES/04/08-CON, richiesta da Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

In Italia, è stato ottenuto un limone transgenico, varietà locale Femminello siracusano, ingegnerizzato con il gene chitinasi *Chit42* isolato da *Trichoderma harzianum*, per la resistenza verso patogeni fungini. La resistenza è stata valutata nei confronti di *Phoma tracheiphila*, agente del mal secco (sperimentazione programmata dal 2005 al 2015) (Notification Number: B/IT/04/03, richiesta dell'Italia, Università di Catania, Facoltà di Agraria, Dip. OrtoFloroArboricoltura e Tecnologie Agroalimentari, Gentile et al., 2002;

La Malfa et al., 2007). Non è il caso di entrare nel merito del problema della sicurezza d'uso e dei rischi ambientali connessi con l'uso di piante GM. In altre sedi l'argomento è stato trattato, e bistrattato, ma forse varrebbe la pena di considerare anche queste, con le dovute precauzioni, tra le possibili alternative miranti alla riduzione del danno, questo certo, conseguente un eccessivo impiego della chimica per la difesa delle colture.

#### BIOFITOFARMACI

L'impiego di agrofarmaci a base microbiologica è ancora nella sua infanzia.

Nonostante la grande massa di ricerche sull'argomento, ben pochi prodotti sono arrivati sul mercato. Alla base esistono motivazioni tecniche ed economiche. Lo sviluppo di un biofitofarmaco prevede, semplificando, quattro fasi distinte: l'isolamento, la selezione, la produzione della biomassa e la formulazione. A queste seguono il confezionamento e la distribuzione, che, seppur non facenti parte dello sviluppo, nondimeno giocano un ruolo molto importante nel garantire il successo a un prodotto. Isolamento e selezione sono di norma portati avanti da ricercatori che operano con fondi pubblici, essendo le due fasi a maggior rischio, e non sempre i ricercatori selezionano tenendo presenti le successive fasi di sviluppo né i problemi di mercato. Una volta individuato un microrganismo di interesse, dovrebbero subentrare aziende private con la messa a punto di metodi proprietari di fermentazione e formulazione. Ma il coinvolgimento di aziende dipende sostanzialmente da considerazioni di tipo economico. Purtroppo, in questo settore esiste una contraddizione non risolta. I principi attivi dei biofitofarmaci sono microrganismi e, come tali, usualmente ben adattati a specifiche nicchie ecologiche. Questo è un tratto che li rende particolarmente interessanti da un punto di vista dell'impatto ambientale, di fatto riducendolo, ma ne limita l'uso alle stesse specifiche nicchie. Quello che appare essere un vantaggio ecologico, si sostanzia in una più o meno marcata riduzione del mercato potenziale, e questo dovrebbe favorire la nascita di piccole aziende biotech deputate alla produzione e commercializzazione di limitate quantità di numerosi prodotti, specifici per ben definiti ambienti e colture. Ma gli elevati costi della registrazione mettono fuori mercato le piccole aziende, che non hanno grossi capitali da investire o, anche avendoli, non possono permettersi di attendere anni, quelli necessari alla registrazione, prima di poter generare guadagni con la commercializzazione del prodotto registrato. Le grandi aziende, per contro, non sono interessate a piccole fette di mercato e la conseguenza è un ridot-

PRINCIPIO ATTIVO	
Ampelomyces quisqualis	<i>Trichoderma harzianum</i> ICC 012
Bacillus subtilis	<i>Trichoderma viride</i> ICC 080
Coniothyrium minitans	Pseudomonas chlororaphis
Trichoderma harzianum	Streptomyces griseoviridis

Tab. 1 *Elenco dei principi attivi antifungini di tipo microbiologico registrati in Italia*

to numero di agrofarmaci di origine microbiologica sul mercato, salvo poi trovare in commercio prodotti commercializzati come ammendanti o simili, di cui, a parole, sono declamate proprietà miracolose ma che, nei fatti, sono privi di qualunque tipo di controllo e garanzia. Di fondamentale importanza appare, quindi, la riduzione dei costi di registrazione e la semplificazione dell'iter burocratico se si vuole che questi strumenti, ritenuti, in generale, a basso impatto ambientale e di scarsi o nulli rischi per la salute umana, trovino adeguata diffusione nella pratica agricola.

La ricerca, in particolare negli ultimi anni, si è particolarmente orientato verso lo studio dei meccanismi d'azione dell'antagonismo, anche grazie ai grandi sviluppi della biologia molecolare. Ricerche di grande interesse scientifico e che hanno aperto anche nuove possibilità di lotta attraverso l'impiego di geni e prodotti genici derivati dagli antagonisti, ma gli effetti erratici di questi strumenti tecnici persistono, e sono anche la conseguenza dei limitati studi condotti su altri aspetti, meno paganti in termini di risonanza scientifica e "impact factor", quali quelli relativi alle condizioni che consentono agli antagonisti di manifestare appieno le loro potenzialità in condizione di normale impiego agricolo. Ricerche di campo, quindi, sulla cui base si possono definire, ad esempio, tipo di inoculo da produrre, modi, tempi e quantità di prodotto da impiegare o interazioni tra antagonista e specie/cultivar degli ospiti da difendere.

Anche da un punto di vista normativo, la situazione europea è alquanto complicata, con una procedura di registrazione farragिनosa che prevede diversi step e il coinvolgimento di tutti gli stati membri, senza che al richiedente siano garantiti tempi certi per l'accoglimento, o il rigetto, della sua richiesta. Basti pensare che nei paesi extra europei, tutta la procedura deve terminare, salvo errori o carenze nella documentazione, entro 18 (USA), 16 (Canada) o 12 (Australia) mesi. I limiti della normativa europea riflettono la struttura politica dell'Unione, che deve mediare tra la necessità di un'amministrazione centralizzata e le autonomie dei singoli stati. La conseguenza è che negli USA 38 microrganismi sono inclusi nella lista dei principi attivi utilizzabili in agricoltura, mentre in Italia sono solamente 8 (Annexe 1 della Direttiva 91/414 EEC) (tab. 1).

I principi attivi (microrganismi) di biofitofarmaci attualmente registrati e commercializzati in Italia sono funghi filamentosi e batteri che, attraverso differenti meccanismi d'azione, permettono la lotta a diversi funghi fitopatogeni, sia colonizzatori delle parti aeree che di origine tellurica. Ad esempio, per la lotta all'oidio, è possibile utilizzare il fungo iperparassita *Ampelomyces quisqualis*, principio attivo di un prodotto impiegato con successo nella lotta agli agenti del mal bianco appartenenti alla famiglia delle *Erysiphaceae*. In letteratura sono segnalate più di 64 specie di oidi suscettibili all'azione dell'antagonista che sono in grado di colpire più di 256 specie vegetali. L'antagonista è in grado di infettare l'ospite fungino e differenziare i propri corpi fruttiferi (picnidi) all'interno delle ife, dei conidiofori e dei periteci cleistotecioidi dell'oidio del quale, grazie a questo parassitismo, riduce la crescita e causa la morte.

Il micoparassitismo è un meccanismo d'azione che viene utilizzato da un altro fungo principio attivo di un biofitofarmaco: *Conyothirium minitans*. Si tratta di un fungo non patogeno di origine tellurica, che mostra una notevole capacità di parassitizzare, inibendone la germinazione e quindi causandone la morte, gli sclerozi differenziati da diverse specie di *Sclerotinia*, come *S. sclerotiorum* e *S. minor*. Questi patogeni di origine tellurica, capaci di attaccare e provocare ingenti danni su numerose specie vegetali di interesse agrario, danno luogo a malattie a interesse semplice la cui gravità dipende all'inoculo iniziale: in questo caso, molto vantaggiosa è la possibilità di utilizzare un trattamento che riduca l'inoculo iniziale del patogeno, rappresentato appunto dalla quantità di sclerozi presenti nel terreno. L'impiego di *C. minitans* è una strategia di tipo preventivo e non curativo, quindi il trattamento del terreno deve essere effettuato prima della messa a dimora della pianta coltivata in modo da ridurre la presenza del patogeno nel terreno.

Sempre nell'ambito di biofitofarmaci a base di funghi filamentosi, quelli il cui principio attivo è costituito da spore di *Trichoderma harzianum*, rappresentano un ottimo strumento nella lotta ai patogeni fungini. In particolare, l'isolato T22 di *T. harzianum*, prodotto della fusione dei protoplasti di due isolati diversi, ciascuno con caratteristiche particolari e vantaggiose, si è dimostrato in grado di contenere lo sviluppo delle malattie causate da diversi patogeni di origine tellurica grazie a diverse caratteristiche che vanno dalla rizosfera competenza, alla competizione per la sfermosfera in condizione di ferro carenza, fino alla capacità di indurre resistenza nelle piante trattate. In aggiunta, il microrganismo è in grado di stimolare la crescita e la produttività delle piante cresciute nei terreni trattati con il biofitofarmaco, il che conferisce un valore aggiunto al prodotto che può essere utilizzato anche come

biofertilizzante. Anche per questo microrganismo l'azione è preventiva e non curativa.

Di particolare interesse appaiono i biofitofarmaci il cui principio attivo è costituito da più di un microrganismo: è il caso di un prodotto registrato anche in Italia contenente due funghi appartenenti al genere *Trichoderma* e più specificatamente l'isolato ICC 012 di *T. harzianum* e ICC 080 di *T. viride*. Grazie alle attività micoparassitarie, di competizione per i nutrienti e lo spazio e la produzione di sostanze ad attività antibiotica, questi due isolati agiscono sinergicamente e possono essere impiegati nella lotta preventiva a diversi funghi patogeni di origine tellurica quali *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium rolfii*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. su numerose specie ornamentali, floricole e orticole.

Passando a principi attivi di origine batterica, di particolare interesse, soprattutto perché impiegato ormai da lungo tempo, è *Bacillus subtilis*, un batterio gram-positivo comunemente presente nel suolo, particolarmente abbondante nella rizosfera delle piante. L'azione antagonistica si esplica, oltre che attraverso la competizione per le fonti nutritive e per lo spazio, anche mediante produzione di eso-enzimi e di sostanze di natura antibiotica, quali surfattina, bacilisina, subtilina e iturina. Il microrganismo è attivo nei confronti di numerosi patogeni sia fungini, tra cui *Botrytis cinerea* e *Venturia inaequalis*, che batterici come *Erwinia amylovora*. Poiché è noto che i batteri fitopatogeni sono di difficile contenimento in quanto solo gli antibiotici, il cui utilizzo non è consentito, sembrano dare risultati soddisfacenti, questo prodotto rappresenta un valido strumento nella lotta a batteri fitopatogeni di grande pericolosità come, ad esempio, l'agente causale del colpo di fuoco.

Un altro batterio molto interessante come principio attivo di un prodotto distribuito in Italia è *Streptomyces griseoviridis*. Questo microrganismo ha la capacità di colonizzare l'apparato radicale delle piante ospiti manifestando un'azione preventiva contro i patogeni tellurici. Il batterio svolge la sua attività antagonistica attraverso meccanismi di competizione per il territorio e mediante fenomeni di iperparassitismo. Il prodotto contenente *S. griseoviridis* è utilizzato anche come biofertilizzante poiché, durante il processo di colonizzazione della rizosfera, rilascia metaboliti promotori della crescita favorendo lo sviluppo dell'apparato radicale della pianta ospite. I fitopatogeni bersaglio sono stati individuati in *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Verticillium dahliae*, *Pyrenochaeta lycopersici* e *Phytophthora capsici*.

Da un punto di vista tecnico, il limite più grave dei biofitofarmaci è la loro affidabilità. Il principio attivo di questi farmaci è un organismo vivente, e in



quanto tale ha ben specifiche esigenze in termini di umidità e temperatura e la componente ultravioletta della luce ne riduce, in tempi brevi, la vitalità. Ha, inoltre, una shelf life limitata e fortemente dipendente dalle condizioni di conservazione. Per poter manifestare le proprie capacità, deve essere messo in grado di svilupparsi, e quindi si trova anche a competere con gli altri organismi che occupano la stessa nicchia. Tutto ciò comporta una certa erraticità negli effetti sortiti, spesso anche come conseguenza della scarsa attenzione con cui sono impiegati questi prodotti, scarsa attenzione derivata dall'utilizzo di questi mezzi biotecnici con schemi mentali adattati all'uso di sostanze chimiche. Anche i diversi tipi di patogeno, e di malattie, non sono parimenti suscettibili all'attività dei biofitofarmaci; patogeni la cui fase esterna all'ospite è relativamente breve e limitata alla produzione delle strutture di evasione, come peronosspore o ruggini, difficilmente saranno limitati nello sviluppo o nella riproduzione da microrganismi antagonisti, a meno che questi non agiscano come induttori di resistenza. Anche patogeni che causano sintomi sulle parti vendibili e non soggette a trasformazione (ad es. frutti o verdura) sono bersagli particolarmente difficili da combattere in quanto il danno non è direttamente proporzionale all'incidenza della malattia ma, piuttosto, alla sua diffusione. Ridurre il numero di lesioni su una singola mela non porta benefici, in quanto anche una singola lesione deprezza sensibilmente il frutto.

Le aspettative generate dall'impiego di questa categoria di agrofarmaci sono tuttavia molto ampie, per questo motivo a livello europeo sono in corso iniziative che tendono alla semplificazione delle procedure e alla riduzione dei costi della registrazione, che al momento rappresentano il maggiore ostacolo alla loro diffusione (cfr. <http://www.rebeca-net.de/>).

#### BIOFUMIGANTI

Il controllo di alcuni patogeni del terreno (funghi, nematodi) attraverso sistemi alternativi a basso impatto ambientale ha assunto, in questi ultimi tempi, una grande importanza, non solo in agricoltura biologica, ma anche in quella convenzionale in seguito all'interruzione dell'uso del Bromuro di Metile per la sterilizzazione dei terreni agrari a partire dal 2005.

È noto, infatti, che nel mondo vegetale sono presenti vari sistemi naturali di difesa che in alcuni casi rappresentano dei veri sistemi chimici in grado di produrre composti a elevata attività biologica. Fra questi, il sistema glucosinolati-mirosinasi (Bones e Rossiter, 1996; Rask et al., 2000), tipico della famiglia delle *Brassicaceae*, delle *Capparidaceae* e di altre 10 famiglie

minori delle Dicotiledoni, ha mostrato fin dai primi anni del secolo alcune interessanti caratteristiche biologiche. I glucosinolati sono una classe di circa 120 diversi glicosidi caratterizzati da un gruppo funzionale comune e da una catena laterale che può essere di natura alifatica, aromatica o eteroaromatica. Tali composti, in presenza di acqua e dell'enzima endogeno mirosinasi, sono rapidamente idrolizzati con formazione di b-D-glucosio, ione idrogeno-solfato e una serie di prodotti di idrolisi che, in funzione delle condizioni in cui avviene la reazione, possono essere isotiocianati, nitrili o tiocianati. Enzima (mirosinasi) e substrato (glucosinolati), nella cellula sana, sono compartimentalizzati in zone diverse e solo dove si verificano lesioni cellulari causate da fattori abiotici e/o biotici, entrano in contatto con produzione, *in situ*, dei corrispondenti prodotti di idrolisi che svolgono un'azione di prevenzione e/o di controllo, e comunque di difesa, da alcuni agenti patogeni. I prodotti di idrolisi sono composti solforati caratterizzati da una discreta volatilità e da un'elevata attività biologica nei confronti di batteri, funghi, nematodi, insetti e come inibitori di germinazione (Brown e Morra, 1997; Rosa e Rodrigues, 1999). L'elevata volatilità, se da un lato fa sì che tali molecole siano poco persistenti nel terreno, dall'altro consente loro un'estrema mobilità, e quindi la possibilità di raggiungere agevolmente l'organismo bersaglio. Queste caratteristiche suggeriscono alcune interessanti prospettive applicative per il loro impiego come molecole naturali ad azione fumigante (biofumigazione).

Il termine biofumigazione è stato coniato per meglio definire il controllo di organismi patogeni di origine tellurica da parte degli isotiocianati che sono liberati dall'idrolisi dei glucosinolati contenuti in molte *Brassicaceae* (Kirkegaard e Matthiessen, 2004). Le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti d'idrolisi, la loro attività biologica e la presenza di buone quantità di glucosinolati e mirosinasi in tutti gli organi delle *Brassicaceae*, hanno suggerito la possibilità di indurre la produzione nel terreno di tali composti attraverso la coltivazione e il sovescio di piante caratterizzate da un elevato contenuto in glucosinolati a elevata attività biocida per il controllo di *Sclerotinia* spp., *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., nematodi, elateridi e perfino erbe infestanti.

Dal 2004, inoltre, è disponibile anche una nuova tecnologia di biofumigazione attraverso l'uso di formulati secchi pellettizzati in cui i glucosinolati si trovano in concentrazioni anche 10 volte superiori a quelle normalmente presenti nelle parti verdi delle piante (Lazzeri et al., 2004).

Fra le *Brassicaceae*, le piante più utilizzate sono diverse specie di *Brassica* (*B. oleracea*, *B. napus*, *B. campestris*, *B. kaber*, *B. alba*, *B. nigra*, *B. juncea*), *Raphanus sativus* e *Eruca sativa*. *Brassica juncea*, tuttavia, è quella più utilizzata

e negli ultimi anni un intenso lavoro di miglioramento genetico ha portato alla selezione di piante con un elevato contenuto in glucosinolati e dotate di un'ottima rusticità e adattabilità alle diverse condizioni di coltivazione (Lazzeri, 2004; Gies, 2004).

Tali molecole di origine vegetale possono essere considerate eco-sostenibili, poiché esse sono completamente rinnovabili, biodegradabili, non presentano alcun impatto negativo sul bilancio globale di CO<sub>2</sub> e inoltre sono classificate come ipotossiche nei confronti dell'uomo.

Numerosi sono gli studi che hanno messo in evidenza l'attività biofumigante di diverse *Brassicaceae* nei confronti di diversi patogeni tellurici (Matthiessen e Kirkegaard, 2006). In Italia essa è stata applicata su fragola, patata, lattuga, riso, carota, pomodoro e vite. Negli Stati Uniti è stato stimato che nel 2004 oltre 15.000 ettari sono stati trattati con biofumiganti e sono note anche prime esperienze dell'applicazione di tale tecnica in altri paesi d'Europa (Olanda, Inghilterra, Francia, Finlandia, Svezia, Danimarca), in Africa (Marocco, Kenia) in Giappone e in Israele.

Tuttavia, se in alcuni esperimenti l'attività di difesa è risultata soddisfacente, in altri essa è risultata scarsa o piuttosto variabile anche con lo stesso patogeno. In molti casi le scarse informazioni sugli approcci usati nel valutare il ruolo degli isotiocianati sui risultati ottenuti hanno evidenziato la necessità di approfondire alcuni aspetti chiave della tecnica al fine di una sua migliore utilizzazione per la difesa delle colture. Alcuni gruppi di ricerca in Australia, Italia e Stati Uniti hanno quindi adottato un approccio sistematico al problema indagando, ad esempio, il profilo dei glucosinolati nelle diverse *Brassicaceae*, gli effetti di tali composti sulla crescita della pianta e sull'ambiente, l'attività biologica dei vari isotiocianati. Tali studi hanno consentito di ottimizzare le potenzialità biofumiganti delle varie *Brassicaceae* integrando tale approccio anche con altre strategie quali la solarizzazione o l'uso di biofitofarmaci (Kirkegaard e Matthiessen, 2004).

Il livello di controllo della malattia può essere migliorato selezionando le varietà di *Brassica* con un elevato contenuto di isotiocianati che risultino particolarmente attivi nei confronti di specifici patogeni e che siano maggiormente persistenti nel terreno. Inoltre, l'affinamento di alcune pratiche agronomiche quali la polverizzazione del materiale vegetale, la bagnatura e/o l'interramento del materiale al fine di aumentare il rilascio degli isotiocianati riducendone la perdita, o anche la definizione dei quantitativi ottimali da utilizzare per unità di volume di terreno, possono contribuire a migliorare le "rese fitoiatriche" di tale strategia.

Il grande interesse suscitato dalla biofumigazione risiede essenzialmente nel

fatto che essa è considerata una tecnica eco-compatibile e a basso impatto ambientale. Per tale motivo recentemente sono stati condotti studi per valutare eventuali effetti indesiderati dei glucosinolati e degli isotiocianati nei confronti sia della micoflora del terreno residente o introdotta che degli organismi non-target (Gimsing e Kirkegaard, 2006). Recenti studi hanno evidenziato una minore sensibilità di alcune specie di *Trichoderma* ai volatili tossici rilasciati da semi sfarinati di *Brassica carinata*, rispetto ad alcuni patogeni tellurici, resta tuttavia ancora da chiarire se gli agenti di biocontrollo possono essere utilmente impiegati assieme al trattamento biofumigante per un controllo integrato delle malattie (Dandurand et al., 2000; Galletti et al., 2008).

Ricerche per lo sviluppo della tecnica di biofumigazione sono indirizzate allo studio dei geni coinvolti nella biosintesi dei glucosinolati che potranno consentire in futuro di costituire piante ingegnerizzate con un livello di tali composti più elevato rispetto a quello ottenibile mediante il miglioramento genetico classico (Halkier e Du, 1997; Mithen, 2001).

#### ESTRATTI E ALTRE SOSTANZE NATURALI

Appare sempre più evidente che prodotti di origine vegetale hanno enormi potenzialità di applicazione nella moderna agricoltura. Le piante, infatti, possono fornire un'alternativa ai prodotti di sintesi attualmente utilizzati nel controllo dei funghi fitopatogeni, poiché costituiscono una fonte molto ricca di molecole chimiche bioattive quali alcaloidi, tannini, chinoni, cumarine, composti fenolici e fitoalessine (Kim et al., 2003; 2005; Daoubi et al., 2005; Kagale et al., 2005). Inoltre, estratti vegetali e oli essenziali sono facilmente reperibili in natura, risultano attivi nei confronti di un certo numero di specie bersaglio, sono biodegradabili, non tossici e/o fitotossici e impiegabili in programmi di lotta integrata. Alla luce di tutto questo è facile, quindi, intuire le potenzialità di sviluppo di questa nuova e più sicura classe di agenti per la difesa delle piante. Negli ultimi anni numerosi lavori sono stati incentrati sulla possibilità di impiego di estratti e oli vegetali nella lotta a diversi fitopatogeni fungini, sia *in vitro*, attraverso la valutazione dell'inibizione della crescita miceliare e della germinazione delle spore, che *in vivo*, attraverso esperimenti in serra e in campo volti al contenimento delle malattie. Solo per citare alcuni esempi, estratti di foglie di *Eucalyptus citriodora* e di *Ageratum conyzoides* sono risultati molto efficaci, *in vitro*, nell'inibire la crescita miceliare e la germinazione delle spore di *Didymella bryoniae* (Fiori et al., 2000). Estratti di fiori, fusto e foglie di diverse piante tra cui *Euphorbia macroclada*, sono risultati

essere efficaci nei confronti di *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium italicum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. *in vitro* (Al-Mughrabi, 2003) mentre estratti vegetali di *Allium* e *Capsicum* selezionati dopo uno screening di estratti vegetali provenienti da 345 piante, così come gli oli essenziali ricavati da *Cymbopogon martini* e *Thymus zygis* selezionati su 49 oli essenziali di differenti origini, hanno mostrato la migliore attività antifungina inibendo la germinazione delle spore di *Botrytis cinerea* in piastre multi pozzetto (Wilson et al., 1997).

Nel 2005, Stephan et al. hanno valutato l'effetto di diversi estratti vegetali per il controllo di *Phytophthora infestans* su patate: estratti di *Rheum rhubarbarum* e *Solidago canadensis* si sono dimostrati in grado di ridurre lo sviluppo dei sintomi dovuti alla presenza del patogeno su piante allevate in serra. Per quanto riguarda i meccanismi d'azione coinvolti nell'attività di contenimento della malattia, nel caso di *R. rhubarbarum* è stata ipotizzata un'attività fungicida, mentre per *S. canadensis* è stato ipotizzato il coinvolgimento del meccanismo di induzione di resistenza nella pianta ospite.

Nel 2007, un estratto di *Astragalus canadensis* ha fornito interessanti risultati nella lotta in campo a *Verticillium dahliae* su patate sia attraverso un'azione fungicida che mediante induzione di resistenza (Uppal et al., 2007). Infine, in un lavoro recentemente pubblicato da Sankarasubramanian et al. (2008), estratti di foglie di *Nerium oleander* e *Pithecolobium dulce* ed estratti di neem sono stati testati contro *Bipolaris oryza* in serra laddove l'estratto di neem è risultato essere in grado di ridurre significativamente l'incidenza della malattia su piante di riso.

In aggiunta agli oli essenziali e agli estratti vegetali, alcuni prodotti di origine naturale sono utilizzati nella lotta biologica ai patogeni delle piante e, in taluni casi, hanno dato risultati promettenti. Tra questi possiamo ricordare il latte e il siero del latte nella difesa contro alcuni funghi fitopatogeni tra cui *Phytophthora infestans* su patata (Jordan et al., 1992) e *Sphaerotheca fuliginea* su zuccina, e tali attività sembrano esplicitarsi attraverso un'azione fungicida diretta o l'induzione di resistenza nella pianta ospite (Bettiol, 1999), o *Erysiphe* (*Uncinula*) *necator* su vite (Crisp et al., 2006). Esistono numerose spiegazioni riguardanti l'azione antifungina del latte che includono l'attività esercitata da parte degli acidi grassi in esso contenuti, la produzione di radicali liberi a seguito di esposizione ai raggi UV, che possono interferire con il funzionamento della membrana cellulare del fungo, o l'alterazione del bilancio osmotico, dovuto alla presenza di sali e altre sostanze. Alcuni componenti del latte come la lattoferrina, già utilizzati come agenti antimicrobici in medicina umana e per la conservazione degli alimenti, si è ipotizzato essere

coinvolti nell'alterazione del bilancio osmotico di *E. necator* e, quindi, nella rottura dei conidi a seguito di un aumento della pressione interna (Crisp et al., 2006).

Tra i composti alternativi impiegati nella lotta ai patogeni meritano, infine, un accenno i fosfonati, esteri dell'acido fosfonico, conosciuti per la loro capacità di ridurre l'incidenza di *Phytophthora* sp. su patate in serra e in pieno campo (Cook e Little, 2001), *Pythium* sp. su cetriolo, sia in ambiente controllato che in campo mediante trattamento del terreno e del seme (Abbasi e Lazarovitis, 2005; 2006a) o *Plasmodiophora brassicae* su cavolo (Abbasi e Lazarovitis, 2006b). I fosfonati sono rapidamente assorbiti e traslocati all'interno della pianta sia nel floema che nello xilema. Possono persistere nei tessuti vegetali anche per lunghi periodi e agiscono con un complesso meccanismo d'azione che va dalla tossicità diretta nei confronti del patogeno all'azione indiretta attraverso l'attivazione delle risposte di difesa della pianta.

## INDUTTORI DI RESISTENZA

### *Induttori di origine biotica*

Diverse sostanze di origine biotica mostrano attività come elicitatori delle reazioni di difesa delle piante, come nel caso dell'olio di neem, di estratti di alghe come la laminarina e oli essenziali quali geraniolo o mentolo. Alcuni di questi prodotti sono tradizionalmente utilizzati in alcuni Paesi, soprattutto asiatici, come accade per l'olio di neem, mentre altri sono utilizzati da meno tempo come la laminarina, di recente immessa nel mercato europeo.

#### Laminarina

La 1,3-glucan-laminarina derivante dall'alga bruna *Laminaria digitata* è nota da alcuni anni per la sua capacità di elicitare una varietà di reazioni di difesa in diverse specie vegetali quali ad esempio il tabacco (Klarzynski et al., 2000), tra le reazioni di difesa indotte dalla laminarina si può ricordare l'accumulo di PR proteins ad attività antimicrobica (Fritig et al., 1998). In un lavoro del 2003 condotto da Aziz et al. questo composto si è dimostrato essere un efficiente elicitore delle risposte di difesa in cellule e piante di vite e ha ridotto lo sviluppo di *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* in piante infette. Nel 2008 Trouvelot et al. hanno osservato induzione di resistenza in *V. vinifera* cv. *Marselan* nei confronti di *P. viticola* in serra da parte della laminarina sulfatata (PS3).

### Chitosano

Un altro composto di origine naturale, il chitosano o chitina deacetilata ottenuta dal guscio di crostacei, è noto per la sua attività antifungina. La sua capacità di inibire la crescita dei funghi è stata documentata sia attraverso studi *in vitro* che *in vivo* ed è noto che questa attività è direttamente correlata alla concentrazione di chitosano. Si ritiene che la natura policationica di questo composto sia la chiave delle proprietà antifungine e che la lunghezza della catena del polimero aumenti tale attività (Hirano e Nagao, 1989). Una spiegazione aggiuntiva risiede nella capacità di questo composto di inibire la produzione di alcuni enzimi fungini (El Gauth et al., 1992) o di indurre cambiamenti morfologici e strutturali all'interno della cellula fungina (Benhamou, 1996; El Ghaouth *et al.*, 1999; Ait Barka *et al.*, 2004). Oltre ad agire direttamente sui funghi patogeni, le possibilità di impiego del chitosano in lotta biologica sono dovute alla capacità di questo composto di indurre risposte di difesa nelle piante trattate come, ad esempio, nei confronti di *F. oxysporum* in piante suscettibili di pomodoro (Benhamou et al., 1998, Bautista Baños et al., 2006).

Nel 2008 questo composto è stato testato direttamente nei confronti di *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* e su tabacco come induttore di resistenza. I risultati ottenuti hanno mostrato che l'azione di inibizione del patogeno e di protezione della pianta dipende dal grado di acetilazione e di degradazione del composto (Falcon et al., 2008.)

### Lipopolisaccaridi

Alcuni composti di origine batterica come i lipopolisaccaridi e le arpine si sono dimostrati in grado di indurre resistenza sistemica acquisita (SAR) in piante. I lipopolisaccaridi (LPS), componenti fondamentali della superficie cellulare dei batteri Gram-negativi, oltre a svolgere diversi ruoli nel processo patogenetico di alcuni batteri fitopatogeni, possono essere riconosciuti dalla pianta come induttori delle risposte di difesa. Ad esempio, LPS estratti da un isolato endofita di *Burkholderia cepacia* hanno mostrato un'azione protettiva su tabacco nei confronti di *Phytophthora nicotianae*, grazie alla biosintesi di PR-proteins (Coventry e Dubery, 2001; Gerber *et al.*, 2004).

### Arpine

Le arpine, proteine acide ricche in glicina, sensibili alle proteasi, termostabili, prodotte da batteri fitopatogeni Gram-negativi sono in grado, quando applicate alle piante, di promuoverne la crescita e indurre resistenza a patogeni e insetti (Dong et al., 1999; Kim e Beer, 2000; Wei e Beer, 1996). Studi

condotti su *Arabidopsis* e tabacco le cui foglie erano state trattate con arpine hanno mostrato reazioni ipersensibili, sintesi di PR proteins e sviluppo di resistenza (Peng et al., 2003). L'espressione di un gene codificante per un'arpina (hfr1) derivato da *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* è in grado di conferire resistenza non specifica in riso nei confronti di *Magnaporthe grisea* (Min et al., 2008).

#### Acido arachidonico

Tra i composti di natura biotica, anche l'acido arachidonico (AA) ha mostrato un'attività come elicitore delle reazioni di difesa in piante di patate in cui si è dimostrato in grado di indurre fattori di resistenza localizzata come necrosi e sintesi di fitolaessine. L'acido arachidonico è, anche, in grado di indurre resistenza sistemica a lungo termine in piante di patate e pomodoro contro funghi fitopatogeni e nematodi (Zinov'eva et al., 1997). Il trattamento di foglie di patata con AA ha permesso di indurre SAR nei confronti di *P. infestans* o *Alternaria solani* (Cohen et al., 1991; Coquoz et al., 1995). L'applicazione di AA può portare, inoltre, a un accumulo di Acido Salicilico che rimane limitato alle parti trattate (Coquoz et al., 1995).

#### Acido jasmonico

L'acido jasmonico (JA) e i suoi esteri metilati (Me-JA) sono comuni regolatori di diverse funzioni fisiologiche delle piante (Hamberg e Gardner, 1992; Semblender e Parthier, 1993). Gli jasmonati sono i prodotti dell'ossidazione enzimatica dell'acido linoleico. La reazione è catalizzata, nelle piante superiori, dalle lipossigenasi (Vick e Zimmerman, 1987). Studi condotti sul ruolo fisiologico, sui meccanismi d'azione, sulla biosintesi e sulle trasformazioni metaboliche degli jasmonati hanno mostrato che l'acido jasmonico e i suoi esteri metilati sono componenti delle reazioni biochimiche associate alla resistenza e sono in grado di indurre la biosintesi di specifiche proteine e di polipeptidi che forniscono protezione alle piante contro stress e fattori patogenici. Gli jasmonati sono risultati efficaci nell'indurre resistenza a *Verticillium dahliae* su cotone e in *Arabidopsis* verso diversi patogeni tra cui *Botrytis cinerea* (Howe e Schilmiller, 2002; Weber, 2002; Farmer et al., 2003; Thomma et al., 2001, Pená-Cortés, et al., 2005) e su patata verso *Phytophthora infestans* (Irinskaya, et al., 2000).

#### Oligogalatturonidi

Alcuni enzimi di origine fungina, le endopoligalatturonasi, hanno mostrato la capacità di attivare le risposte di difesa in diverse piante di interesse agrario.



Queste reazioni includono la produzione di specie attive dell'ossigeno, l'attivazione di proteine chinasi, l'accumulo di prodotti di trascrizione di geni per la difesa e la produzione di fitoalessine.

La maggior parte di queste reazioni di difesa è attivata in risposta a oligogalatturonidi (OGA), prodotti di degradazione dei poligalatturonati in conseguenza dell'attività delle endopoligalatturonasi, con un grado di polimerizzazione da 9 a 20 (De Lorenzo et al., 1994). Questi OGA attivi corrispondono a una parte dei prodotti rilasciati dall'attività delle endopoligalatturonasi sulla parete cellulare. Alcuni patogeni come *Botrytis cinerea* sono capaci di degradare la parete cellulare vegetale mediante produzione e rilascio di endopoligalatturonasi (Staples e Mayer 1995) e attivare gli elicitori delle risposte di difesa (Derckel et al. 1999; Poinsett et al., 2003). Recentemente, oligogalatturonidi si sono dimostrati in grado di indurre resistenza a *Botrytis cinerea* in piante di *Arabidopsis*, indipendentemente da segnali mediati da acido jasmonico, acido salicilico ed etilene (Ferrari et al., 2007).

### Acido salicilico

Composti di natura fenolica, come molti derivati dell'acido benzoico, si accumulano nelle piante durante la fase di infezione. Questi composti si originano grazie all'attivazione di un enzima chiave, la fenilalanina- ammonio liasi (PAL) che porta alla formazione di derivati a partire dalla fenilalanina. Tra i derivati dell'acido benzoico, l'acido salicilico (SA) svolge un ruolo fondamentale nella resistenza delle piante, in modo particolare durante la resistenza sistemica acquisita (SAR). È stato dimostrato che i livelli di SA aumentano molto in piante di tabacco e cetriolo dopo l'infezione da parte di patogeni (Malamy et al., 1990; Rasmussen et al., 1991) e questo incremento è correlato con la SAR (Metraux et al., 1990). Inoltre, piante transgeniche di tabacco e di *Arabidopsis* non capaci di accumulare SA, non sono in grado di sviluppare SAR e mostrano un'aumentata suscettibilità all'infezione. Sebbene non sia stata dimostrata una diretta attività antifungina del SA (Okuno et al., 1991), in alcuni lavori è stato osservato un alterato sviluppo fungino in presenza di SA. L'acido salicilico influenza la vitalità delle spore di *Saccharomyces cerevisiae* (Romano e Suzzi, 1985), riduce la germinazione dei conidi e lo sviluppo delle ife di *Sphaerotheca fuliginea* (Conti et al., 1996) e inibisce la differenziazione e la crescita in *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia minor* (Georgiou et al., 2000). Nel 2004, su *Platanus x acerifolia* è stata valutata la capacità del SA di indurre resistenza alla *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. Pretrattamenti con il composto hanno determinato una riduzione della gravità della malattia e della crescita del fungo (Pilotti et al., 2004).

*Induttori di origine abiotica*

## Acido 2,6 dicloroisonicotinico,

Sulla base dell'ormai noto sistema di induzione di resistenza descritto da Kuc nel 1982, alcuni composti di origine abiotica sono stati studiati e utilizzati per la loro capacità di indurre un effetto SAR nelle piante. Oltre ai fosfati, già impiegati in agricoltura biologica e attivi nei confronti dell'antracnosi e dell'oidio del cetriolo e della peronospora della lattuga o l'acido acetilsalicilico (purtroppo non utilizzabile a causa della sua elevata fitotossicità), possiamo ricordare l'acido 2,6 dicloroisonicotinico (INA). L'INA è in grado di indurre lo stesso spettro di resistenza e gli stessi cambiamenti biochimici già descritti per l'induzione della SAR da parte di agenti biotici sia su cetriolo che su tabacco (Metraux et al., 1991; Kessmann et al., 1994; Oostendorp et al., 2001), ha un'attività pienamente sistemica e non richiede SA per l'attivazione della risposta SAR (Metraux et al., 1991).

## Acido B-aminobutirrico,

Un altro composto di natura chimica, l'acido B-aminobutirrico (BABA), un aminoacido non proteico, si è dimostrato in grado di agire come induttore abiotico di resistenza in numerose specie vegetali, sebbene non sia mai stato dimostrato un effetto antimicrobico diretto *in vitro*. Il BABA è stato descritto come capace di attivare le risposte di difesa nella pianta, coinvolgendo anche le PR-proteins. L'azione è stata documentata su piante di pomodoro e patata verso *Phytophthora infestans* (Cohen et al., 1991; Cohen, 1994a; Cohen e Gisi, 1994; Cohen et al., 1994), di tabacco verso *Peronospora tabacina* (Cohen, 1994b), di peperone verso *Phytophthora capsici* (Lee et al., 2000), di lattuga e cavolfiore verso l'oidio (Pajot et al., 2001; Silue et al., 2002) e di vite verso *Plasmopara viticola* (Hamiduzzaman et al., 2005). È stato ipotizzato che il BABA possa deteriorare le cellule della pianta ospite penetrate dal patogeno, bloccando, in tal modo, la traslocazione dei nutrienti negli austeri (Steiner e Schönbeck, 1997). Il BABA si è visto, inoltre, interferire con la deposizione di callosio, importante meccanismo di difesa contro patogeni fungini come *Hyaloperonospora parasitica* (Flors et al., 2006).

## Acibenzolar-s-metyl,

Sempre nell'ambito della possibilità di impiego di prodotti di origine abiotica per l'induzione della resistenza nelle piante verso patogeni vegetali, sono a disposizione alcuni lavori che valutano la possibilità di utilizzo di un altro composto, l'acibenzolar-s-methyl (ASM) su specie di interesse agrario. Dann

et al. (1998) hanno osservato una riduzione nella severità della muffa bianca dovuta all'attacco di *Sclerotinia sclerotiorum* su soia così come Meyer et al. (2006) sempre su soia ma verso *Rhizoctonia solani*. L'induzione di resistenza a seguito dell'applicazione dell'ASM sulle piante ospiti è possibile mediante la promozione dell'espressione di geni che codificano la sintesi di PR-proteins (Yamaguchi, 1998; Hammerschmidt e Smith-Becker, 2000; Venâncio et al., 1999). Nel 2007 l'ASM è stato testato, in campo, su diverse cultivars di pomodoro in cui si è dimostrato capace di indurre resistenza (Herman et al., 2007).

### Benzotiadiazolo

Infine l'acido benzo-(1,2,3)-tiadiazolo-7-carboico-*S*-metil estere (BTH), un composto chimico di sintesi di tipo benzotiadiazolo, è stato applicato come spray fogliare su pomodoro e valutato per la sua potenziale capacità di conferire un aumento nella resistenza a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Nelle piante non trattate il patogeno è in grado di colonizzare abbondantemente i tessuti vascolari, laddove nelle piante trattate con BTH si può osservare una riduzione dell'estensione della colonizzazione. In particolare, la crescita del patogeno appare ridotta e l'ingresso nei tessuti vascolari è alterato dalla formazione di parete arricchita di callosio che si oppone all'ingresso del patogeno (Benhamou e Bélanger, 1998). Nel 2002 gli stessi autori hanno applicato il BTH su foglie di cetriolo dove il composto si è dimostrato in grado di indurre resistenza verso *Pythium ultimum*, in modo particolare in piante suscettibili che reagiscono molto rapidamente mediante accumulo di composti fenolici in corrispondenza dei siti di penetrazione. Il prodotto commerciale Bion<sup>®</sup>, il cui principio attivo è il BTH, è stato anche saggiato su grano per valutare la capacità di indurre resistenza a *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Il prodotto ha favorito l'accumulo di fenilalanina ammonio-lisi (PAL) correlata con un accumulo di sostanze fenoliche che concorrono a bloccare lo sviluppo del patogeno nella pianta (Stadnik e Buchenauer, 2001). Trattamenti in campo con BTH su vite possono indurre meccanismi di resistenza nei confronti di *Botrytis cinerea* (Iriti et al., 2005) e, aspetto molto interessante, aumentarne il contenuto nutraceutico (Fumagalli et al., 2006).

I meccanismi di base attraverso cui le piante reagiscono dopo l'elicitazione dei meccanismi di difesa da parte dei prodotti naturali sono gli stessi attivati da parte di alcuni microrganismi, sia patogeni che antagonisti, questi ultimi impiegati come agenti di lotta biologica. L'efficacia di questi prodotti naturali dipende dagli stessi fattori e dalle medesime condizioni che regolano l'effica-

cia degli antagonisti che utilizzano l'induzione di resistenza come meccanismo d'azione: specie e cultivar delle piante ospiti, stadio fisiologico della pianta, pressione dell'inoculo del patogeno e condizioni climatiche, solo per citarne alcuni. Si deve, comunque, osservare che anche l'impiego di induttori di resistenza offre, spesso, risultati erratici. D'altra parte le piante, in natura, sono di continuo "sfidate" da organismi diversi ed entrano continuamente in contatto con sostanze di origine biotica o abiotica, in altre parole molti dei meccanismi che sono indotti dall'applicazione di induttori di resistenza possono essere già attivati, e questo introduce un rumore di fondo che confonde gli effetti che si vogliono ottenere e valutare mediante l'impiego deliberato di induttori.

La qualità che rende particolarmente appetibili questi prodotti naturali è che, in alcuni Paesi, non sono considerati prodotti per la protezione delle piante bensì "rafforzatori" delle piante, sfuggendo in tal modo alle regolamentazioni da applicare ai prodotti impiegabili per la protezione delle colture. Secondo le Regolamentazioni Europee, se si intendesse utilizzare questi prodotti nella protezione delle piante, si dovrebbero considerare prodotti per la difesa e sarebbe necessario soddisfare le stesse procedure di registrazione previste per i prodotti a base di molecole di sintesi (Direttiva 91/414). Un problema a parte si genera per estratti vegetali costituiti da un'associazione di numerose molecole differenti come nel caso degli estratti di neem in cui possono essere presenti fino a 50 molecole differenti. L'azadiractina, che è uno dei maggiori costituenti, è stato prolungatamente studiato e potrebbe essere impiegato da solo. Tuttavia gli operatori che seguono programmi di agricoltura biologica hanno la tendenza a preferire l'utilizzo degli estratti naturali da pianta la cui composizione varia in funzione dell'origine della pianta stessa e del processo di estrazione (Alabouvette et al., 2006).

Questa breve rassegna dei mezzi tecnici innovativi disponibili, già oggi o in un prossimo futuro, per la protezione delle colture, mostra come la scelta che deve operare chi si occupa di difesa da funghi patogeni è, oggi, molto più complessa di quanto non fosse ancora pochi anni fa, per la diversificazione in atto nella tipologia degli strumenti dovuta sia all'accresciuta sensibilità ambientalista degli operatori, ma anche per oggettivi limiti imposti dalle normative vigenti.

L'innovazione, tuttavia, non può limitarsi agli strumenti diretti di difesa, ma deve coinvolgere anche altri importanti settori quali la diagnostica fitopatologica, la messa a punto di sistemi più precisi di applicazione dei fitofarmaci, la definizione di modelli previsionali e di sistemi di supporto alle decisioni.

La difesa di una coltura non è più delegabile all'impiego di un particolare prodotto, ma deve essere la conseguenza di scelte oculate di gestione della coltura stessa, in tutti i suoi aspetti.

# RIASSUNTO

La scelta che deve operare chi si occupa di difesa da funghi patogeni è, oggi, molto più complessa di quanto non fosse ancora pochi anni fa, per la diversificazione in atto nella tipologia degli strumenti dovuta sia all'accresciuta sensibilità ambientalista degli operatori, ma anche per oggettivi limiti imposti dalle normative vigenti.

Nel lavoro sono passati brevemente in rassegna strumenti tecnici per la difesa delle colture già disponibili per l'agricoltore, senza per questo pretendere che sia una rassegna esaustiva, e strumenti, quali gli OGM, la cui disponibilità non sarà immediata ma la cui importanza non può essere sottaciuta. L'inclusione di questo o quel prodotto o tecnica, non implica automaticamente un giudizio acriticamente positivo; in diversi casi le ricerche e la sperimentazione in campo hanno fornito risultati contrastanti, e, quindi, per alcuni prodotti o tecniche ricordati saranno necessari approfondimenti e aggiustamenti, prima di poterli considerare come pienamente affidabili. Oltre agli OGM, vengono trattati gli agrofarmaci i cui principi attivi sono costituiti da microrganismi viventi, i biofumiganti, gli estratti e altre sostanze naturali e gli induttori di resistenza di origine biotica o abiotica.

# ABSTRACT

Crop protection today can rely on a very different array of tools as a consequence of both a different perception of the environmental impact of pesticides by farmers and agroindustries, and restraints posed by laws. This short review discusses some of the tools available, or that will be available in the near future such as the GMO. The inclusion of some of them does not imply their uncritical endorsement as the analysis of available literature reveals contrasting results, so they will require further in depth studies to become fully reliable. This concise survey includes GMO, biopesticides, biofumigants, natural substances, including plant extracts, and plant resistance inducers, both of biotic and abiotic origin.

# BIBLIOGRAFIA

- ABBASI P.A., LAZAROVITIS G. (2005): *Effects of AG3 phosphonate formulations on incidence and severity of Pythium damping-off of cucumber seedlings under growth room, microplot and field conditions*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 27, pp. 420-429.
- ABBASI P.A., LAZAROVITIS G. (2006a): *Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses Pythium damping-off of cucumber seedlings*, «Plant Disease», 90, pp. 459-464.

- ABBASI P.A., LAZAROVITIS G. (2006b): *Effect of soil application of AG3 phosphonate on the severity of clubrot of bok choy and cabbage caused by Plasmodiophora brassicae*, «Plant Disease», 90, pp. 1517-1522.
- AIT BARKA E., EULLAFFROY P., CLÉMENT C., VERNET G. (2004): *Chitosan improves development, and protects Vitis vinifera L. against Botrytis cinerea*, «Plant Cell Reports», 22, pp. 608-614.
- ALABOUVETTE C., OLIVAIN C., STEINBERG C. (2006): *Biological control of plant disease: the European situation*, «European Journal of Plant Pathology», 114, pp. 329-341.
- AL-MUGHRABI, K.I. (2003): *Antimicrobial activity of extracts from leaf, stem and flowers of Euphorbia macroclada against pathogenic fungi*, «Phytopathologia Mediterranea», 42, pp. 245-250.
- AZIZ A., POINSSOT B., DAIRE X., ADRIAN M., BÉZIER A., LAMBERT B., JOUBERT J., PUGIN A. (2003): *Laminarin elicits defence responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16 (12) pp. 1118-1128.
- BAUTISTA-BAÑOS S., HERNANDEZ-LAUZARDO A.N., VELAZQUEZ-DEL VALLE M.G., HERNANDEZ-LOPEZ M., AIT BARKA E., 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.
- BELFANTI E., SILFVERBERG-DILWORTH E., TARTARINI S., PATOCCHI A., BARBIERI M., ZHU J., VINATZER B.A., GIANFRANCESCHI L., GESSLER C., SANSAVINI S. (2004): *The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety*, «Proceedings of National Academic of Sciences», 101, pp. 886-890.
- BENHAMOU N. (1996): *Elicitor-induced plant defence pathways*, «Trends in Plant Science», 1, pp. 233-240.
- BENHAMOU N., BÉLANGER R.R. (1998): *Benzothiadiazole-mediated induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in tomato*, «Plant Physiology», 118(4), pp. 1203-1212.
- BENHAMOU N., BÉLANGER R.R. (2002): *Induction of systemic resistance to Pythium damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response*, «Plant Journal», 14 (1), pp. 13-21.
- BENHAMOU N., KLOEPPER J.W., TUZUN S. (1998): *Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response*, «Planta», 204, pp. 153-168.
- BETTIOL W. (1999): *Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) in greenhouse conditions*, «Crop Protection», 18, pp. 489-492.
- BONES A.M., ROSSITER J.T. (1996): *The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry*, «Physiologia Plantarum», 97, pp. 194-208.
- BROWN P.D., MORRA M.J. (1997): *Control of soilborne plants pests using glucosinolate-containing plants*, «Advances in Agronomy», 61, pp. 167-231.
- COHEN Y. (1994a): *Local and systemic control of Phytophthora infestans in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids*, «Phytopathology», 84, pp. 55-59.
- COHEN Y. (1994b): *3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against Peronospora tabacina*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 44, pp. 273-288.
- COHEN Y., GISI U. (1994): *Systemic translocation of 14C-DL-3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against Phytophthora infestans*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 45, pp. 441-456.

- COHEN Y., GISI U., MOSINGER E. (1991): *Systemic resistance of potato plants against Phytophthora infestans induced by unsaturated fatty acids*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 38, pp. 255-273.
- COHEN Y., NIDERMAN T., MOËSINGER E., FLUHR R. (1994):  *$\beta$ -aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (Lycopersicon esculentum L.) plants and resistance to late blight infection caused by Phytophthora infestans*, «Plant Physiology», 104, pp. 59-66.
- COLLINGE D.B., LUND O.S., THORDAL-CHRISTENSEN H. (2008b): *What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants?*, «European Journal of Plant Pathology», 121, pp. 217-231.
- COLLINGE D.B., JENSEN M.K., LYGKYAER M.F., RUNG, J. (2008a): *How can we exploit genomic approaches for understanding the nature of plant defences? Barley as a case study*, «European Journal of Plant Pathology», 121, pp. 257-266.
- CONTI G.G., PIANEZZOLA A., ARNOLDI A., VIOLINI G., MAFFI D. (1996): *Possible involvement of salicylic acid in systemic acquired resistance of Cucumis sativus against Sphaerotheca fuliginea*, «European Journal of Plant Pathology», 102, pp. 537-544.
- COOK L.R., LITTLE G. (2001): *The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight*, «Pest Management Sciences», 58, pp. 17-25.
- COQUOZ J.L., BUCHALA A.J., MEUWLY PH., METRAUX, J.P. (1995): *Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to Phytophthora infestans and Alternaria solani*, «Phytopathology», 85, pp. 1219-122.
- COVENTRY H.S., DUBERY I.A. (2001): *Lipopolysaccharides from Burkholderia cepacia contribute to an enhanced defence capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in Nicotiana tabacum*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 58, pp. 149-158.
- CRISP P., WICKS T.J., TROUP G., SCOTT, E.S. (2006): *Mode of action of milk and whey in the control of grapevine powdery mildew*, «Australasian Plant Pathology», 35, pp. 487-493.
- DANDURAND L. M., MOSHER R., KNUDSEN G. R. (2000): *Combined effects of Brassica napus seed meal and Trichoderma harzianum on two soilborne plant pathogens*, «Canadian Journal of Microbiology», 46, pp. 1051-1057.
- DANN E., DIERS B., BYRUM J., HAMMERSCHMIDT R. (1998): *Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by Sclerotinia sclerotiorum in field and greenhouse studies*, «European Journal of Plant Pathology», 104, pp. 271-278.
- DE LORENZO G., CERVONE F., BELLINCAMPI D., CAPRARI C., CLARK A. J., DESIDERIO A., DEVOTO A., FORREST R., LECKIE F., NUSS L., SALVI G. (1994): *Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication*, «Biochemical Society Transactions», 22, pp. 394-397.
- DERCKEL J.P., BAILLIEUL F., MANTEAU S., AUDRAN J. C., HAYE B., LAMBERT B., LEGENDRE L. (1999): *Differential induction of grapevine defences by two strains of Botrytis cinerea*, «Phytopathology», 89, pp. 197-203.
- DONALDSON P.A., ANDERSON T., LANE B.G., DAVIDSON A.L., SIMMONDS D.H. (2001): *Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen Sclerotinia sclerotiorum*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 59, pp. 297-307.

- DONG H., DELANEY T.P., BAUER D.W., BEER S.V. (1999): *Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene*, «Plant Journal», 20, pp. 207-215.
- EL GHAOUTH A., ARUL J., GRENIER J., ASSELIN, A. (1992): *Effect of chitosan and other polyions on chitin deacetylase in Rhizopus stolonifer*, «Experimental Mycology», 16, pp. 173-177.
- EL GHAOUTH A., SMILANICK J.L., BROWN G.E., WISNIEWSKI M., WILSON C.L. (1999): *Application of Candida saitoana and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions*, «Plant Disease», 84, pp. 243-248.
- FALCON A.B., CABRERA J.C., COSTALES D., RAMFREZ M.A., CABRERA G., TOLEDO V., MARTINEZ-TELLEZ M.A. (2008): *The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against Phytophthora parasitica nicotianae*, «World Journal of Microbiology and Biotechnology», 24 (1), pp. 103-112.
- FARMER E., ALMERAS E., KRISHNAMURTHY V. (2003): *Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory*, «Current Opinion of Plant Biology», 6, pp. 372-378.
- FIORI A.C.G., SCHAWN-ESTRADA K.R.F., STANGARLIN J.R., VIDA J.B., SCAPIM C.A., CRUZ M.E.S., PASCHOLOTI S.F. (2000): *Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against Didymella bryoniae*, «Journal of Phytopathology», 148, pp. 483-487.
- FRITIG B., HEITZ T., LEGRAND M. (1998): *Antimicrobial proteins in induced plant defence*, «Current Opinion in Immunology», 10, pp. 16-22.
- GALLETI S., SALA E., LEONI O., BURZI P.L., CERATO C. (2008): *Trichoderma spp. Tolerance to Brassica carinata seed meal for a combine use in biofumigation*, «Biological Control», 45, pp. 319-327.
- GENTILE A., DENG Z.N., LA MALFA S., DOMINA F., TRIBULATO E., LORITO M., POLIZZI G. (2002): *Analisi dell'espressione del gene per l'endochitinasi di Trichoderma harzianum nel limone (Citrus limon (L.) Burm. F.)*, «Atti VI Giornate scientifiche SOI», Spoleto 23-25 ottobre 2002.
- GEORGIU G.C., TAIRIS N., SOTIROPOULOU A. (2000): *Hydroxyl radical scavengers inhibit lateral-type sclerotial differentiation and growth in Sclerotinia sclerotiorum and Rhizoctonia solani*, «Mycological Research», 104, pp. 1191-1196.
- GERBER I.B., ZEIDLER D., DURNER J., DUBERY J.A. (2004): *Early perception responses of Nicotiana tabacum cells in response to lipopolysaccharides from Burkholderia cepacia*, «Planta», 218, pp. 647-657.
- GIES D. (2004): *Commercial use of mustards for green manure and biofumigation in the United States*, «Agroindustria», 3, pp. 403-405.
- GIMSING A. L., KIRKEGAARD J. A. (2006): *Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants*, «Soil Biology & Biochemistry», 38 (8), pp. 2255-2264.
- HALKIER B. A., DU L. (1997): *The biosynthesis of glucosinolates*, «Trends in Plant Science», 2, pp. 425-431.
- HAMBERG M., GARDNER H.W. (1992): *Oxylipin pathway to jasmonate: biochemistry and biological significance*, «Biochimica Biophysica Acta», 1165 (1), pp. 1-18.
- Hamiduzzaman M.M.D., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus G.M., Mauch-Mani B. (2005):  *$\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling*, «Molecular Plant Microbe Interactions», 18 (8), pp. 819-829.



- HAMMERSCHMIDT R., SMITH-BECKER J.A. (2000): *The role of salicylic acid in disease resistance*, in *Induced plant defence against pathogens and herbivores - Biochemistry, Ecology and Agriculture*, a cura di A.A. Agrawal, S. Tuzun, E. Bent, APS Press, St. Paul, pp. 37-53.
- HIRANO A., NAGAO N., (1989): *Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens*, «Agricultural and Biological Chemistry», 11, pp. 3065-3066.
- HOWE G.A., SCHILLMILLER, A.L. (2002): *Oxylipin metabolism in response to stress*, «Current Opinion in Plant Biology», 5, pp. 230-236.
- HU X., BIDNEY D.L., YALPANI N., DUVICK J.P., CRASTA O., FOLKERTS O., LU G. (2003): *Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defence responses in sunflower*, «Plant Physiology», 133 (1), pp. 170-181.
- IGAWA T., TAKAHASHI-ANDO N., OCHIAI N., OHSATO S., SHIMIZU T., KUDO T., YAMAGUCHI I., KIMURA M. (2007): *Reduced contamination by the Fusarium mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene*, «Applied Environmental Microbiology», 73(5), pp. 1622-1629.
- IRINSKAYA L.I., CHALENKO G.I., PEREKHOD E.A., GERASIMOVA N.G. OZERETSKOVSKAYA O.L. (2000): *Effect of methyl jasmonate on arachidonic acid-induced resistance of potato to late blight*, «Applied Biochemistry Microbiology», 36 (2), pp. 181-186.
- JORDAN C.M., WAKEMAN R.J., DEVAY J.E. (1992): *Toxicity of free riboflavin and methionine-riboflavin solutions to Phytophthora infestans and the reduction of potato late blight disease*, «Canadian Journal of Microbiology», 38, pp. 1108-1111.
- KAGALE S., MARIMUTHU T., THAYUMANAVAN B., NANDAKUMAR R., SAMIYAPPAN R. (2005): *Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of Datura metel against Rhizoctonia solani and Xanthomonas oryzae pv oryzae*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 65, pp. 91-100.
- KALPANA K., MARUTHASALAM S., RAJESH T., POOVANNAN K., KUMAR K.K., KOKILADEVI E., RAJA J.A.J., SUDHAKAR D., VELAZHAHAN R., SAMIYAPPAN R., BALASUBRAMANIAN P. (2008): *Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins*, «Plant Science», 170, pp. 203-215.
- KESSMANN H., STAUB T., HOFMANN C., MAETZKE T., HERZOG J., WARD E., UKNES S. AND RYALS J. (1994): *Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals*, «Annual Review of Plant Pathology», 32, pp. 439-459.
- KIM J.F., AND BEER S.V. (2000): *Hrp genes and harpins of Erwinia amylovora: a decade of discovery*, in *Fire Blight and its Causative Agent, Erwinia amylovora*, a cura di J.L. Vanneste, CAB International, Wallingford, UK, pp. 141-162.
- KIM, M.K., CHOI, G.J., LEE, H.S. (2003): *Fungicidal property of Curcuma longa L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in greenhouse*, «Journal of Agricultural Food Chemistry», 53, pp. 6035-6039.
- KIM, H.G., JEON, J.H., KIM M.K., LEE, H.S. (2005): *Pharmacological effects of asaronaldehyde isolated from Acorus gramineus rhizome*, «Food Science and Biotechnology», 14 (5), pp. 685-688.
- KIRKEGAARD J.A., MATTHIESEN, J.N. (2004): *Developing and refining the biofumigation concept*, «Agroindustria», 3, pp. 233-239.
- KLARZYNSKI O., PLESSE B., JOUBERT J.M., YVIN J.C., KOPP M., KLOAREG B., FRITIG B. (2000): *Linear -1,3-glucans are elicitors of defence responses in tobacco*, «Plant Physiology», 124, pp. 1027-1037.
- KU'c J (1982): *Induced immunity to plant diseases*, «Bioscience», 32, pp. 854-860.

- LA MALFA S., DOMINA F., DISTEFANO G., TOSCANO V., VITALE A. (2007): *Cloni transgenici di limone: una nuova via per ottenere la resistenza al mal secco*, «Rivista di Frutticoltura e Orticoltura», 2007 (1).
- LAZZERI L. (2004): *A way for optimizing potential for an integrate management of soil-borne pests and diseases*, First international symposium: *Biofumigation: a possible alternative to methyl bromide?*, 31 March-1 April 2004, Firenze, Italy.
- LAZZERI L., LEONI O., BERNARDI R., MALAGUTI L., CINTI, S. (2004): *Plants, techniques and products for optimising biofumigation in the full field*, «Agroindustria», 3, pp. 281-287.
- LECKBAND G., LORZ, H. (1998): *Transformation and expression of a stilbene synthase gene of Vitis vinifera L. in barley and wheat for increased fungal resistance*, «Theoretical and Applied Genetics», 96, pp. 1004-1012.
- LEE K.Y., HONG J.K., SANWALD S.H., HWANG B.K. (2000): *Histological and ultrastructural comparisons of compatible, incompatible and DL-b-amino-n-butyric acid-induced resistance responses of pepper stems to Phytophthora capsici*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 57, pp. 269-280.
- MAKANDAR R., ESSIG J.S., SCHAPAUGH M.A., TRICK H.N., SHAH J. (2006): *Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 19, pp. 123-129.
- MALAMY J., CARR J.P., KLESSIG D.F., RASKIN I. (1990): *Salicylic acid – a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to tobacco mosaic virus infection*, «Science», 250, pp. 1001-1004.
- MATTHIESEN J.N., KIRKEGAARD J.A. (2006): *Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management*, «Critical Reviews in Plant Sciences», 25 (3), pp. 235-265.
- METRAUX J.P., AHL-GOY P., STAUB T., SPEICH J., STEINEMANN A., RYALS J., WARD E. (1991): *Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens*, in *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, a cura di H. Hennecke, D.P.S. Verma, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 1, pp. 432-439.
- METRAUX J.P., SIGNER H., RYALS J., WARD E., WYSS-BENZ M., GAUDIN J., RASCHDORF K., SCHMID E., BLUM W., INVERARDI B. (1990): *Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber*, «Science», 250, pp. 1004-1006.
- MEYER M.C., BUENO C.B., DE SOUZA N.L., YORINORI J.T. (2006): *Effect of doses of fungicides and plant resistance activators on the control of Rhizoctonia foliar blight of soybean, and on Rhizoctonia solani AG1-IA in vitro development*, «Crop Protection», 25, pp. 848-854.
- MITHEN R. F. (2001): *Glucosinolates and their degradation products*, «Advances in Botanical Research», 35, pp. 213-262.
- OKUNO T., NAKAYAMA M., OKAJIMA N., FURASAWA I. (1991): *Systemic resistance to downy mildew and appearance of acid soluble proteins in cucumber leaves treated with biotic and abiotic inducers*, «Annals Phytopathological Society Japan», 57, pp. 203-211.
- OOSTENDORP M., KUNZ W., DIETRICH B. STAUB T. (2001): *4 Induced disease resistance in plants by chemicals*, «European Journal of Plant Pathology», 107, pp. 19-28.
- PAJOT E., LE CORRE D., SILUE D. (2001): *Phytogard and DL-beta-amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (Bremia lactucae) in lettuce (Lactuca sativa L.)*, «European Journal of Plant Pathology», 107, pp. 861-869.
- PENÁ-CORTEÉS H., BARRIOS P., DORTA F., POLANCO V., SANCHEZ C., SANCHEZ E., RAMIREZ

- I. (2005): *Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening*, «Journal of Plant Growth Regulation», 23, pp. 246-260.
- PENG J.L., DONG H.S., DONG H.P., DELANEY T.P., BONASERA J.M., BEER S.V. (2003): *Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the NDR1 and EDS1 gene*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 62, pp. 317-326.
- POINSSOT B., VANDELLE E., BENTÉJAC M., ADRIAN M., LEVIS C., BRYGOO Y., GARIN J., SICILIA F., COUTOS-THÉVENOT P., PUGIN P. (2003): *The endopolygalacturonase 1 from Botrytis cinerea activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16 (6), pp. 553-564.
- RAJASEKARAN K., CARY J.W., JAYNES J.M., CLEVELAND T.E. (2007): *Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (Gossypium hirsutum L.) plants*, «Plant Biotechnology Journal», 3, pp. 545-554.
- RASK L., ANDREASSON E., EKBOM B., ERIKSSON S., PONTOPPIDAN B., MEIJER, J. (2000): *Myrosinase: gene family evolution and herbivore defence in Brassicaceae*, «Plant Molecular Biology», 42, pp. 93-113.
- RASMUSSEN J.B., HAMMERSCHMIDT R., ZOOK, M.N. (1991): *Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with Pseudomonas syringae pv syringae*, «Plant Physiology», 97, pp. 1342-1347.
- ROMANO P., SUZZI, G. (1985): *Sensitivity of Saccharomyces cerevisiae vegetative cells and spores to antimicrobial compounds*, «Journal of Applied Bacteriology», 59, pp. 299-302.
- ROSA E.A.S., RODRIGUES P.M.F. (1999): *Towards a more sustainable agricultural system: The effect of glucosinolates on the control soilborne diseases*, «Journal of Horticultural Science and Biotechnology», 74, pp. 667-674.
- SANKARASUBRAMANIAN H., SARAVANAKUMAR D., RADJACOMMARE R., EBENEZAR E.G., SEETHARAM K. (2008): *Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease rice*, «Biocontrol», 53, pp. 555-567.
- SEMBDNER G., PARTHIER B. (1993): *The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates*, «Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology», 44, pp. 569-589.
- SEREBRIAKOVA L., OLDACH K.H., LÖRZ H. (2005): *Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity*, «Journal of Plant Physiology», 162, pp. 985-1002.
- SILUE D., PAJOT E., COHEN Y. (2002): *Induction of resistance to downy mildew (Peronospora parasitica) in cauliflower by DL-beta-amino-n-butanoic acid (BABA)*, «Plant Pathology», 51, pp. 97-102.
- STADNIK M.J., BUCHENAUER H. (2001): *Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of Blumeria graminis f. sp. tritici is associated with both benzothiadiazole-induced and quantitative resistance of wheat*, «Journal of Phytopathology», 147(10), pp. 615-622.
- STEINER U., SCHÖNBECK F. (1997): *Induced resistance*, in *Resistance of crop plants against fungi*, a cura di H. Hartleb, R. Heitefuss, H.H. Hopp, Gustav Fischer, Jena, Germany, pp. 272-297.
- STEPHAN D., SCHMITT A., MARTINS CARVALHO S., SEDDON B., KOCH E. (2005): *Evaluation of biocontrol preparations and plant extracts for the control of Phytophthora infestans on potato leaves*, «European Journal of Plant Pathology», 112, pp. 235-246.
- THOMMA B.P., PENNINGCKX I.A., BROEKAERT W.F., CAMMUE B.P. (2001): *The complexity of disease signalling in Arabidopsis*, «Current Opinion in Immunology», 13, pp. 63-68.

- TRAVIS J. (2008): *Uncorking the grape genome*, «Science», 320, pp. 475-477.
- UPPAL A.K., EL HADRAMI A., ADAM L.R., TENUTA M., DAAYF F. (2007): *Biological control of potato Verticillium wilt under controller and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts*, «Biological Control», 44, pp. 90-100.
- VENÂNCIO W.S., ZAGONEL J., FURTADO E.L., SOUZA N.L. (1999): *Novos fungicidas. I-produtos naturais e derivados sintéticos: estrobirulinas e fenilpirroles*, «Revisão Anual de Patologia de Plantas», 7, pp. 103-155.
- VICK B.A., ZIMMERMAN D.C. (1987): *The lipoxygenase pathway*, in *The metabolism, structure and function of plant lipids*, a cura di P.K. Stumpf, J.B. Mudd, Plenum, New York, pp. 383-390.
- WEBER H. (2002): *Fatty acid-derived signals in plants*, «Trends in Plant Science», 7, pp. 217-224.
- WEI Z.M., BEER S.V. (1996): *Harpin from Erwinia amylovora induces plant disease resistance*, «Acta Horticulturae», 411, pp. 223-225.
- WILSON C.L., SOLAR J.M., EL GHAOUTH A., WISNIEWSKI M.E. (1997): *Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against Botrytis cinerea*, «Plant Disease», 81(2), pp. 204-210.
- YAMAGUCHI I. (1998): *Activators of systemic acquired resistance*, In *Fungicidal Activity: Chemical and Biological Approaches to Plant Protection*, a cura di D. Hutson, J. Miyamoto, Wiley, Chichester, pp. 193-219.
- ZHU Q., MAHER E. A., MASOUD S., DIXON R.A., LAMB C.J. (1994): *Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco*, «Bio-Technology», 12, pp. 807-812.
- ZINOV'eva S.V., VASYUKOVA N.I., II'INSKAYA L.I., UDALOVA ZH.V., OZERETSKOVSKAYA O.L. (1997): *Immunization of tomato plants against root-knot nematode Meloidogyne incognita with biogenic elicitors*, «Applied Biochemistry and Microbiology», 33(3), pp. 329-333.