

Italus Hortus

Rivista scientifica di
orticoltura, floricoltura e frutticoltura

Fondata nel 1993

REVIEW n. 22



Publicata dalla Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (SOI)

Volume 21, numero 1

2014

Microrganismi biostimolanti: *Trichoderma* sp. in substrati innovativi e alternativi alla torba per piante ornamentali

Domenico Prisa¹, Sabrina Sarrocco² e Giovanni Vannacci²

¹ Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, CRA-VIV Unità di ricerca per il vivaismo e la gestione del verde ambientale ed ornamentale, Pescia (PT)

² Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa

Ricezione: 6 dicembre 2013; Accettazione: 10 marzo 2014

Beneficial microorganisms: *Trichoderma* sp. in innovative and alternative substrates to peat for ornamental plants

Abstract. Peat, mainly imported from the northern and eastern European regions, is the basic component of growing substrates commonly utilized for cultivation of plants of horticultural and ornamental interest, both in pots and in benches. Peat is used as it is in some crops, but, in most cases, it is employed in mixture with other components. Due to its features, such as homogeneity, high water absorption capacity, good aeration, structural stability, a limited nutrient content and pH value, sphagnum peat represents the starting material most frequently used for substrates production. During the past few years, the supply of peat is hampered by environmental and economical constraints. Recently, the European Commission decided to exclude all substrates containing peat from the release of the Community Eco-Label Mark. In this respect the need to reduce peat in ornamental substrates drew great attention and resulted in increasing research activity to set up new and innovative substrates for horticultural and ornamental plants market. The aim of the present work is to give an overview of the possible application of beneficial microorganisms, particularly fungi belonging to *Trichoderma* genus, as growing media inoculants in order to develop innovative, economical and suitable substrates alternative to peat for cultivation of species of ornamental interest. The genus *Trichoderma* consists of anamorphic fungi isolated primarily from soil and decomposing organic matter, with teleomorphs, when known, belonging to the ascomycetous genus *Hypocrea* (order *Hypocreales*). Their lifestyle is generally saprotrophic with minimal nutritional requirements; they are able to grow rapidly on many substrates, can produce metabolites with demonstrable antibiotic activity and may be mycoparasitic against a wide range of fungal pathogens. They are involved in fundamental activi-

ties that ensure the stability and productivity of both agricultural and natural ecosystems. Recent discoveries show them as opportunistic, avirulent plant parasites, able to form mutualistic relationships with plants. Some *Trichoderma* strains, described as rhizosphere competent and commercially developed, can cause asymptomatic infection of roots, where the fungus colonization is limited to the outer cortical regions. This intimate interaction with the plant provides a number of benefits only recently recognized for their variety and importance, including: increased resistance of the plant to biotic stresses through induced or acquired systemic resistance and to abiotic stresses such as water deficit/excess, high salinity and extreme temperature; enhanced nitrogen use efficiency by improved mechanisms of nitrogen reduction and assimilation, reduced overexpression of stress genes and accumulation of compounds toxic to plant pathogens during plant response.

Key words: Endophytism, *Camellia*, *Limonium*, *Cupressus*, biocontrol.

La Torba: caratteristiche, problematiche legate al suo impiego e sue alternative

Uno dei fattori che principalmente incide sulla qualità delle piante in vaso è il tipo di substrato utilizzato per coltivarle ed in particolare le sue caratteristiche fisico-chimiche. Lo sviluppo ed il funzionamento delle radici sono direttamente legati alle condizioni di aerazione e al contenuto di acqua, oltre che all'influenza diretta degli elementi nutritivi necessari allo sviluppo (Maher *et al.*, 2008).

La tecnica della coltivazione su substrato, assai diversificata per settori, è una realtà ormai consolidata, con una espansione continua delle zone di produzione floricole ed orticole. Il ruolo dell'Italia nella produzione di substrati di coltivazione ha raggiunto negli ultimi anni livelli tali da poter presupporre ormai una collocazione del nostro Paese fra i maggio-

* domenico.prisa@entecra.it

ri produttori a livello europeo e nel 2006, secondo una stima ISTAT (Perelli, 2007), in Italia sono stati commercializzati 5.6 milioni di quintali di substrati di coltivazione e materiali ad esso assimilabili (secondo il D.L. 317/2006), di cui 760.000 quintali di torbe. L'intenso sfruttamento delle torbiere ha però indotto un progressivo esaurimento di queste fonti di approvvigionamento non rinnovabili. L'ingresso sul mercato, negli ultimi anni, di torbe estratte da siti ancora non sfruttati, situati prevalentemente nei paesi baltici, e le limitazioni all'estrazione in alcune nazioni del nord-centro Europa per problemi ambientali hanno portato ad una diminuzione della qualità e ad un incremento del prezzo del prodotto. La lenta rinnovabilità di questa risorsa ha portato alla necessità di limitarne l'estrazione e alla formulazione di substrati *peat free* per l'ottenimento del marchio Ecolabel (Caron e Rochefort, 2013). In molti paesi, come ad esempio in Olanda (Armstrong, 2004) e nel nostro Paese [Progetto PROBIORN finanziato dalla Regione Toscana (2004-06); Progetti FLORPRO (2007-10) e SUBARTIFLOR (2009-13, di cui si parlerà dettagliatamente nell'ultimo paragrafo) finanziati dal MiPAAF] diversi progetti di ricerca sono stati finanziati al fine di trovare materiali alternativi alla torba che uniscano ai bassi costi anche proprietà fisiche, chimiche e biologiche ottimali, almeno paragonabili alla torba.

Nei materiali che oggi vengono proposti come alternativi alla torba rientrano: la fibra di cocco, i materiali ligno-cellulosici preparati con gli scarti delle industrie che lavorano il legno, il compost di qualità a base di residui vegetali (compost verde) eventualmente addizionati di materiali inorganici di produzione locale, i compost ottenuti con la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) ricavata dalla raccolta differenziata e miscelata in varia misura con altri materiali ligno-cellulosici o fanghi di depurazione utilizzati come tali o dopo compostaggio (Zhang *et al.*, 2013).

Il compost, in particolare, è un prodotto ottenuto dalla mineralizzazione e parziale umificazione, in condizioni di aerobiosi, della sostanza organica ad opera di microrganismi, a partire da matrici organiche di diversa natura, normalmente derivanti da sottoprodotti dell'industria. Presenta alcune caratteristiche positive: buona reperibilità, bassi costi, pezzatura e caratteristiche fisiche abbastanza definite, soppressività verso i patogeni in quanto sembra che la microflora presente nei compost possa antagonizzarli attraverso la competizione per le risorse nutritive e, in taluni casi, mediante la produzione di enzimi litici (Zhang *et al.*, 2013). Tuttavia, in generale i compost, rispetto alla torba, presentano anche diversi aspetti

negativi: pH più alto, salinità superiore, quantità di acqua disponibile inferiore, disomogeneità qualitative nel tempo. Tali caratteristiche non assumono particolari significati qualora il compost venga impiegato in pieno campo o in giardino, mentre influiscono in maniera decisiva sulle caratteristiche chimico fisiche del substrato di coltivazione delle piante in vaso come accade ad esempio nell'orto-florovivaismo, per cui sono confinate in uno spazio ben definito e limitato (Pacifci *et al.*, 2013). Un aspetto fondamentale nel processo di produzione dei compost è quello di riuscire a ottenere un prodotto stabilizzato, ossia che abbia raggiunto sia la maturità biologica (rallentamento delle attività biologiche sulla sostanza organica), sia la maturità agronomica (assenza di fitotossicità per le piante), requisiti stabiliti dalla normativa nazionale in materia di fertilizzanti (D.Lgs 217/06).

Infine, ma non di secondaria importanza, la messa a punto di substrati alternativi a base di compost, da utilizzare nell'orto-florovivaismo, si coniuga ad un'altra improrogabile esigenza: ridurre la produzione di rifiuti ed incentivare forme di smaltimento eco-compatibili. Si fa sempre più strada una concezione dei rifiuti come materia da trasformare in beni utilizzabili. La trasformazione biologica dei rifiuti organici in compost è una pratica non nuova per l'agricoltura, anzi è una pratica che accompagna da millenni le attività di produzione degli agricoltori (Zorzi, 1997).

I funghi benefici nell'orto-florovivaismo

L'insorgenza di ceppi di patogeni resistenti a principi attivi commerciali, la maggiore sensibilità dei consumatori per i rischi connessi con la presenza di residui negli alimenti, la riduzione nel numero dei principi attivi disponibili e, da un punto di vista normativo, il recepimento della direttiva comunitaria sull'uso sostenibile dei fitofarmaci ha portato ad un crescente interesse verso l'impiego di prodotti fitosanitari a base microbica (Vannacci e Gullino, 2000). Di non trascurabile interesse, infine, sono anche gli effetti collaterali imputabili all'attività contro i patogeni delle piante di alcuni dei microrganismi maggiormente studiati, spesso accompagnati alla stimolazione dell'accrescimento delle piante trattate. Molte aziende agrarie hanno, perciò, modificato le loro strategie di difesa, passando da una lotta chimica tradizionale a soluzioni più innovative che includono la prevenzione (che ha le sue fondamenta nella diagnosi precoce delle malattie) ed il ricorso a trattamenti alternativi a quelli chimici.

La riduzione, in un programma di difesa integrata, o l'eliminazione, in una strategia di tipo biologico,

dell'uso di principi attivi di sintesi è altamente auspicabile in tutti i settori dell'agricoltura. Uno dei mezzi più promettenti per raggiungere questo obiettivo è l'uso di nuovi strumenti basati su agenti di biocontrollo (BCA) che siano in grado di intervenire o direttamente sul patogeno, prevenendo l'insorgenza della malattia o riducendone l'intensità, oppure indirettamente agendo sulla pianta ospite inducendo in essa uno stato di minor suscettibilità all'attacco dei fitopatogeni. Tale strategia permette di eliminare o ridurre le quantità di prodotti chimici con conseguente riduzione dell'impatto delle sostanze di sintesi sull'ambiente (Harman e Kubicek, 1998).

Ad oggi un numero sempre crescente di BCA vengono utilizzati, da soli o in combinazione, come principio attivo di prodotti fitosanitari a base biologica che, una volta registrati, sono disponibili come prodotti commerciali. Tra questi microrganismi utilizzati come principio attivo di prodotti attualmente in commercio in Italia ricordiamo *Bacillus* tra i batteri e *Ampelomyces*, *Coniothyrium* e soprattutto *Trichoderma* tra i funghi (Vannacci *et al.*, 2008). Sebbene siano numerosi gli esempi di microrganismi, tra cui i funghi, utilizzati con attività benefica nel settore orto-florovivaistico, non sembra ancora essere sufficientemente diffuso l'impiego di questi prodotti biologici nella difesa da patogeni.

Numerosi sono i lavori che riportano di funghi di cui sono noti gli effetti benefici (biocontrollo e biostimolazione) verso colture di diverse specie tra cui quelle destinate alla produzione orto-florovivaistica. Ad esempio, *Piriformospora indica*, basidiomicete che crea associazioni simbiotiche con diverse specie vegetali, garantisce alla pianta ospite benefici come la tolleranza agli stress salini, la resistenza alle malattie, la resistenza alla tossicità da metalli pesanti e la promozione della crescita delle piante (Unnikumar *et al.*, 2013). Più in particolare, sembra che la stimolazione dovuta a *P. indica* sulla crescita di piantine wild-type di *Arabidopsis*, sia connessa con una alterazione delle proteine ROP1 e ROP6 coinvolte nella formazione delle radici (Venus e Oelmüller, 2013).

Alcuni funghi endofiti possono svolgere un ruolo importante nella nutrizione e nel metabolismo ormonale di gibberelline e auxine. Alcuni ceppi di *Penicillium citrinum* sono stati isolati da *Ixeris repens* e si sono mostrati efficaci nella promozione della crescita di piante di *Atriplex gmelinii* attraverso la produzione di gibberelline (Khan *et al.*, 2013), mentre su soia, un isolato di *Cladosporium sphaerospermum* ha incrementato significativamente la crescita e la produzione di gibberelline rispetto al controllo non trattato (Hamayun *et al.*, 2009). Un nuovo ceppo di

Cephalotheca sulfurea, selezionato per la capacità di stimolare la produzione di gibberelline in piante di soia cv. Hwangkeumkong, ha mostrato effetti significativi sull'altezza, biomassa e area fogliare, rispetto a piante non trattate (Hamayun *et al.*, 2012).

In recenti lavori è stato dimostrato che funghi del genere *Gilmaniella* sp. sono in grado di incrementare il tasso fotosintetico, il livello di carboidrati e il contenuto di clorofilla nelle foglie di *Atractylodes lancea* (Wang *et al.*, 2012a), mentre *Exophiala* sp. stimola la crescita e l'induzione di resistenza a stress idrici prolungati in piante di cetriolo (Khan *et al.*, 2011a), ovvero *Ceratobasidium* sp. incrementa significativamente le dimensioni dell'apparato radicale e la quantità di clorofilla in piante di *Rehmannia glutinosa* (Chen *et al.*, 2011). Un nuovo ceppo di *Aspergillus fumigatus*, l'isolato GMH-1, si è dimostrato in grado di aumentare significativamente la biomassa fresca e secca, l'area fogliare, il contenuto di clorofilla ed il tasso fotosintetico sotto stress salino (70 e 140 mM di NaCl) di piante di soia (Khan *et al.*, 2011b).

In un recente studio effettuato in India, alcuni funghi isolati da campi contaminati da arsenico sono stati selezionati per la stimolazione della crescita di piante di riso e pisello. *Westerdykella aurantiaca*, *Rhizopus delemar* e *Lasiodiplodia* sp. hanno mostrato effetti significativi sulla crescita delle piante e sulla disponibilità di nutrienti del terreno oltre ad apportare effetti benefici sui terreni contaminati da arsenico (Srivastava *et al.*, 2012).

Un noto fungo benefico, *Clonostachys rosea*, ha mostrato effetti positivi in termini di promozione della crescita e del controllo del marciume radicale dovuto a *Pythium aphanidermatum* in lattuga coltivata in condizioni idroponiche (Corrêa *et al.*, 2010). Quando utilizzato per la concia di semi di cotone, *C. rosea*, è in grado di contenere gli attacchi di *Rhizoctonia solani* e di *Pythium ultimum*, comportandosi da micoparassita nei confronti di *R. solani*, ma non verso *P. ultimum*. (Moller *et al.*, 2003). Inoltre, ha dato ottimi risultati, applicato al terreno o su semi, nei confronti di *Sclerotium rolfsii* su fagiolo, *R. solani* su patata, *P. ultimum* e *R. solani* su cavolo, cotone e zinnia (Corrêa *et al.*, 2010). *Clonostachys rosea*, in abbinamento con *Ulocladium atrum*, è stata valutata con un certo successo nella soppressione di *Botrytis cinerea* su ciclamino (Kohl *et al.*, 1998), geranio (Gerlagh *et al.*, 2005) e rosa (Yohalem e Kristensen, 2004).

Isolati fungini di *Penicillium coptila* si sono mostrati promettenti agenti di biocontrollo in piante di *Cannabis sativa* contro *B. cinerea* e *Trichothecium roseum* (Kusari *et al.*, 2013). I composti volatili di *Nodulisporium* sp. hanno mostrato un effetto fungi-

statico o fungitossico verso diversi patogeni del gelso-mino (Suwannarach et al., 2013).

Da alcuni anni, isolati fungini appartenenti alle specie *Muscodor albus* e *Muscodor roseus* sono studiati per la capacità di produrre VOCs (*Volatile Organic Compounds*) in grado di ridurre significativamente lo sviluppo di patogeni fungini di origine tellurica mentre *Muscodor vitigenus* produce volatili repellenti per insetti (Stinson et al., 2003). I composti volatili (VOCs) prodotti da questi funghi sono stati chimicamente caratterizzati e sono riconducibili ad esteri, alcoli, acidi, chetoni e sostanze lipofiliche che risultano letali per un'ampia varietà di funghi patogeni dell'uomo e delle piante, verso batteri, nematodi ed alcuni insetti mentre non hanno mostrato alcuna azione fitotossica su un'ampia gamma di specie vegetali. Test di antibiosi *in vitro* hanno permesso di evidenziare la capacità di questi funghi di causare, senza venire a contatto diretto con il patogeno o con il suo substrato di crescita, ma solamente attraverso il rilascio dei VOCs, la morte di funghi agenti causali di importanti malattie di piante di interesse ornamentale come *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Verticillium dahliae* (Suwannarach et al., 2012). La possibilità di utilizzare funghi produttori di VOCs rappresenta una interessante e moderna alternativa biologica alla fumigazione (micofumigazione), al pari della biofumigazione che prevede l'utilizzo di piante produttrici di glucosinolati per la disinfezione del terreno destinato alla coltivazione, ma molto meno conosciuta ed utilizzata (Schulz e Dickschat, 2007). Si tratta di una tecnica particolarmente adatta per il controllo di patogeni di origine tellurica presenti nei terreni utilizzati per la semina, il trapianto e l'allevamento di piante destinate anche al settore orticolo, florovivaistico ed ornamentale.

Chaetomium globosum, fungo endofita della *Curcuma enyujin* (Zingiberaceae), una pianta tradizionale cinese, si è dimostrato efficace *in vitro* contro vari agenti patogeni delle piante, mediante meccanismi di antagonismo e lisi enzimatica (Wang et al., 2012b). Piante di *Arabidopsis thaliana*, inoculate con *Acremonium alternatum* sono risultate meno sensibili alla formazione di proliferazioni sulle radici in seguito all'attacco da parte di *Plasmodiophora brassicae* (Jäschke et al., 2010). Due isolati di *Cladorrhinum foecundissimum* (S8 e A32) hanno evidenziato una riduzione dell'incidenza di *Rhizoctonia solani* in cotone (Gasoni e Stegman De Gurfinkel, 2009).

Coniothyrium minutans, fungo specializzato nel parassitizzare gli sclerozi di funghi fitopatogeni appartenenti al genere *Sclerotinia*, si è rivelato particolarmente attivo su lattuga, al punto da essere utilizzato, come principio attivo di un prodotto fitosanitario

a base biologica attualmente in commercio (Benuzzi et al., 2004).

Aspergillus sp. (ceppo ASP-4) sembra possa parassitizzare e distruggere gli sclerozi di *Sclerotinia sclerotiorum* isolata da piante di colza. I risultati mostrano l'effetto che questo micoparassita ha sulla germinazione degli sclerozi e sulla successiva diffusione di *S. sclerotiorum* (Hu et al., 2013), patogeno polifago in grado di attaccare numerose specie vegetali anche di interesse orticolo e flovivaistico.

Forme saprotrofe di *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*), isolate da terreni italiani e francesi repressivi nei confronti di agenti di tracheofusariosi (causate da diverse *formae speciales* di *F. oxysporum*) sono state ampiamente indagate sia in Italia sia in Francia, portando, in entrambi i Paesi, alla messa a punto di preparati da utilizzare soprattutto nel settore orto-floricolo (Benuzzi et al., 2004). Ad esempio, *Fusarium* saprofiti isolati da terreni repressivi verso *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* si sono rivelati attivi anche nei confronti di *F. oxysporum formae speciales cyclaminis, basilici, lycopersici, gladioli e chrysanthemi*, agenti, rispettivamente, di tracheofusariosi di ciclamino, basilico, pomodoro, gladiolo e crisantemo (Benuzzi et al., 2004).

Trichoderma

Trichoderma (divisione *Ascomycota*, ordine *Hypocreales*) è un genere fungino presente in molti ecosistemi (Perotto et al., 2013). L'abbondanza di *Trichoderma* spp. nel suolo, coniugata ad un'ampia versatilità metabolica, la possibilità di colonizzare velocemente la rizosfera, insieme alla capacità di reprimere un gran numero di agenti patogeni delle piante, sono una prova diretta del ruolo che questo genere fungino possa svolgere nel controllo biologico (Harman et al., 2012). Alcuni isolati fungini di *Trichoderma* si sono rivelati efficaci come agenti di biocontrollo di funghi fitopatogeni terricoli in condizioni di campo e di serra. *Trichoderma* spp. possono ridurre la gravità delle malattie delle piante dovute a patogeni vegetali presenti nel terreno, attraverso la loro attività antagonistica e di micoparassitismo (Sarrocco et al., 2013a). Negli ultimi decenni, la ricerca ha evidenziato come alcuni ceppi di *Trichoderma* possano interagire con le radici, aumentando la crescita della pianta, la resistenza alle malattie e la tolleranza agli stress abiotici (Hermosa et al., 2013). Isolati di *Trichoderma* endofiti dell'apparato radicale sono stati selezionati anche su specie arboree quali conifere (Petrini et al., 1993), tra cui *Pinus* spp. (Sieber et al. 1999), *Taxus* spp. (Fisher e Petrini,

1987) e *Juniperus* spp. (Petrini e Carroll, 1981).

Gli isolati di *Trichoderma* sono caratterizzati da un rapido tasso di crescita in coltura e dalla capacità di sporulare abbondantemente. Il loro stile di vita è generalmente saprotrofico con esigenze nutrizionali minime, sono in grado di crescere rapidamente su molti substrati producendo metaboliti con attività antibiotica contro una vasta gamma di patogeni (Sarrocco *et al.*, 2008). *Trichoderma* non è conosciuto come agente eziologico di malattie delle piante. Alcune specie invece arrecano danni alle coltivazioni di funghi eduli come *Pleurotus ostreatus* o *Agaricus bisporus*. (Kosanovic *et al.*, 2013).

La conoscenza dei meccanismi attraverso i quali *Trichoderma* interagisce con i funghi fitopatogeni e/o con la pianta ospite è di vitale importanza per migliorare l'applicazione pratica di questi microrganismi benefici. Essi possono difendere la pianta attraverso meccanismi diretti, come il micoparassitismo, la competizione per i nutrienti e lo spazio e modificando le condizioni ambientali, meccanismi che possono essere mediati dal rilascio di metaboliti dannosi (antibiotici ed enzimi litici) per i funghi patogeni, o indirettamente attraverso un effetto benefico sulla pianta che si traduce nella promozione della crescita e/o nell'induzione di meccanismi difensivi. Nelle interazioni dirette il micoparassitismo è uno dei meccanismi più comunemente messi in atto nei confronti di un elevato numero di patogeni (Sarrocco *et al.*, 2004; 2006; Catalano *et al.*, 2011). Isolati di *Trichoderma* sono caratterizzati dalla capacità di produrre un gran numero di metaboliti secondari che mostrano attività antimicrobica (Sarrocco, 2013b).

La competizione per lo spazio, per i siti di infezione e per le sostanze nutritive si sono dimostrati tra i possibili meccanismi coinvolti nelle attività di biocontrollo di *Trichoderma* spp. (Sarrocco *et al.*, 2009).

La prima dimostrazione di resistenza indotta nelle piante da parte di *Trichoderma* ha riguardato piante di fagiolo divenute resistenti nei confronti di *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum lindemuthianum* dopo inoculazione della radice con il ceppo T-39 di *Trichoderma harzianum* (Yedidia *et al.*, 1999). Diversi studi attestano la capacità di *Trichoderma* spp. di produrre, nel corso dell'interazione con la pianta, differenti classi di metaboliti che agiscono da effettori in grado di indurre resistenza. Tali molecole comprendono enzimi (es. xylanasi), prodotti genici di avirulenza e composti a basso peso molecolare rilasciati dalle pareti cellulari del fungo o della pianta in seguito all'azione degli enzimi di *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008).

Tra i numerosi esempi dell'azione benefica di *Trichoderma* nel settore floro-vivaistico, possiamo

ricordare casi in cui isolati di *T. harzianum* sono stati utilizzati con successo per controllare *Cylindrocladium* su foglie di mirto in vivaio (Polizzi e Vitale, 2002), *Pythium aphanidermatum* e *Pythium ultimum* su geranio (Wick e Nussenbaum, 2000) oppure isolati di *T. virens* che sono stati utilizzati per controllare *R. solani* su *Vinca* e *Impatiens* (Elliott e Elmer, 2003). Diverse specie di *Trichoderma* (compreso *T. hamatum*) hanno dimostrato di avere un effetto di promozione della crescita su diverse piante legnose perenni, tra cui *Pinus radiata* e *Pinus sylvestris* (Hohmann *et al.*, 2011). In una prova di confronto tra difesa tradizionale e difesa con mezzi biologici contro *Rhizoctonia solani* su poinsettia si è osservato un parziale contenimento della malattia da parte di alcuni ceppi di *Trichoderma* (Amoroso *et al.* 2006).

Isolati diversi di *Trichoderma* si sono rivelati efficaci quando applicati al terreno nei confronti di diversi patogeni tellurici, quali *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. e di diverse *formae speciales* di *Fusarium oxysporum* ad esempio *melonis*, *vasinfectum*, *chrysanthemi*, che provocano la tracheofusariosi rispettivamente di melone, cotone, crisantemo e verso *F. oxysporum radicle-lycopersici*, agente di un marciume del colletto del pomodoro (Ojha e Chatterjee, 2012).

In ogni caso è importante il momento in cui l'antagonista viene introdotto nel sistema: generalmente risulta utile lasciare un certo intervallo di tempo a *Trichoderma* per colonizzare il terreno prima dell'impianto della coltura, anche se la capacità di esprimere un determinato meccanismo di biocontrollo da parte di un isolato antagonista, può variare al variare del patogeno, dell'ospite e delle condizioni ambientali. (Vinale *et al.*, 2008).

Per impiegare quantitativi più limitati dell'antagonista si può applicare *Trichoderma* come conciante dei semi. Soddisfacenti risultati sono stati ottenuti contro marciumi di giovani piante causati da specie di *Pythium* su diverse colture orticole, da *R. solani* su colture come soia, cotone, mais e da *Alternaria brassicicola* e *A. raphani* rispettivamente su cavolo e ravanella (Benuzzi *et al.* 2004).

Trichoderma di conseguenza è tra i funghi benefici più studiati e commercializzati che si trovano sul mercato come prodotti fitosanitari a base biologica e biofertilizzanti del suolo (Vannacci e Gullino, 2000).

Impiego di *Trichoderma* in substrati innovativi per l'orto-florovivaismo

A causa delle recenti decisioni della Commissione europea di escludere tutti i substrati contenenti torba

dal rilascio del marchio di qualità ecologica, a seguito dei problemi legati al progressivo esaurimento di queste fonti non rinnovabili, all'incremento del prezzo e alla diminuzione della qualità, negli ultimi anni in Italia si è cercato di inserire in agricoltura in generale, e nel settore orto-florovivaistico in particolare, materiali alternativi che potessero sostituire o almeno ridurre l'utilizzo della torba, meglio se addizionati di microrganismi (agenti di biocontrollo e/o biostimolanti) che conferissero un valore aggiunto agli stessi substrati.

Sebbene pochi siano gli esempi attualmente a disposizione nel settore orto-florovivaistico, negli ultimi anni un progetto finanziato dal MIPAAF (SUB-ARTIFLOR: "Messa a punto di substrati artificiali innovativi per il florovivaismo"), ha avuto come obiettivo la formulazione e lo sviluppo di un substrato innovativo alternativo alla torba, addizionato di isolati di *Trichoderma* (fig. 1) specificatamente selezionati per la produzione di piante da seme (*Limonium sinuatum* e *Cupressus sempervirens*) (figg. 2 e 3) e alla coltivazione di piante acidofile (*Camellia japonica*) (fig. 4). In aggiunta, gli isolati selezionati hanno dimostrato un'interessante azione di controllo di alcune specie fungine patogene di importanza nel settore, rendendo questi nuovi substrati di maggiore interesse.

L'attività ha comportato l'utilizzo di alcuni isolati di *Trichoderma* sp. inclusi all'interno di un'ampia collezione fungina depositata presso il Laboratorio di Micologia Fitopatologica del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa. Gli isolati di *Trichoderma* spp. da sottoporre allo screening iniziale sono stati scelti in modo da



Fig. 1 - Sporulazione di *Trichoderma* spp. sulla biomassa fermentata.

Fig. 1 - Sporulation of *Trichoderma* spp. on fermented biomass

saggiare il più ampio numero possibile di specie all'interno di questo genere e di utilizzare isolati provenienti da differenti matrici, ospiti e aree geografiche al fine di assicurarsi la maggior variabilità possibile. Alcuni isolati al termine di numerose fasi di screening sulle tre specie vegetali, sono stati scelti per la loro capacità di crescere nella rizosfera o come endofiti nelle radici e/o per il loro effetto biostimolante, in aggiunta alla capacità di agire come agenti di biocontrollo di alcuni patogeni di interesse per il settore floro-vivaistico quali *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotinia minor*. Al fine di ottimizzare la miscela a ridotto contenuto di torba dei nuovi substrati di crescita per le piante, è stato necessario mettere a punto una procedura di fermentazione degli isolati fungini selezionati.

Attraverso i diversi round di selezione basati su dati di endofitismo e agronomici, è stato possibile individuare 2 isolati per *Limonium sinuatum* (*T. asperellum* 2046 e *T. viride* 8227) e 2 isolati per *Cupressus sempervirens* (*T. asperellum* 2046 e *T. harzianum* 8238) che hanno garantito un incremento significativo di alcuni dei parametri agronomici valutati (numero di foglie, area fogliare e altezza delle piante rispetto al controllo) quando addizionati al substrato di semina e crescita delle due specie vegetali. In



Fig. 2 - Pianta di *Limonium sinuatum* in coltivazione.

Fig. 2 - *Limonium sinuatum* plant in cultivation.

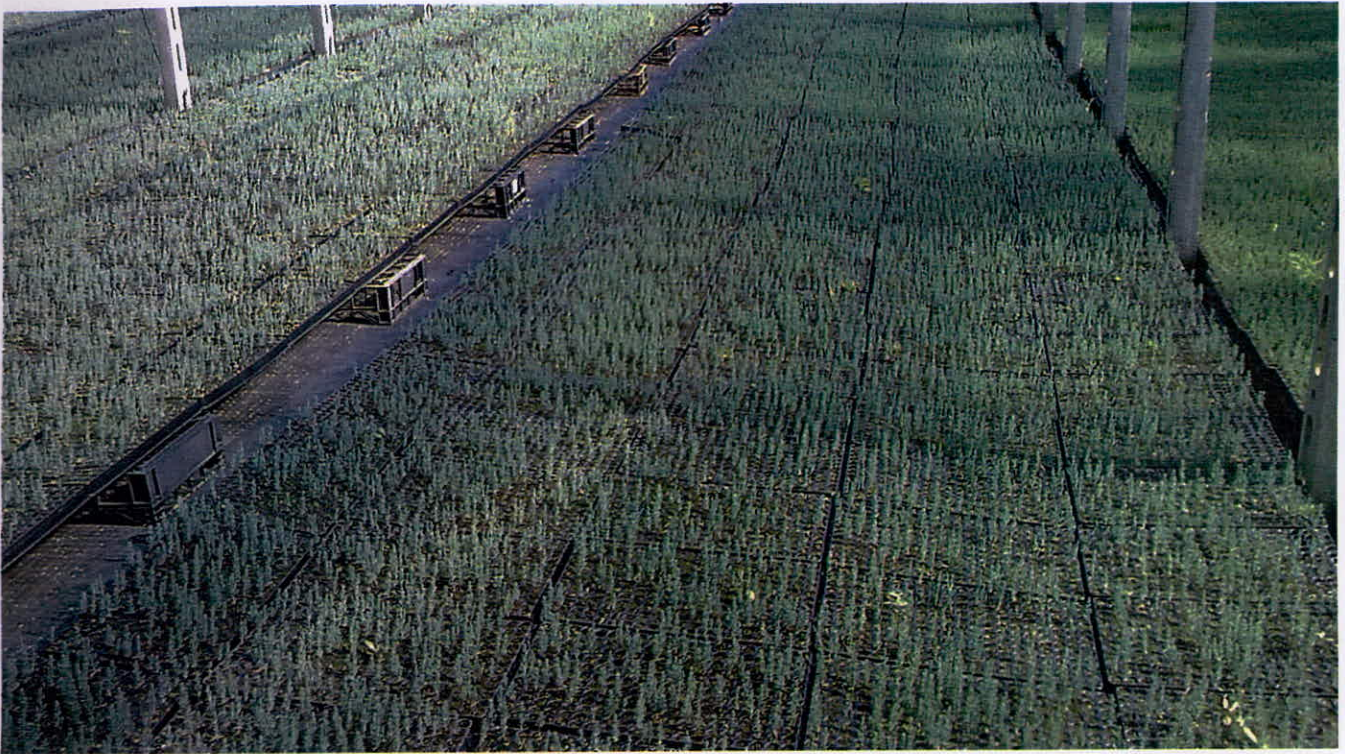


Fig. 3 - Piante di *Cupressus sempervirens* coltivate in serra.
Fig. 3 - *Cupressus sempervirens* plants grown in greenhouse.



Fig. 4 - Inoculazione di piante di *Camellia japonica* mediante sospensione conidica di *Trichoderma* spp.
Fig. 4 - Inoculation of *Camellia japonica* plants by a conidial suspension of *Trichoderma* spp.

particolare su *Limonium sinuatum*, il ceppo 2046 ha incrementato il numero di foglie del 21% e l'area fogliare del 27% rispetto al controllo non trattato. Mentre il ceppo 8227 ha incrementato l'area fogliare del 18% sempre rispetto alla tesi di controllo.

Su *Cupressus sempervirens* (fig. 5) il ceppo 2046 ha incrementato del 41% l'altezza delle piante, mentre l'8238 del 23%, confrontate con le rispettive piante di controllo non inoculate con *Trichoderma*.

L'isolato *T. asperellum* 2046 è stato di particolare interesse anche per *Camellia japonica*, poiché, quando addizionato al substrato di trapianto delle talee, oltre a garantire un incremento di alcuni parametri

agronomici delle piante come l'altezza (incremento del 63%) e il numero di foglie (incremento del 60%) (fig. 6), ha evidenziato degli effetti significativi anche su alcuni parametri fisiologici come la fotosintesi netta e l'efficienza di utilizzo dell'acqua, incrementandoli rispettivamente del 44% e 37%, rispetto alle tesi di controllo non trattate (Prisa *et al.*, 2013).

Dell'isolato in questione è stata valutata inoltre l'attività antagonistica, *in vitro* e *in vivo*, nei confronti di patogeni fungini di interesse per le specie vegetali oggetto di studio, mostrando reali capacità nel biocontrollo di funghi come *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotinia minor*. In *Limonium*, l'aggiunta di T2046 in presenza di *S. sclerotiorum* nel suolo ha consentito una emergenza delle plantule pari al 62% . mentre nel controllo inoculato con la sola *S. sclerotiorum* l'emergenza è stata pari a zero. La stessa cosa è avvenuta per *S. minor* dove T2046 ha quasi triplicato (dal 19 al 54%) la percentuale di emergenza delle plantule in confronto al controllo con la sola *Sclerotinia*. Il ceppo *T. asperellum* 2046 ha avuto effetti significativi anche su *R. solani*. In presenza di *R. solani* nel suolo, T2046 ha consentito una percentuale di emergenza quasi del 40%. Quando invece nel suolo era presente solo *R. solani* si è avuto un 21% di plantule di *Limonium* emerse.

I risultati delle prove hanno mostrato quindi, che i ceppi di *Trichoderma* selezionati, potrebbero rappre-



Fig. 5 - Effetto di *T. asperellum* T2046 sullo sviluppo della pianta di *Cupressus sempervirens* dopo due anni di coltivazione. T2046 a sinistra, Controllo a destra.

Fig. 5 - Effect of *T. asperellum* T2046 on plant growth in *Cupressus sempervirens* after two years of cultivation. T2046 on the left, Control on the right.

sentare, se opportunamente sviluppati, una valida alternativa ai fitofarmaci e ai concimi di sintesi, potendosi sostanzialmente come ingredienti attivi di nuovi prodotti fitosanitari a base biologica e/o biofertilizzanti da utilizzare come inoculo per substrati innovativi di piante ornamentali.

Conclusioni

Nel vivaismo floricolo e ornamentale da diversi anni ormai, si fa largo uso dell'allevamento in contenitore delle specie vegetali. Per questo tipo di coltivazioni è determinante ai fini della gestione idrica e nutritiva la scelta di un opportuno substrato colturale per le implicazioni tecniche, economiche e di eco-compatibilità che esso comporta. La scelta di un substrato è una delle fasi più importanti per un vivaista, non solo per l'incidenza che questo ha sul costo di produzione delle piantine, ma anche perché, se la scelta si rivela errata, può compromettere in partenza il raggiungimento di elevati e costanti standard qualitativi. La richiesta di materiali idonei alla costituzione dei substrati colturali necessari per tale tipo di coltivazione è aumentata negli ultimi anni ed è stata in gran parte soddisfatta attraverso l'utilizzo di torbe d'importazione, provenienti in genere dal nord o dall'est Europa. Per le sue caratteristiche (omogeneità, elevata capacità di assorbimento dell'acqua, buona aereazione, stabilità strutturale, pH ~ 3) la torba di sfagno rappresenta il materiale di partenza più frequentemente utilizzato per la produzione di substrati (D'Angelo et al., 1992).



Fig. 6 - Effetto di *T. asperellum* T2046 sullo sviluppo della pianta di *Camellia japonica* dopo due anni di coltivazione. T2046 a sinistra e Controllo a destra.

Fig. 6 - Effect of *T. asperellum* T2046 on plant growth in *Camellia japonica* after two years of cultivation. T2046 on the left and Control on the right.

La scelta di un buon substrato non solo è importante per raggiungere buoni standard qualitativi, ma anche per sfruttare appieno impianti di irrigazione e fertilizzazione, riducendo così l'incidenza dei costi. L'utilizzo della torba in vivaismo, negli ultimi anni ha avuto una considerevole impennata dei prezzi dovuti all'incremento dei costi energetici, che coincidono su tutto il processo produttivo, a partire dalla raccolta alla lavorazione e trasporto agli stabilimenti, dalla preparazione e classificazione, alla miscelazione dei prodotti, al trasporto e importazione verso gli utilizzatori finali. Un altro problema è rappresentato dalla non rinnovabilità, per cui non solo si pongono problematiche economiche ma anche ecologiche riguardanti la salvaguardia delle torbiere. D'altra parte, l'enorme quantità di materiali organici compostati di origine vegetale (compost verde) o mista (compost misto, derivato dal compostaggio di residui solidi urbani) disponibili a basso costo, ma con limitato mercato a causa delle non sempre sufficienti caratteristiche chimico-fisiche e della incostanza delle stesse suggerisce l'opportunità di un loro reimpiego in substrati per l'ortofloro-vivaismo.

Al fine di giungere alla possibile sostituzione totale o parziale delle torbe sono state oggetto di attenzione numerose materie prime. La ricerca si è spesso indirizzata verso l'impiego, insieme a materiali organici (compost e fibra di cocco, tanto per citare i più conosciuti) con buone caratteristiche fisico-chimiche, di prodotti di natura artificiale (spesso di recupero, come polistirolo, schiume di poliuretano, pellets di pneumatici esausti, ossa bovine frantumate, ecc.) che

presentano forti limitazioni all'uso e sui quali la bibliografia si esprime spesso in modo discordante. Tra i materiali più studiati, il compost rappresenta sicuramente uno dei substrati organici che potrebbero sostituire la torba.

Nelle colture florovivaistiche, soprattutto se in vaso ove il volume di substrato in cui la pianta trascorre il suo intero ciclo colturale è estremamente ridotto, risulta dunque indispensabile approfondire la conoscenza delle caratteristiche fisico-chimiche del prodotto di sostituzione della torba che si intende introdurre in azienda al fine di valutarne correttamente l'effettiva possibilità di utilizzo, stabilirne la percentuale nella miscela e adeguare la tecnica di coltivazione in modo da ottimizzare le performance produttive. Inoltre, il compost utilizzato deve rispettare alcune caratteristiche e condizioni tali da non compromettere la sanità delle colture, quali l'assenza di fitotossicità e di semi vitali e la ridotta presenza di metalli pesanti. Da alcuni anni, centri di ricerca come la fondazione Minoprio e il Ce.Spe.Vi. di Pistoia effettuano ricerche su diversi materiali che sembrano suscitare maggiore interesse sono la fibra di cocco, i materiali ligno-cellulosici preparati con gli scarti dell'industria del legno ed i compost di qualità. (Progetto PROBIORN, "Produzione biologica di piante ornamentali"; www.cespevi.it/probiorn). Anche nell'ambito di un progetto finanziato dal MIPAAF (SUBARTIFLOR: "Messa a punto di substrati artificiali innovativi per il florovivaismo"), l'obiettivo è stato quello di individuare delle possibili miscele di substrati innovativi, alternativi alla torba, che ne possano sostituire o almeno ridurre in parte l'utilizzo. Questi substrati sono stati inoltre addizionati di funghi benefici, in particolare *Trichoderma* spp., che potrebbero fornire un valore aggiunto, soprattutto per quanto riguarda la difesa e la biostimolazione delle piante ornamentali.

Le prime applicazioni pratiche di mezzi biologici in agricoltura sono state realizzate in coltura protetta, in particolare nel settore orto-floricolo. In questa situazione, gli antagonisti riescono a trovare le situazioni idonee per insediarsi e svolgere la loro attività, rispetto al pieno campo, fornendo un importante contributo nella difesa da patogeni tellurici (Vannacci e Gullino, 2000).

Questi microrganismi benefici applicati a substrati alternativi possono e potranno assumere sicuramente una maggiore importanza se considerati in strategie di difesa integrata. Un ruolo importante in questo ambito lo giocheranno gli aspetti più squisitamente industriali, quali il miglioramento delle tecniche di produzione e formulazione degli antagonisti; infatti il disporre di mezzi efficaci, facili da utilizzare e con una shelf-life

accettabile, potrebbe favorire la scelta di mezzi alternativi da parte di molti operatori agricoli.

Il possibile utilizzo di mezzi biologici da applicare nella difesa delle specie vegetali, con quello di substrati alternativi che possano sostituire o quantomeno ridurre parzialmente l'impiego delle torbe, potrebbe rappresentare un punto di svolta per porre un freno a quei problemi di tipo ambientale, ecologico, economico e normativo che oggi, e sempre più nelle prossimi futuro, rivestono grande importanza nel settore dell'orto-florovivaismo.

Riassunto

Al genere *Trichoderma* appartengono funghi frequentemente presenti nella rizosfera dove, attraverso complessi meccanismi d'azione, possono limitare la crescita di funghi patogeni contenendo lo sviluppo di malattie e instaurare associazioni mutualistiche con le piante. La colonizzazione dell'apparato radicale da parte di questi funghi si traduce spesso in un incremento della crescita, sviluppo e produttività delle piante e/o nell'induzione di resistenza nei confronti di stress biotici o abiotici. L'utilizzo della torba, che rappresenta il materiale più diffuso nei substrati comunemente utilizzati nell'orto-floro-vivaismo, attualmente è ostacolato da vincoli ambientali ed economici. In quest'ottica, la necessità di ridurre il suo quantitativo nei substrati di coltivazione riveste grande attenzione. Lo scopo di questa review è quello di evidenziare la reale efficacia e i possibili impieghi di *Trichoderma* come ingrediente attivo di nuovi prodotti per la difesa a base biologica, di substrati alternativi alla torba e/o di biofertilizzanti utilizzabili nell'ortoflorovivaismo,

Parole chiave: Endofitismo, *Camellia*, *Limonium*, *Cupressus*, biocontrollo.

Dedica

Dedicato a Maurizio Forti, in ricordo dell'entusiasmo, della disponibilità e della competenza con cui ha contribuito alle ricerche del laboratorio di micologia fitopatologica del DISAAA

Ricerche condotte nell'ambito del progetto "SUBARTIFLOR: messa a punto di substrati artificiali innovativo per il florovivaismo" finanziato dal MIPAAF

Bibliografia

AMOROSO G., FRANGI P., BERETTA D., TANTARDINI A., 2006. *Metodi alternativi alla chimica contro rizoctonia in poinsettia*. *Culture Protette*, 35 (2): 88-91.

- ARMSTRONG H., 2004. *No response to bio-alternative for peat*. FlowerTech, 7:24-25.
- BENUZZI M., MINUTO A., GULLINO M.L., 2004. *Ruolo dei mezzi biologici nella difesa dei patogeni tellurici*. Workshop Internazionale "La Produzione in Serra dopo l'Era del Bromuro di Metile" Comiso, 1-3 Aprile.
- CARON J., ROCHEFORT L., 2013. *Use of peat in growing media: State of the art on industrial and scientific efforts envisioning sustainability*. Acta Hort., 982:15-22.
- CATALANO V., VERGARA M., HAUZENBERGER J.R., SEIBOTH B., SARROCCO S., VANNACCI G., KUBICEK C.P., SEIDL-SEIBOTH V., 2011. *Use of a non-homologous end-joining-deficient strain (delta-ku70) of the biocontrol fungus Trichoderma virens to investigate the function of the laccase gene lcc1 in sclerotia degradation*. Current Genetics, 57: 13-23.
- CHEN B., WANG M., HU Y., LIN Z., YU R., HUANG L., 2011. *Preliminary study on promoting effects of endophytic fungi to growth Rehmannia glutinosa*. Zhongguo Zhongyao Zazhi, 36: 1137-1140.
- CORRÊA E.B., BETTIOL W., MORANDI M.A.B., 2010. *Biological control of Pythium aphanidermatum root rot and growth promotion of hydroponic lettuce by Clonostachys rosea*. Tropical Plant Pathology, 35: 248-252.
- D'ANGELO G., CASTELNUOVO M., GALLI A., VALAGUSSA M., 1992. *Relations between physical and chemical properties of the substrate and growth of some pot ornamentals*. Acta Hort., 342: 313-324.
- ELLIOTT G.C., ELMER W.H., 2003. *Evaluation of microbial inoculants for control of Rhizoctonia root and crown rot of vinca*, 2002. Biol. Cult. Tests Control Plant Dis. Rep., 18:O015. www.apsnet.org/online/BCTests/Vol18/sections/ornamentals/trees.htm.
- FISHER P.J., PETRINI O., 1987. *Location of fungal endophytes in tissues of Suaeda fruticosa: a preliminary study*. Trans Br Mycol Soc 89:246-249. doi:10.1016/S0007-1536(87).
- GASONI L., STEGMAN DE GURFINKEL B., 2009. *Biocontrol of Rhizoctonia solani by the endophytic fungus Cladhorrinum foecundissimum in cotton plants*. Australas. Plant Path., 38: 389-391.
- GERLAGH M., AMSING J.J., MOLHOEK W.M.L., BOSKER-VAN ZESSEN A.I., LOMBAERS-VAN, 2005. *The effect of treatment with Ulocladium atrumon Botrytis cinerea attack of geranium (Pelargonium zonale) stock plants and cuttings*. Eur. J. Plant Pathol., 107: 377-386.
- HAMAYUN M., AFZAL KHAN S., AHMAD N., TANG D.-S., KANG S.-M., NA C.-I., SOHN E.-Y., HWANG Y.-H., SHIN D.-H., LEE B.-H., KIM J.-G., LEE I.-J., 2009. *Cladosporium sphaerospermum as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of Glycine max (L.) Merr.* World J. Microbiol. Biotechnol., 25: 627-632.
- HAMAYUN M., KHAN S.A., KHAN A.L., AFZAL M., LEE I.-J., 2012. *Endophytic Cephalotecha sulfurea AGH07 reprograms soybean to higher growth*. J. Plant Interactions, 7:301-306.
- HARMAN G.E., KUBICEK C.P., 1998. *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London, 278.
- HARMAN G.E., HERRERA-ESTRELLA A.H., HORWITZ B.A., LORITO M., 2012. *Special issue: Trichoderma - from basic biology to biotechnology*. Microbiology, 158:1-2.
- HOHMANN P., JONES E.E., HILL R.A., STEWART A., 2011. *Understanding Trichoderma in the root system of Pinus radiata: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings*. Fungal Biol, 115: 759-767.
- HU X., WEBSTER G., XIE L., YU C., LI Y., LIAO X., 2013. *A new mycoparasite, Aspergillus sp. ASP-4, parasitizes the sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum*. Crop protection, 54:15-22.
- JÄSCHKE D., DUGASSA-GOBENA D., KARLOVSKY P., VIDAL S., LUDWIG-MÜLLER J., 2010. *Suppression of clubroot (Plasmodiophora brassicae) development in Arabidopsis thaliana by the endophytic fungus Acremonium alternatum*. Plant pathology, 59:100-111.
- KHAN A.L., HAMAYUN M., AHMAD N., WAQAS M., KANG S.-M., KIM Y.-H., LEE I.-J., 2011a. *Exophiala sp. LHL08 reprograms Cucumis sativus to higher growth under abiotic stresses*. Physiologia plantarum, 143: 329-343.
- KHAN A.L., HAMAYUN M., KIM Y.H., KANG S.-M., LEE J.H., LEE I.J., 2011b. *Gibberellins producing endophytic Aspergillus fumigatus sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress*. Process Biochemistry, 46:440-447.
- KHAN S.A., HAMAYUN M., YOON H., KIM H.Y., SUH S.J., HWANG S.K., KIM J.M., LEE I.J., CHOO Y.-S., YOON U.H., KONG W.S., LEE B.M., KIM J.G., 2013. *Plant growth promotion and Penicillium citrinum*. BMC Microbiology, 8: 231.
- KOHL J., GERLAGH M., DE HAAS B.H., KRUGER M.C., 1998. *Biological control of Botrytis cinerea in cyclamen with Ulocladium atrum and Gliocladium roseum under commercial growing conditions*. Phytopathology, 88: 568-75.
- KOSANOVIC D., POTOCNIK I., DUDUK B., VUKOJEVIC J., STAJIC M., REKANOVIC E., MILIJASEVIC-MARCIC S., 2013. *Trichoderma species on Agaricus bisporus farms in Serbia and their biocontrol*. Annals of Applied Biology., 163 (2): 218-230.
- KUSARI P., KUSARI S., SPITELLER M., KAYSER O., 2013. *Endophytic fungi harbored in Cannabis sativa L.: Diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens*. Fungal Diversity, 60:137-151.
- MAHER M., PRASAD M., RAVIV M., 2008. *Organic soilless media components*. Soilless Culture: Theory and Practice: 459-504.
- MOLLER K., JENSEN B., PALUDAN ANDERSEN H., STRYHN, H. HOCKENHULL, J., 2003. *Biocontrol of Phytium tracheiphilum in chinese cabbage by clonostachys rosea under field conditions*. Biocontrol Science and Technology, 13:171-182.
- OJHA S., CHATTERJEE N., 2012. *Induction of resistance in tomato plants against fusarium oxysporum f. sp. lycopersici mediated through salicylic acid and trichoderma harzianum*. Journal of Plant Protection Research., 52(2):220-225.
- PACIFICI S., CACINI S., BURCHI G., GRASSOTTI A., 2013. *Physiological quality of nursery plants for urban design and overcoming transplanting stress in Rosa "Knock Out"*. Acta Hort., 990: 203-210.
- PERELLI M., 2007. *Luci ed ombre della normativa sui substrati*. Atti del Convegno "I Substrati di Coltivazione" Flormart di Padova.
- PETRINI O., CARROLL G.C., 1981. *Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon*. Can. J. Bot., 59: 629-636.
- PETRINI O., SIEBER T., TOTI L., VIRET O., 1993. *Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi*. Natural Toxins, 1(3): 185-196.
- PEROTTO S., ANGELINI P., BIANCIOTTO V., BONFANTE P., GIRLANDA M., KULL T., MELLO A., PECORARO L., PERIN C., PERSIANI A.M., SAITTA A., SARROCCO S., VANNACCI G., VENANZONI R., VENTURELLA G., SELOSSE M.A., 2013. *Interactions of fungi with other organisms*. Plant Biosystems, 147: 208-218.
- POLIZZI G., VITALE A., 2002. *Biocontrol of Cyllindrocladium root and collar rot of myrtle-leaf milkwort by Trichoderma harzianum strain T-22*. See Ref. 17, Rep. 17:O14.
- PRISA D., SARROCCO S., FORTI M., BURCHI G., VANNACCI G., 2013. *Endophytic ability of Trichoderma spp. as inoculants for ornamental plants innovative substrates*. In: *Biocontrol of plant pathogens in sustainable agriculture*. IOCB/wprs Bulletin, 01/2013; 86:169-174.
- SARROCCO S., FORTI M., VANNACCI G., 2004. *Mycoparasitism against sclerotia of Sclerotium rolfsii and Sclerotinia sclerotiorum is widespread within the genus Trichoderma*. In: *Management of plant diseases and arthropod pests by BCAs and their integration in agricultural systems*. IOCB/wprs Bulletin, 27(8):377-380.

- SARROCCO S., MIKKELSEN L., VERGARA M., JENSEN D.F., LÜBECK M., VANNACCI G., 2006. *Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed Trichoderma virens antagonistic strain*. Mycological Research, 110:179-187.
- SARROCCO S., GAMBINERI F., MAGNESCHI L., VALENTINI G., VANNACCI G., 2008. *Growth evaluation of an antagonistic Trichoderma virens isolate using a respirometric apparatus*. J. Gen. Appl. Microbiol., 54:311-315.
- SARROCCO S., GUIDI L., FAMBRINI S., DEGL'INNOCENTI E., VANNACCI G., 2009. *Competition for cellulose exploitation between Rhizoctonia solani and two Trichoderma isolates in the decomposition of wheat straw*. J. Plant Pathol., 91: 331-338.
- SARROCCO S., MATARESE F., MONCINI L., PACHETTI G., RITIENI A., MORETTI A., VANNACCI G., 2013a. *Biocontrol of Fusarium head blight by spike application of Trichoderma Gamsii*. J. Plant Pathol., 1: 19-27.
- SARROCCO S., MONCINI L., PACHETTI G., VANNACCI G., 2013b. *Trichoderma harzianum 6776, a promising biocontrol agent and plant growth promoter*. In: *Biocontrol of plant pathogens in sustainable agriculture*. IOCB/wprs Bulletin, 01/2013; 86: 189-194.
- SCHULZ S., DICKSCHAT J., 2007. *Bacterial volatiles: the smell of small organisms*. Natural product reports, 24: 814-842.
- SIEBER T.N., RYS J., HOLDENRIEDER O., 1999. *Mycobiota in symptomless needles of Pinus mugo ssp. uncinata*. Mycological Research, 103: 306-310.
- SRIVASTAVA P.K., SHENOY B.D., GUPTA M., VAISH A., MANNAN S., SINGH N., TEWARI S.K., TRIPATHI R.D., 2012. *Stimulatory effects of arsenic-tolerant soil fungi on plant growth promotion and soil properties*. Microbes and Environments, 27: 477-482.
- STINSON A.M., ZIDACK N.K., STROBEL G.A., JACOBSEN B.J., 2003. *Mycofumigation with Muscodor albus and Muscodor roseus for control of seedling diseases of sugar beet and Verticillium wilt of eggplant*. Plant Disease, 87:1349-1354.
- SUWANNARACH N., KUMLA J., BUSSABAN B., LUMYONG S., 2012. *Biocontrol of Rhizoctonia solani AG-2, the causal agent of damping-off by Muscodor cinnamomi CMU-Cib 461*. World J. Microbiol. Biotechnol., 28: 3171-3177.
- SUWANNARACH N., KUMLA J., BUSSABAN B., NUANGMEK W., MATSUI K., LUMYONG S., 2013. *Biofumigation with the endophytic fungus Nodulisporium spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit*. Crop protection, 45: 63-70.
- UNNIKUMAR K.R., SREE K.S., VARMA A., 2013. *Piriformospora indica: a versatile root endophytic symbiont*. Symbiosis, 60: 107-113.
- VANNACCI G., GULLINO M.L., 2000. *Use of biocontrol agents against soil-borne pathogens: Results and limitations*. Acta Hort., 532: 79-87.
- VANNACCI G., SARROCCO S., PECCHIA S., VERGARA M., 2008. *Innovazioni nella difesa delle colture con mezzi a basso impatto ambientale: malattie da funghi*. I Georgofili, Quaderno VII, 27 - 54.
- VENUS Y., OELMÜLLER R., 2013. *Arabidopsis ROP1 and ROP6 influence germination time, root morphology, the formation of F-actin bundles, and symbiotic fungal interaction*. Molecular plant, 6: 872-886.
- VINALE F., SIVASITHAMPARAM K., GHISALBERTI E.L., MARRA R., WOO, S.L. LORITO M., 2008. *Trichoderma-plant-pathogen interactions*. Soil Biology and Biochemistry, 40: 1-10.
- WANG Y., DAI C.C., CAO J.L., XU D.S., 2012a. *Comparison of the effects of fungal endophyte Gilmaniella sp. and its elicitor on Atractylodes lancea plantlets*. World J. Microbiol. Biotechnol., 28: 575-584.
- WANG Y., WU X., ZHU Y., ZHANG M., WANG S., YANG X., 2012b. *Inhibition effects and mechanisms of the endophytic fungus Chaetomium globosum L18 from Curcuma wenyujin*. Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica., 32: 2040-2046.
- WICK R.L., NUSSENBAUM T., 2000. *Evaluation of disease-suppressive growing media and biological control agents for control of Pythium root rot of geranium*, 1999. Biol. Cult. Tests Control Plant Dis., 15:68.
- YEDIDIA I., BENHAMOU N., CHET I., 1999. *Induction of defense responses in cucumber plants (Cucumis sativus L.) by the biocontrol agent Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol., 65:1061-1070.
- YOHALEM D.S., KRISTENSEN K., 2004. *Optimization of timing and frequency of application of the antagonist Ulocladium atrum for management of gray mold in potted rose under high disease pressure*. Biol. Control, 29: 256-259.
- ZHANG J.H., TIAN G.M., ZHOU G.D., HE M.M., WANG F., YAO J.H., 2013. *Evaluation of organic solid wastes composts as peat substitutes for seedling production*. J. Plant production, 36: 1780-1794.
- ZORZI G., 1997. *Nuovi parametri per il compost*. Supplemento all'Informatore Agrario. 44:5.