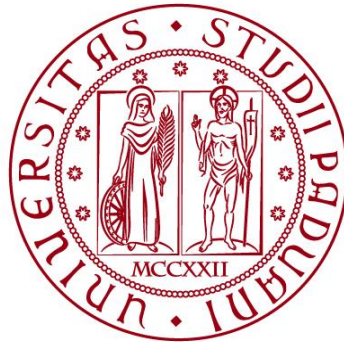


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Panoramica sull'effetto fitoterapico degli
analoghi del peptide tricogina GA IV su agenti
patogeni ad alto impatto sulle colture agricole**

Tutor: Prof.ssa Marta De Zotti

Dipartimento di Biologia

Laureando: Andrea Filippas

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1	Abstract.....	3
2	Introduzione	4
2.1	<i>Problema dei fitopatogeni nelle colture agricole</i>	4
2.2	<i>Funghi come principale patogeno</i>	4
3	Soluzioni eco-sostenibili.....	7
3.1	<i>Peptaiboli e tricogina GA IV</i>	7
3.1.1	<i>Effetti degli analoghi di tricogina GA IV sul fungo Pyricularia oryzae</i>	9
3.1.2	<i>Effetti degli analoghi di tricogina GA IV sulle piante di pomodoro infettate da Botrytis cinerea</i>	12
4	Conclusioni e soluzioni future	16
5	Bibliografia	17

1 Abstract

In questa tesi si descrivono i grossi problemi creati dai funghi nelle colture agricole e delle nuove soluzioni ecosostenibili per trattarli. In particolare, si discutono gli effetti causati da *Botrytis cinerea* nelle colture di pomodoro e di *Pyricularia oryzae* in quelle di riso. Questi due funghi causano ingenti danni nelle colture e senza l'uso di fungicidi il raccolto annuo sarebbe quasi dimezzato, cosa che al giorno d'oggi, con la popolazione in crescente aumento non possiamo permetterci. Difatti i fungicidi sono prodotti largamente usati dalle industrie agricole, il problema però è la loro poca sostenibilità in termini ambientali. Tutti i pesticidi finora in commercio sono di natura chimica, quindi, una volta disciolti nel terreno, portano alla formazione di sostanze tossiche ed inquinanti. Anche la loro sintesi è dispendiosa in termini di energia e di prodotti chimici usati e di scarto, rendendo anche questo passaggio poco sostenibile a lungo termine. In questa tesi si parla della tricogina GA IV, un peptaibolico prodotto dal fungo *Trichoderma*, e dei suoi analoghi idrosolubili. La tricogina è un metabolita secondario antimicrobico, e possiede una struttura tridimensionale elicoidale. La sua particolare struttura è conservata negli analoghi e li rende in grado di inibire la crescita fungina ed alterare la loro espressione genetica. Gli analoghi della tricogina GA IV sono stabili e prodotti con processi ecosostenibili creando meno scarti possibili. I passaggi di sintesi degli analoghi e la loro successiva dispersione nel terreno non causano quindi danni ambientali ma sono una soluzione innovata e l'inizio di una nuova classe di prodotti biocompatibili per la protezione delle colture e del terreno agricolo.

2 Introduzione

2.1 Problema dei fitopatogeni nelle colture agricole

I funghi sono tra i principali patogeni delle piante, causando consistenti danni alle colture, sia a livello del piccolo contadino ed il suo campo, che a livello delle grandi aziende agrarie con molti ettari di terreno per le coltivazioni industriali. Questi fito-patogeni portano ad ingenti perdite a livello di resa colturale mondiale ogni anno, creando quindi un grande problema per gli agricoltori e di conseguenza per tutta la popolazione [Savary 2019]. Nel XXI secolo abbiamo vissuto un incremento importante della popolazione, che ha portato ad un aumento della richiesta di cibo e quindi di prodotti agrari di quasi il doppio rispetto agli anni precedenti, portando questo problema tra i principali per poter soddisfare il fabbisogno mondiale. Al momento, si usano pesticidi per ovviare a questo problema, i quali, però, se usati per lunghi periodi di tempo, portano alla formazione di composti tossici nel suolo inquinando così i terreni di coltura e il medio-ambiente. In questa Tesi parlerò di alcuni metodi eco-sostenibili e naturali per la difesa fito-terapica delle piante di interesse agrario, in particolare del riso e del pomodoro, due alimenti alla base dell'alimentazione della popolazione mondiale [Silveira D'Ávila 2022].

2.2 Funghi come principale patogeno

I patogeni trattati in questa tesi saranno *Pyricularia oryzae* (Figura 1), un fungo del riso e *Botrytis cinerea* (Figura 3), sempre un fungo ma che infetta i pomodori, questi non attaccano solo le colture precedentemente nominate ma sono abbastanza ubiquitari. Solo questi portano ad una perdita di circa un 30% delle rispettive colture, a livello globale.

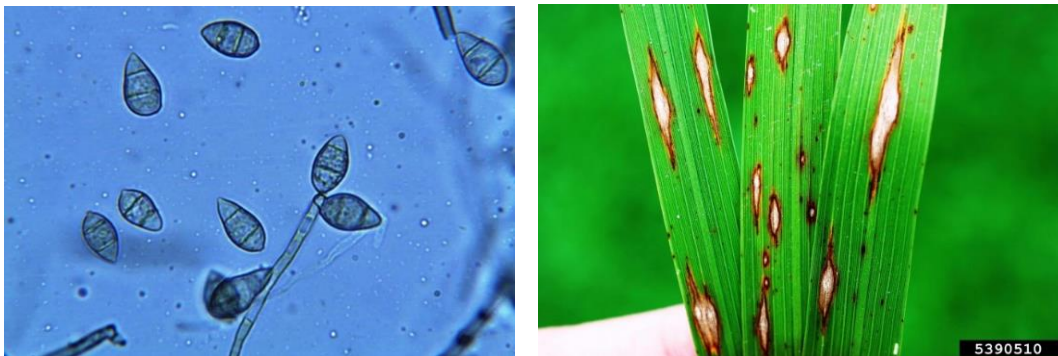


Figura 1 e 2: Fungo *Pyricularia oryzae* ed il suo effetto necrotico sulle piante di riso

Figura 1 presa da: <https://species.wikimedia.org>

Figura 2 presa da: <https://www.dpi.nsw.gov.au>

Pyricularia oryzae può attaccare le piante di riso in qualsiasi suo stadio di sviluppo provocando danni a foglie, steli o nodi. L'infezione ha inizio con l'attacco dei conidi sulla superficie idrofobica della foglia e con la presenza di acqua, molto presente nelle colture di riso, si ha la germinazione del fungo in poche ore. Questo procederà nella sua infezione sintetizzando un numero esorbitante di molecole di glicerolo, producendo quindi un'enorme pressione di turgore, la quale permette di rompere la cuticola e penetrare negli strati cellulari più interni. Dopo solo 96 ore dalla penetrazione passa già all'ultima fase dell'infezione, quella necrotica, dove si vedono i primi sintomi della presenza dell'infezione da parte di *Pyricularia oryzae*, cioè la necrotizzazione progressiva e sempre più ampia delle parti infettate ed a contatto con il fungo (Figura 2).



Figura 3 e 4: Fungo *Botrytis cinerea* ed il suo effetto necrotico sulle piante di pomodoro

Figura 3 presa da: <https://www.bioges.it>

Figura 4 presa da: <http://ephytia.inra.fr/it/D/336>

Botrytis cinerea è un altro fungo comune nelle infezioni delle piante, con un meccanismo simile al precedente. In presenza di luce cresce, fino a formare delle strutture specializzate chiamate conidi (Figura 3), questi una volta cresciuti verranno trasportati dal vento fino a raggiungere le colture. Una volta entrato nella pianta inizia l'infezione vera e propria, la quale produce, nel suo step finale, zone necrotiche che possono portare anche alla morte della pianta stessa (Figura 4).

3 Soluzioni eco-sostenibili

Come visto nell'introduzione questi funghi causano danni evidenti e massicci dimostrando la nostra dipendenza dai fungicidi, i quali, fino ad ora, sono prodotti sintetici, quindi, una volta disciolti, vanno a finire nel terreno agricolo inquinandolo e portando alla produzione di prodotti tossici. Questo ha portato all'aumento della ricerca, da parte delle industrie agricole e delle università, di soluzioni alternative ecologiche e naturali. Non tutti i funghi sono però patogeni delle piante o dannosi per loro. Molti anzi vivono in simbiosi con esse aiutandole a difendersi dai fitopatogeni secernendo sostanze che sfavoriscono la crescita di questi.

3.1 Peptaiboli e *Trichoderma GA IV*

Un'alternativa sostenibile valida contro questi funghi sono i peptaibolici, peptidi da 5-20 residui con una struttura ad elica anfipatica. Questi sono sintetizzati da alcuni funghi, in particolare il maggior produttore di peptaibolici è la specie *Trichoderma*, che li sintetizza per via non ribosomiale. Essi contengono amminoacidi non convenzionali nella loro catena. Questi particolari peptidi sono promettenti in quanto, essendo naturali, quando vanno incontro a degradazione producono composti non tossici per l'ambiente, salvaguardando il terreno agricolo, inoltre la presenza di amminoacidi non codificanti li rende più persistenti rispetto ai peptidi formati da tutti amminoacidi proteogenici. I peptaibolici hanno due caratteristiche peculiari che li distinguono dai peptidi canonici e gli conferiscono il loro particolare nome. La prima di queste è la presenza di diversi residui naturali non codificati di Aib (acido α -amminoisobutirrico) e la seconda è un residuo 2-amminoalcolico in C-terminale. I residui di Aib conferiscono alla molecola una grande resistenza ai tagli proteolitici da parte degli enzimi, oltre ad essere ottimi induttori di eliche.

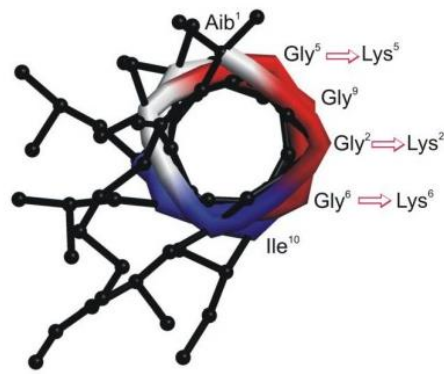


Figura 5: struttura del peptaibolico tricogina GA IV e indicazione delle sostituzioni fatte

Preso da: <https://doi.org/10.3390/ijms21207521>

La presenza di Aib conferisce una stabilità eccezionale all'elica, che permette ai peptaibolici di resistere a pH estremi e temperature molto alte. Inoltre, è questa stabile struttura ad elica (Figura 5) a conferire alla molecola la possibilità di interagire con le membrane fosfolipidiche dei fitopatogeni, portandoli anche alla morte. Queste molecole naturali, oltre ai grandi vantaggi fin ora descritti, presentano anche delle complicazioni. La prima di queste è la difficoltà di riprodurre *in vitro* le condizioni ambientali e biotiche che porterebbero il fungo alla produzione di tali metaboliti. Anche la purificazione è complicata in quanto questi peptaibolici vengono secreti in miscele microeterogenee di metaboliti secondari, rendendo difficile il loro utilizzo e alzando i costi di lavorazione. Tuttavia, il problema più grande, una volta superati i precedenti due, è la loro scarsa solubilità in acqua, data dalla presenza di pochi residui polari nella catena e mostrando inefficienza nella distribuzione, quindi nella difesa delle piante e limitando il loro potenziale utilizzo nell'agricoltura moderna. Questo ha portato allo studio e alla produzione di analoghi idrosolubili (Tabella 1). Come possiamo notare nella Figura 5 e anche nella Tabella 1, le principali sostituzioni sono di residui di glicina (Gly) per residui di lisina (Lys). Queste sostituzioni portano gli analoghi ad avere un'elica più stabile, poiché Lys è un amminoacido più strutturante di Gly e a renderli idrosolubili, visto che Lys è un residuo basico, così da agevolare la loro distribuzione spruzzabili sulle piante in soluzioni acquose, rendendo possibile il loro utilizzo per il trattamento delle colture agricole [De Zotti 2020].

Trichogin GA IV	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 2 (K2)	nOct-Aib- Lys -Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 2Rink (K2)	nOct-Aib- Lys -Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-NH2
Pep 3 (K5)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib- Lys -Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 4 (K56)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib- Lys-Lys -Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 4Rink (K56)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib- Lys-Lys -Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-NH2
Pep 4C (K56)	nOct-Aib- Lys-Lys -Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 4C1 (K56)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib- Lys-Lys -Leu- Leu -NH2
Pep 4C2 (K56)	nOct-Aib- Lys-Lys -Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-NH2
Pep 5 (K259G6)	nOct-Aib- Lys -Leu-Aib- Lys -Gly-Leu-Aib- Lys -Ile-Lol
Pep 6 (K5U6)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib- Lys-Aib -Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 7 (K26)	nOct-Aib- Lys -Leu-Aib-Gly- Lys -Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 8 (ApiC)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu- Api -Gly-Ile-Lol
Pep 12 (HPA3NT3)	H-Phe- Lys -Arg-Aib- Lys-Lys -Aib-Phe- Lys-Lys -Aib-Trp-Asn-Trp- Lys -NH2
Pep 19	Palmitoyl-His-Ala-Ala-His- Lys (e-Ser)-Gly-COOH
Pep 22 (K6)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly- Lys -Leu-Aib-Gly-Ile-Lol
Pep 22Rink (K6)	nOct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly- Lys -Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-NH2

Tabella 1: analoghi del peptaibolo Trichogina GA IV e sostituzioni amminoacidiche

Presa da: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753202>

La tricogina GA IV è un lipo-peptaibolico, il suo carattere lipidico è dato da una catena acilica lipofila in N-terminale. Ha dimostrato una buona attività antimicrobica ed una struttura ad elica ben sviluppata e stabile. Questo è un peptaibolico da undici residui, con elica debolmente anfipatica prodotto da *T. longibrachiatum* (Figura 5). Tutti i passaggi di purificazione e sintesi degli analoghi sono stati eseguiti con tecniche e solventi eco-sostenibili, la strategia usata riduce l'impatto ambientale ed i costi di sintesi del 70%, rendendo il loro utilizzo ancora meno dannoso per l'ambiente.

3.1.1 Effetti degli analoghi di tricogina GA IV sul fungo *Pyricularia oryzae*

Nelle prove *in vitro* sono stati testati sedici diversi analoghi (Tabella 1) contro il fungo *P. oryzae* e, dopo 96 ore di incubazione, si è potuto notare che sette (Pep 2, 2Rink, 4, 4Rink, 4C, 5 and 22Rink) hanno inibito la crescita fungina del 90% o più (Figura 6). Questi peptidi mostrano una riduzione dell'area necrotica fino ad un 95% rispetto alle foglie non trattate. È stata testata anche la tricogina per verificare la sua attività antifungina, ma si è rivelata totalmente inefficace (dati non mostrati), dimostrando l'utilità di creare analoghi idrosolubili [Sella 2021].

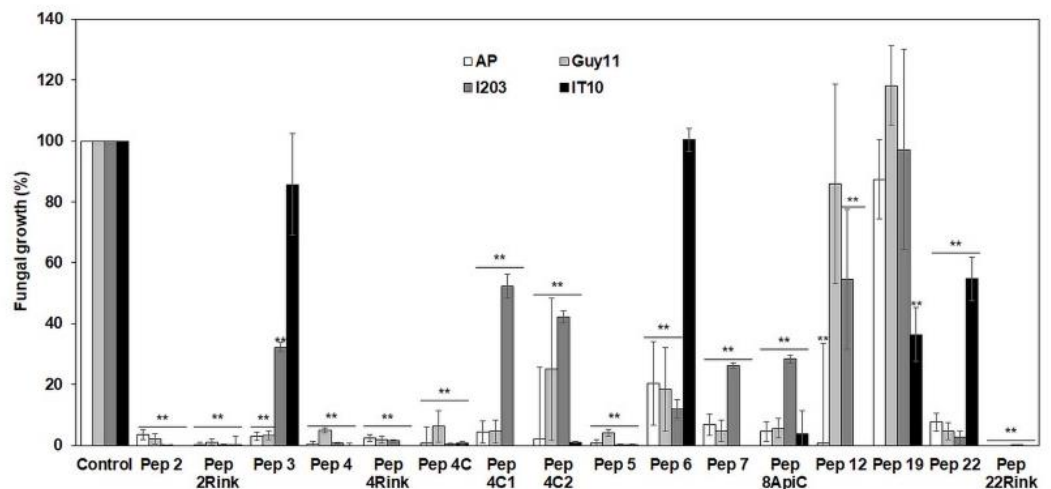


Figura 6: Percentuale di crescita di *P. oryzae* dopo 96h di incubazione in presenza dei vari analoghi di Trichogina GA IV comparato con il controllo non trattato

Preso da: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753202>

È quindi evidente che gli analoghi della trocogina GA IV hanno un effetto dannoso su *P. oryzae*, il che ha portato a guardare da vicino l'effetto di questi sul fungo (Figura 7). Grazie alla microscopia ottica sono stati osservati i cambiamenti morfologici indotti dai peptidi dopo il trattamento delle foglie. Le spore trattate infatti mostrano un'agglutinazione citoplasmatica (Figura 7b), probabilmente dovuta ad una perdita di liquido intracellulare. Invece, se i conidi germinano, presentano un'ifa danneggiata e non funzionale o addirittura non la presentano (Figura 7d). Mentre nelle spore non trattate, come previsto, non si nota alcun cambiamento citoplasmatico (Figura 7a), né tantomeno nell'ifa una volta germinati i conidi (Figura 7c). Se sottoposti a microscopia fluorescente, infatti, i campioni trattati con i peptaibolici mostrano auto-fluorescenza, sintomo della loro morte. La loro efficienza è dimostrata anche dal fatto che i campioni non trattati non presentano auto-fluorescenza e quindi vitalità (dati non mostrati).

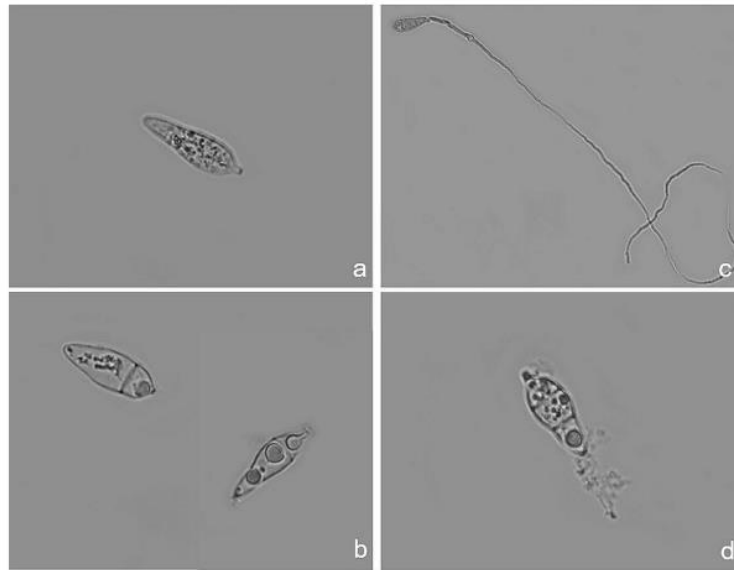


Figura 7: effetti dei peptidi sul fungo *P. oryzae*, a) conidio non trattato, b) conidio non cresciuto dopo 48 ore dal trattamento con peptide (citoplasma agglutinato), c) conidio non trattato germinato dopo 48 ore, d) conidio germinato precocemente dopo 48 ore dal trattamento con peptidi (*ifa lisata*).

Preso da: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753202>

I funghi trattati presentano anche una variazione nella loro espressione genica. Sono state fatte analisi PCR per controllare le differenze di espressione tra i campioni trattati e no, questo ha evidenziato la sovra-regolazione di alcuni geni e l'inibizione di altri, dando un'ulteriore prova dell'efficacia di questi peptidi. Le principali sequenze up-regolate sono quelle coinvolte nelle attività di: degradazione proteosomica e auto-proteolitica, nel trasporto intracellulare, vacuolare e lisosomiale. È visibile anche una down-regolazione dei geni coinvolti nella resistenza agli antibiotici. La differente espressione genica nei campioni trattati con i peptidi ha mostrato un'alterazione anche degli equilibri ossido-riduttivi nelle cellule di *P. oryzae* per up o down regolazione di alcuni suoi geni ne regolano i processi. Questo equilibrio gioca un ruolo essenziale nei processi metabolici, tra questi la detossificazione è uno dei più importanti. In particolare, influenzano molto il metabolismo del glutatione, una molecola che gioca un ruolo fondamentale nella risposta agli stress nei funghi in generale ma principalmente in quello ossidativo. Il glutatione ha capacità detossificanti, sia nei confronti di composti tossici che di specie reattive

dell'ossigeno (ROS). Si è notato che i peptaibolici hanno un'azione inibitoria nei confronti di otto geni che regolano il metabolismo del glutatione. Il fungo, quindi, sarà impossibilitato ad espellere questi composti, sintetizzati dopo lo stress prodotto dai peptidi stessi, portando quindi alla morte del patogeno e dimostrando l'efficacia dei peptaibolici [Sella 2021].

3.1.2 Effetti degli analoghi di tricogina GA IV sulle piante di pomodoro infettate da Botrytis cinerea

I peptaibolici analoghi della tricogina GA IV usati contro *P. oryzae* sono gli stessi testati contro *B. cinerea* [Bacelli 2022]. Questo paragrafo parla dei loro effetti sulle piante di pomodoro e di come influenzano l'infezione. Gli esperimenti condotti hanno dimostrato che c'è una differenza di funzionalità di questi prodotti fito-terapici in base a come e dove vengono applicati ed a quale concentrazione sono usati. È possibile, infatti, notare la differenza se si tratta la foglia sulla faccia superiore o inferiore o se applichiamo il prodotto prima o dopo l'infezione del fungo, questi sono tutti fattori che influenzano l'efficacia del prodotto testato. È stato sperimentato che la concentrazione ottimale con la quale applicare tali prodotti fito-terapici è di 50 μM , in quanto a 25 μM il peptide ha un effetto molto limitato ed invece, a 100 μM , presenta gli stessi risultati che presenta il trattamento a 50 μM (Figura 8A). I peptidi sono anche inefficaci se l'infezione è già in corso: hanno quindi una funzione di difesa preventiva, non di cura. Difatti, le successive conclusioni sono state tratte guardando foglie trattate 48 ore prima dell'inoculo del fungo, dimostrando la funzione preventiva dei peptidi. Come visto precedentemente, i peptidi usati si sono rivelati efficienti nella difesa della pianta, però non agiscono da fungicidi penetranti e non inducono resistenza locale.

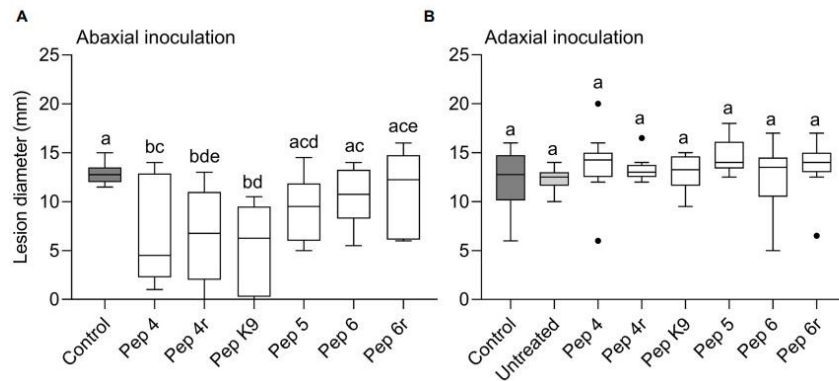


Figura 8: effetto dei peptidi nella riduzione dell'area necrotica nelle foglie trattate su di una faccia con i peptidi e sull'altra con il fungo di *B. cinerea*

Preso da: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881961>

Questo è dimostrato dal fatto che spruzzando i peptaibolici sulla faccia inferiore (abassiale) e inoculando il fungo di *B. cinerea* su quella superiore (adassiale) non si ottiene una riduzione della zona necrotica rispetto al controllo (Figura 8B). Quindi, il peptide non mostra un'attività significativa se spruzzato sulla faccia opposta all'inoculo, dimostrando di non generare una resistenza locale, né tantomeno sistemica al fungo, pur essendo stata dimostrata l'attività antifungina degli analoghi della tricogina GA IV e la loro significativa attività di riduzione dell'infezione. Una nota positiva di questa soluzione dei peptaibolici è data dalla loro resistenza nel permanere sulla superficie trattata. Come mostrato nella figura sottostante (Figura 9) i peptidi mantengono la loro capacità fito-terapica di ridurre l'area dell'infezione e di inibire la crescita fungina anche cinque giorni dopo la loro applicazione sulla superficie fogliare [Baccelli 2022].

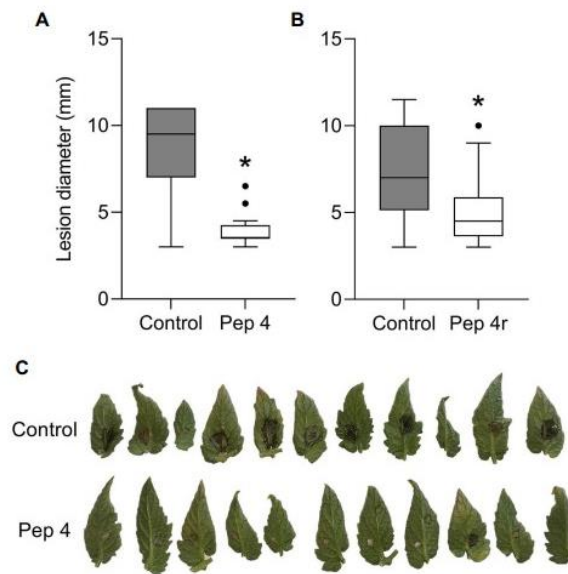


Figura 9: Effetto di Pep4 e 4r (analoghi della tricogina GA IV) applicato 5 giorni prima dell'inoculo del fungo *Botrytis cinerea*

Presa da: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881961>

Quindi, trattando la foglia con i peptaibolici più attivi ad una concentrazione di 50 μ M ed inoculando il fungo 48 ore dopo il trattamento e sulla stessa faccia che è stata trattata con il peptide, il risultato ottenuto è decisamente positivo rispetto al controllo (Figura 10).

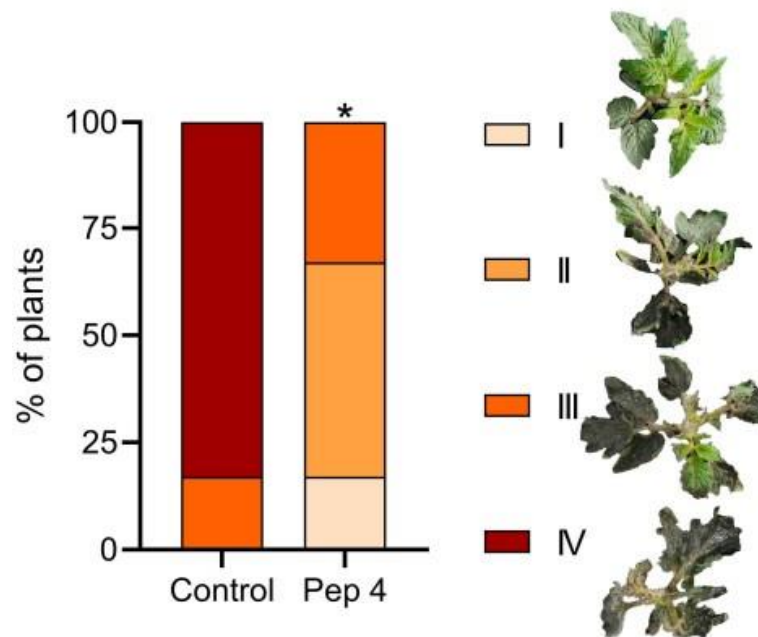


Figura 10: percentuale di piante infettate e conseguenti sintomi dell'infezione su di esse

Presa da: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881961>

Tramite la microscopia a fluorescenza si è potuto notare che Pep4 porta alla sintesi di ROS nella pianta. Per questo sono state analizzate le sequenze genetiche legate alla difesa e di alcuni geni coinvolti nella risposta all'infezione di *B. cinerea*, per vedere se questo peptide generasse priming. Il priming nelle piante è un processo di induzione immunologica, cioè attiva il sistema immunitario della pianta come una sorta di vaccino, detto *green vaccine*. Selezionate le sequenze geniche da analizzare, sono state fatte analisi di PCR a diversi tempi dopo l'applicazione di Pep4 per vedere se ci fosse appunto una variazione di queste. Purtroppo, non ci sono alterazioni significative dovute all'applicazione del peptide Pep4, però, come visto il precedente capitolo, presenta un'alterazione dell'espressione genica in *B. cinerea* [Baccelli 2022].

4 Conclusioni e soluzioni future

Grazie agli studi fatti negli ultimi anni sono stati sviluppati fungicidi nuovi e biocompatibili, creati con metodi alternativi e sostenibili. Fino ad ora i fungicidi in commercio erano di natura sintetica, ma il loro uso ha portato all'inquinamento sempre più massiccio dei terreni di coltura e dell'ambiente e quindi al ritiro dal mercato di molti di questi. Per questo motivo si è vista la necessità di sperimentare i peptaibolici, in particolare la tricogina GA IV ed i suoi analoghi idrosolubili. Nonostante le problematiche trattate nei precedenti capitoli, questa si è dimostrata un'alternativa molto valida ai prodotti fito-terapici finora in commercio, non solo per l'attività antifungina ma anche per il loro processo di sintesi ecosostenibile. Essendo formati da amminoacidi naturali, una volta disciolti nel terreno, questi peptidi non porteranno a prodotti tossici, salvaguardando l'ambiente, le colture e i raccolti, i quali, non conterranno alcun prodotto inquinante. Posso dire quindi che trattare le piante con questi peptidi è un'alternativa più che valida in quanto hanno dimostrato di poter prevenire le infezioni inibendo la crescita del fungo. La natura anfifilica delle strutture dei peptaibolici li rende affini alla membrana delle foglie, aumentando l'adesione. Non dovrebbero quindi presentare l'inconveniente di dover essere spruzzati sulla pianta dopo ogni pioggia e quindi perdere la protezione. Un'altra alternativa ai prodotti sintetici in commercio è quella di attivare il priming nelle piante, un'attività che i peptaibolici non sono capaci di sviluppare, anche se si sono dimostrati in grado di cambiare l'espressione genetica nel fungo. Il priming, noto anche come vaccino verde, porterebbe la pianta ad auto proteggersi dandogli la capacità di riconoscere il patogeno e portando all'espressione selettiva dei geni di difesa. È stato anch'esso studiato ed è stata dimostrata l'esistenza di alcuni peptidi, sempre di origine naturale, in grado di attivare il sistema immunitario della pianta conferendogli la capacità di riconoscere in maniera selettiva i fito-patogeni e di conseguenza di rispondere in modo veloce e preciso in base al microorganismo infestante [Avramova 2018; Tiwari 2022]. Questa Tesi serve a dimostrare che è possibile trovare soluzioni eco-sostenibili per la difesa delle piante e non solo. È importante aprire frontiere a ricerche e sviluppi di prodotti che ci aiutino a vivere più in simbiosi con la Terra senza danneggiarla o inquinarla ma sapendo sfruttare i suoi punti di forza e di debolezza per poter raggiungere un giusto equilibrio.

5 Bibliografia

- Avramova, Z. (2018). Defence-related priming and responses to recurring drought: Two manifestations of plant transcriptional memory mediated by the ABA and JA signalling pathways. In *Plant, Cell & Environment* (Vol. 42, Issue 3, pp. 983–997). Wiley. <https://doi.org/10.1111/pce.13458>
- Baccelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Favaron, F., De Zotti, M., & Sella, L. (2022). Water-Soluble Trichogin GA IV-Derived Peptaibols Protect Tomato Plants From *Botrytis cinerea* Infection With Limited Impact on Plant Defenses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881961>
- De Zotti, M., Sella, L., Bolzonello, A., Gabbatore, L., Peggion, C., Bortolotto, A., Elmaghraby, I., Tundo, S., & Favaron, F. (2020). Targeted Amino Acid Substitutions in a Trichoderma Peptaibol Confer Activity against Fungal Plant Pathogens and Protect Host Tissues from *Botrytis cinerea* Infection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 20, p. 7521). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21207521>
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, 3(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Sella, L., Govind, R., Caracciolo, R., Quarantin, A., Vu, V. V., Tundo, S., Nguyen, H. M., Favaron, F., Musetti, R., & De Zotti, M. (2021). Transcriptomic and Ultrastructural Analyses of *Pyricularia Oryzae* Treated With Fungicidal Peptaibol Analogs of *Trichoderma Trichogin*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753202>
- Silveira D'Ávila L., Corsi De Filippi M.C., Café-Filho A.C. (2022). Fungicide resistance in *Pyricularia oryzae* populations from southern and northern Brazil and evidence of fitness costs for QoI-resistant isolates, *Crop Protection* (Vol. 153), 105887, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105887>.
- Tiwari, M., Singh, R., Jha, R., & Singh, P. (2022). Heritable priming by *Trichoderma*: A sustainable approach for wheat protection against *Bipolaris*

sorokiniana. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1050765>

- Zhang, Y.-M., Ye, D.-X., Liu, Y., Zhang, X.-Y., Zhou, Y.-L., Zhang, L., & Yang, X.-L. (2023). Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. In *Advanced Agrochem* (Vol. 2, Issue 1, pp. 58–78). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.01.003>