



## **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti,  
Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

### **TESI DI LAUREA**

## **FUNGHI COME AGENTI DI BIOCONTROLLO IN AGRICOLTURA**

Relatore:  
Prof. Lorenzo Favaro

Laureanda:  
Arianna Rossi  
Matricola n. 2007910

Anno Accademico 2022 - 2023



# INDICE

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	7
CAPITOLO 1: BIOCONTROLLO.....	9
1.1 Generalità.....	11
1.2 Meccanismi d'azione.....	12
1.3 Limitazioni e rischi.....	14
1.4 Utilizzi.....	16
CAPITOLO 2: GENERE <i>TRICHODERMA</i> .....	19
2.1 Descrizione.....	19
2.2 Meccanismi d'azione.....	20
2.2.1 Micoparassitismo.....	20
2.2.2 Antibiosi.....	21
2.2.3 Competizione.....	22
2.2.4 Induzione di resistenza.....	23
2.3 Benefici e promozione della crescita delle piante.....	23
2.4 Principali specie utilizzate.....	25
2.5 Utilizzi.....	28
CAPITOLO 3: FUNGHI ENTOMOPATOGENI.....	30
3.1 Infezione.....	30
3.2 Biocontrollo.....	31
3.3 <i>Beauveria bassiana</i> .....	33



## RIASSUNTO

In un contesto di crescente preoccupazione e attenzione per l'ambiente e di conseguenza di un maggiore interesse verso l'agricoltura sostenibile, l'utilizzo di metodi alternativi per il controllo delle malattie delle piante e degli insetti dannosi sta assumendo un ruolo sempre più centrale. Uno dei più promettenti tra le alternative consiste nell'uso di organismi viventi per il controllo degli agenti patogeni e dannosi. Tali organismi sono definiti "agenti di biocontrollo" e includono i funghi, che presentano numerosi vantaggi: hanno specificità dell'ospite; sono ubiquitari; la diffusione è efficace; sono persistenti; sono facili da coltivare in laboratorio; non hanno effetti negativi sull'ambiente. I funghi adempiono a questo compito mediante diversi meccanismi, che sono essenzialmente quattro: competizione, iperparassitismo, antibiosi e induzione di resistenza.

Tra i funghi più studiati per il controllo di patogeni ci sono quelli appartenenti al genere *Trichoderma*, ascomiceti ubiquitari. Essi si servono di tutti i meccanismi d'azione elencati e costituiscono dei promotori della crescita delle piante. Inoltre, giocano un ruolo importante nella biorimediazione dei suoli.

I funghi come agenti di biocontrollo non vengono usati solo per le malattie delle piante, ma anche per contrastare gli insetti dannosi. Per questo motivo sono detti entomopatogeni. Anche in questo caso il loro utilizzo prevede svariati vantaggi: sono altamente specifici; non hanno effetti negativi sulla salute umana e sull'ambiente; hanno diversi meccanismi d'azione, evitando così l'insorgenza di resistenze; sono persistenti.



## ABSTRACT

Against a backdrop of growing concern and awareness of the environment and, as a result, of a more interest in sustainable agriculture, the use of alternative ways for controlling plant diseases and harmful insects is gaining an increasingly central role. One of the most promising alternatives is the use of living organisms for the control of pathogenic and harmful agents. These organisms are defined as “biocontrol agents” and they include fungi, that offer various advantages; they are host specific; they are ubiquitous; the spread is efficient; they are persistent; they are easy to grow in the laboratory; they don't have negative effects on the environment. Fungi fulfill this task by using different methods, that are essentially four: competition, hyperparasitism, antibiosis, induced resistance.

Among the most studied fungi for controlling pathogenic agents there are those belonging to the *Trichoderma* genus, ubiquitous ascomycetes. They use all the mechanisms listed above and they are plant growing promoters. Furthermore, they play an important role in the bioremediation of the soil.

Fungi as biocontrol agents are used not only against plant diseases but also against pests. For this reason, they are called entomopathogenic. In this case too they present various advantages: they are host specific; they are not harmful to the environment and to human health; they use different mechanisms so it is difficult for the insects to develop resistance.

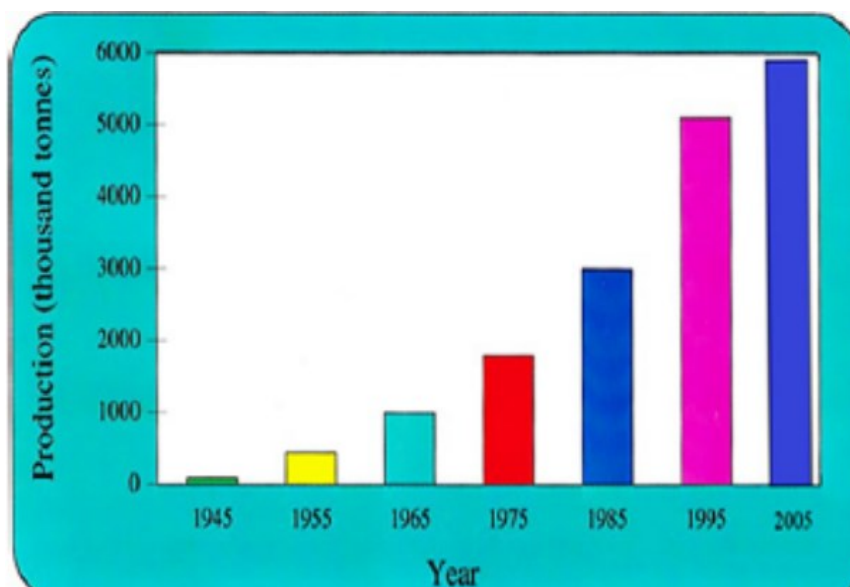




## 1. BIOCONTROLLO

Per far fronte all'aumento della popolazione mondiale e di conseguenza di cibo, occorre incrementare la produzione agricola riducendo al minimo le perdite dirette di resa, causate per il 20 – 40% da agenti patogeni, insetti dannosi e infestanti (Savita e Anuradha Sharma, 2019).

Durante la II guerra mondiale la necessità di aumentare le produzioni portò ad un rapido sviluppo di prodotti fitosanitari per la difesa delle piante (Tudi et al., 2021), infatti basandosi su dati FAO, Carvalho (2017) riporta un incremento di prodotti fitosanitari dell'11% circa per anno a partire dagli anni '50, passando da una produzione di circa 0,2 milioni di tonnellate fino a più di 5 milioni di tonnellate negli anni 2000 (*Figura 1*; Carvalho, 2017).



**Figura 1.** Produzione mondiale di pesticidi basata su dati FAO del 2017 (Fonte: Carvalho, 2017)

Una volta introdotti nell'ambiente, i prodotti fitosanitari possono andare incontro a fenomeni di degradazione o di trasformazione. La degradazione può essere di tre tipi: microbica, chimica e fotodegradativa, può richiedere da ore ad anni e porta alla produzione di nuove sostanze e molecole (Tudi et al., 2021).

La trasformazione invece comprende diversi fenomeni come: assorbimento, ruscellamento superficiale, volatilizzazione e dilavamento attraverso cui i prodotti fitosanitari si diffondono nell'ambiente accumulandosi nel suolo e nelle acque, fino ad entrare nella catena alimentare. I prodotti fitosanitari possono essere tossici non solo per gli organismi nocivi

contro cui vengono usati, ma anche per gli organismi non bersaglio (animali, insetti utili, piante e microrganismi) e l'ambiente, nuocendo di conseguenza anche alla salute umana. Per fare un esempio sui rischi e sulla pericolosità di tali prodotti, si citano gli organoclorurati, composti chimici appartenenti ai cosiddetti inquinanti organici persistenti (POP, persistent organic pollutants), usati in agricoltura e per debellare la malaria nei paesi sviluppati, dove ormai sono stati revocati (Jayaraj, 2016). Per quanto riguarda la salute umana, essi sono cancerogeni, neurotossici e agiscono come interferenti endocrini (Jayaraj, 2016). In particolare, uno studio condotto nel 2010 negli Stati Uniti basato sulle annate 1999-2004 ha dimostrato un'associazione positiva tra gli organoclorurati e i tumori di origine ormonale, specialmente alla prostata (Xu, 2010). Oltre a ciò, si citano anche l'associazione con problemi di apprendimento nei bambini, con diabete, con carenza di vitamina D e molto altro (Jayaraj, 2016). Gli organoclorurati sono pericolosi anche per la fauna, in particolar modo per gli uccelli che si nutrono di vermi o pesci che vivono in suoli e acque contaminate, causandone: mortalità, ridotta fertilità, aborti, assottigliamento dei gusci delle uova (Jayaraj, 2016). Tutto ciò ha portato alla riduzione delle popolazioni di falco pellegrino, aquila calva, sparviero e sole (Mitra, 2011)

L'esposizione umana a questi prodotti può avvenire direttamente per contatto, inalazione o ingestione e indirettamente, tramite le derrate alimentari e l'acqua, provocando potenzialmente una tossicità acuta, cronica o allergica (Kumar et al., 2012). La tossicità acuta riguarda gli effetti che si hanno nel breve periodo, a seguito di una diretta esposizione al prodotto, si citano: emesi, dissenteria, cefalea, vertigini, difficoltà respiratorie, nausea, sudorazione e bradicardia. La tossicità cronica invece riguarda gli effetti nel lungo periodo a seguito di una ripetuta esposizione al prodotto, le sostanze tossiche si accumulano progressivamente nel corpo e dopo un lasso di tempo variabile da alcuni mesi fino ad anni, compariranno i sintomi di malattia.

Dunque, se da una parte i prodotti fitosanitari hanno avuto un ruolo fondamentale in agricoltura, gli effetti negativi sull'ambiente, sulla biodiversità e sugli esseri umani dimostrano la necessità di utilizzare metodi alternativi per la protezione delle piante, come l'adozione di svariate strategie sia a livello colturale che biologico. Nel primo caso varie pratiche agronomiche possono aiutare, si cita: scelta del sito, consociazioni, rotazioni, uso di colture trappola, impiego di varietà resistenti. Contro gli insetti si possono usare barriere fisiche, reti antinsetto, trappole a feromoni. A livello biologico una valida alternativa è rappresentata dagli agenti di biocontrollo (BCA, biological control agents).

## 1.1 GENERALITÀ

Il biocontrollo consiste nella soppressione di un patogeno, o in generale di un organismo dannoso, o di una malattia, mediante l'uso di un altro organismo vivente o di un gruppo di organismi (Savita e Anuradha Sharma, 2019). Una più ampia definizione comprende anche i biopesticidi, sostanze con attività di segnalazione, attrazione e antibiosi che vengono usate per la gestione delle malattie (Collinge et al., 2022). Stenberg et al. (2021) classificano i BCA in quattro categorie, due delle quali includono le specie già presenti in un ecosistema e sono: controllo biologico naturale e controllo biologico conservativo. Le altre due riguardano le specie che vengono introdotte dall'uomo in un ecosistema e sono: controllo biologico classico e controllo biologico aumentativo ("augmentative biological control").

**Controllo biologico naturale:** gli organismi che esercitano questo tipo di contenimento sono naturalmente presenti nell'ecosistema ed esercitano il controllo indipendentemente dall'intervento umano. Un esempio di controllo biologico naturale è il cosiddetto suolo soppressivo (Stenberg et al., 2021), ovvero un suolo che grazie al suo microbioma ha la capacità di limitare l'incidenza delle malattie.

**Controllo biologico conservativo:** riguarda tutte quelle pratiche usate per accrescere e garantire la presenza degli agenti di biocontrollo, come per esempio un uso ridotto di prodotti fitosanitari (Stenberg et al., 2021).

**Controllo biologico classico:** introduzione di un agente di biocontrollo alloctono, che di solito è un antagonista naturale della specie target e riproducendosi, si stabilizza permanentemente nel nuovo ecosistema (Stenberg et al., 2021).

**Controllo biologico aumentativo:** rilascio temporaneo di una specie antagonista che però non si stabilizza permanentemente nel luogo di introduzione. Questo termine comprende due tipologie di controllo: **inoculativo** e **inondativo** (Stenberg et al., 2021). Nel caso del controllo inoculativo l'effetto è assicurato dalla riproduzione, permettendo un controllo a lungo termine; nel caso di quello inondativo l'azione di biocontrollo è rappresentata dal rilascio, in più trattamenti, degli agenti, di cui non ci si aspetta la riproduzione.

I BCA includono batteri come *Bacillus thuringiensis* e *Agrobacterium tumefaciens*, lieviti come *Candida oleophila*, oomiceti come *Pythium oligandrum*, funghi come *Ampelomyces quisqualis* e il genere *Trichoderma* e infine anche virus. Per essere classificato come agente di biocontrollo devono essere soddisfatti certi requisiti: non deve essere nocivo per le piante, gli esseri umani e gli animali; deve essere efficace; deve poter sopravvivere in svariate condizioni ambientali e anche in assenza del bersaglio; deve poter essere prodotto in quantità massive; deve essere persistente (Fontana et al., 2021).

I funghi usati come BCA offrono diversi vantaggi: a differenza della maggior parte dei prodotti chimici sono specifici; sono ubiquitari nel suolo; sono persistenti e si diffondono efficacemente; sono facili da coltivare in laboratorio; rispetto ai prodotti di sintesi non lasciano residui pericolosi e sono quindi più sostenibili a livello ambientale (Savita e Anuradha Sharma, 2019); hanno un alto tasso di riproduzione e un basso tempo generazionale (Thambugala et al., 2020).

## 1.2 MECCANISMI D'AZIONE

Poiché il biocontrollo prevede l'utilizzo di organismi viventi, non tutte le pratiche possono essere considerate appartenere ad esso, anche se non prevedono l'uso di prodotti chimici. Dunque tutte quelle operazioni consistenti nell'uso di mezzi fisici e meccanici per la rimozione o l'eliminazione di organismi nocivi non rientrano nel controllo biologico, così come pratiche colturali quali la rotazione, la falsa semina, l'irrigazione (Stenberg et al., 2021).

I principali meccanismi d'azione con cui i BCA operano sono quattro:

- 1) **Competizione:** fenomeno per cui gli agenti di biocontrollo e i patogeni competono per spazio, nutrienti e in generale risorse che sono limitate e necessarie alla propria crescita e sopravvivenza. L'agente di biocontrollo si appropria di tali risorse, o è il primo a colonizzare una determinata nicchia, impedendo così lo sviluppo dei patogeni. La competizione è particolarmente forte per i nutrienti, come per esempio il ferro, che è presente soprattutto nella forma  $Fe^{3+}$ , difficilmente assimilabile dagli organismi e rappresenta pertanto un fattore limitante della crescita, in particolare è implicato nella respirazione, trasferimento di elettroni, reazioni enzimatiche e molto altro (Junaid et al., 2013; Santacruz et al., 2012). I BCA in condizioni di quantità

limitate di ferro, producono delle sostanze, dette siderofori, a basso peso molecolare e che hanno alta affinità per il ferro, che sequestrano rendendolo in tal modo indisponibile per gli altri microrganismi patogeni e lo riducono a  $Fe^{2+}$ , una forma più facilmente assimilabile.

- 2) **Antibiosi:** meccanismo per cui un microrganismo secerne composti antimicrobici che sono tossici per altri microrganismi, è il caso dei funghi antagonisti che producono tali composti impedendo o bloccando lo sviluppo di altri microrganismi nella stessa nicchia ecologica (Savita e Anuradha Sharma, 2019). Ciò è dimostrato dal fatto che nel caso di antagonisti mutanti che non hanno la capacità di produrre tali composti, essi perdono la loro funzione di antagonista. Ad esempio il ceppo Q di *Gliocadum virens* (noto anche come *Trichoderma virens*) produce la gliotossina, una micotossina in grado di inibire la moltiplicazione dei batteri patogeni e la germinazione delle spore dei funghi (Anitha e Murugesan, 2005). Fu il primo antibiotico ad essere impiegato per le malattie delle piante (Anitha e Murugesan, 2005) e risulta essere particolarmente efficace contro *Rhizoctonia solani* (Howell et al., 1993). L'effetto antagonista del ceppo mutante di *Gliocadum virens* che non produce la gliotossina risulta perdere un'efficacia del 50% (Savita e Anuradha Sharma, 2019).
- 3) **Iperparassitismo:** è considerato il principale meccanismo di biocontrollo (Stenberg., 2021). Il parassitismo si verifica quando un microrganismo ottiene nutrienti da un altro organismo. Se quest'ultimo è anche esso un parassita, per esempio di piante, allora si tratta di iperparassitismo (Kohl et al., 2019). Nel caso dei funghi parassiti di altri funghi, si parla di micoparassiti e possono essere biotrofi o necrotrofi. Quelli biotrofi ottengono i nutrienti dall'ospite senza ucciderlo. Esempi sono *Ampelomyces quisqualis* e *Pseudozyma flocculosa*, entrambi usati contro l'oidio (Savita e Anuradha Sharma, 2019). Quelli necrotrofi invece invadono l'ospite e traggono nutrimento dalle cellule morte (Kohl et al., 2019). Il principale meccanismo con cui i necrotrofi uccidono le cellule dell'ospite è la secrezione di enzimi litici detti CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) che degradano le pareti cellulari consentendo l'entrata e l'invasione nell'ospite; i CWDE comprendono  $\beta$ -1,3-glucanasi, proteasi e chitinasi (Kohl et al., 2019). Questi enzimi non vengono prodotti continuamente. La loro produzione è innescata da segnali generati dopo il riconoscimento dell'ospite; il micoparassita può riconoscere per esempio le lectine sulle pareti cellulari dell'ospite o metaboliti secondari, di solito oligosaccaridi e

oligopeptidi, da esso prodotti (Kohl et al., 2019). Questi enzimi sono altamente specifici e facilmente degradabili, pertanto il rischio di tossicità è considerato molto basso (Kohl et al., 2019).

- 4) **Induzione di resistenza:** le difese delle piante possono essere costitutive o indotte. Quando determinate molecole vengono riconosciute da specifici recettori si attivano le difese indotte. Durante l'infezione, tramite dei specifici recettori di membrana (PRR, Pattern Recognition Receptors), la pianta riconosce certe strutture molecolari, che sono dette PAMP nel caso dei patogeni (Pathogen-Associated Molecular Pattern), MAMP nel caso dei microrganismi in generale (Microorganism-Associated Molecular Pattern) e DAMP nel caso di danni alle cellule vegetali (Damage-Associated Molecular Patterns) (Poveda et al., 2020). Il riconoscimento di queste strutture porta alla risposta difensiva da parte della pianta, detta PTI (Pamp Triggered Immunity), coordinata dall'acido salicilico prodotto dal patogeno nel caso di biotrofi e dall'acido jasmonico nel caso di patogeni necrotrofi (Poveda et al., 2020). Il patogeno può rilasciare degli effettori che sono in grado di annullare le difese della pianta, inducendo quindi la ETS (Effector Triggered Susceptibility); la pianta può a questo punto riconoscere tramite dei recettori gli effettori del patogeno, attivando così la ETI (Effector Triggered Immunity) (Poveda et al., 2020). La resistenza indotta da patogeni è dipendente dall'acido salicilico ed è detta resistenza sistemica acquisita SAR. Quando la resistenza è indotta da microrganismi benefici ed è indipendente dall'acido salicilico, si parla di resistenza sistemica indotta (ISR), che è regolata dagli ormoni acido jasmonico ed etilene ed è attiva contro i necrotrofi (Poveda et al., 2020). Esempi di MAMP/PAMP sono: chitina,  $\beta$ -glucani ed elicidine. I meccanismi di difesa indotta includono la produzione di fitoalessine (metaboliti secondari con attività antimicrobica), di Pathogen Related Proteins (proteine PR, ovvero enzimi idrolitici come le chitinasi), di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e risposte citologiche come l'ispessimento delle pareti cellulari nei siti di penetrazione (Kohl et al., 2019). Questo tipo di difese richiedono un consumo energetico, pertanto non sono costitutive e vengono attivate solo nel momento di bisogno (Collinge et al., 2022).

### 1.3 *LIMITAZIONI E RISCHI*

Il biocontrollo presenta alcune limitazioni:

- Gli agenti di biocontrollo sono specifici: un agente che è efficace nel contrastare un patogeno in una certa coltivazione, può non esserlo in un'altra (Savita e Anuradha Sharma, 2019).
- Inoltre i BCA sono dipendenti da fattori abiotici come temperatura, umidità, vento. Per esempio, *Trichoderma harzianum* è efficace nel controllo di *Botrytis cinerea* in cetriolo in condizioni di clima asciutto e temperature superiori a 20°C, mentre lo è di meno in condizioni di umidità elevata e temperature inferiori a 20°C (Savita e Anuradha Sharma, 2019).
- Per essere approvati, i BCA non devono essere potenzialmente nocivi per esseri umani, colture e ambiente, per questo motivo il processo di identificazione di un BCA è di estrema importanza (Collinge et al., 2022). Il rischio infatti è quello di individuare un efficace agente di biocontrollo per poi scoprire che produce micotossine pericolose. All'interno di una stessa specie possono essere presenti ceppi patogenici e ceppi non patogenici, come accade per la specie *Fusarium oxysporum*. Quelli patogenici si suddividono a loro volta in *formae speciales* in base all'ospite su cui causano la malattia, mentre quelli non patogenici rappresentano validi BCA (Collinge et al., 2022). Un altro potenziale rischio è rappresentato dal fatto che i BCA possono favorire non solo le coltivazioni, ma anche le piante infestanti, rendendole più competitive, ma questo dato è ancora da dimostrare (Collinge et al., 2022).

Il rischio che il patogeno sviluppi resistenza è generalmente basso per i BCA applicati tal quali, mentre esiste la possibilità di insorgenza di resistenza contro quelli che agiscono prevalentemente per antibiosi e contro prodotti formati da metaboliti antimicrobici del BCA, in quanto la resistenza solitamente viene indotta da cambiamenti del sito bersaglio, da detossificazione o escrezione del composto antimicrobico; inoltre più l'esposizione del patogeno ai metaboliti è lunga, più aumenta la probabilità che sviluppi resistenza (Collinge et al., 2022). I diversi meccanismi d'azione presentano differenti rischi tossicologici e di sviluppo di resistenza da parte del patogeno. Difficilmente può insorgere resistenza contro il meccanismo della competizione. Inoltre questo processo agisce tramite enzimi e altri fenomeni che comportano l'appropriazione da parte del BCA dei nutrienti; questi processi sono ubiquitari nel suolo e costituiscono la norma ovunque ci siano più microrganismi nella stessa nicchia, quindi i rischi tossicologici per l'ambiente sono praticamente inesistenti (Kohl et al., 2019). Per quanto riguarda l'induzione di resistenza, il patogeno può

sviluppare meccanismi per superare le difese della pianta, rischio dipeso dal potenziale evolutivo del patogeno e sarà più alto se esso si riproduce anche per via sessuale e se le mutazioni sono frequenti (Bardin et al., 2015). Anche i meccanismi di induzione di resistenza sono ubiquitari e i rischi tossicologici sono bassi (Kohl et al., 2019). Per quanto concerne invece l'iperparassitismo, gli enzimi CWDE sono secreti in concentrazioni molto basse, sono specifici e sono altamente suscettibili alla denaturazione nell'ambiente, pertanto i rischi tossicologici sono considerati bassi (Kohl et al., 2019). Infine il rischio di sviluppare resistenza contro l'antibiosi è considerato basso se i composti antimicrobici sono prodotti *in situ* dai BCA, mentre è considerato più alto se vengono applicati direttamente dei formulati a base di questi composti e dipende dal potenziale evolutivo del patogeno e dalla pressione di selezione (Kohl et al., 2019).

La produzione e commercializzazione di un agente di biocontrollo presenta numerose sfide, come il processo di produzione, i costi capitali e l'entrata nel mercato; inoltre in condizioni controllate i BCA si sono dimostrati efficaci, ma nelle condizioni ambientali naturali l'efficacia è minore (Collinge et al., 2022). Tuttavia il mercato dei BCA è in continua crescita, Nord America, Sud America ed Europa, soprattutto in quest'ultima dove è stato posto l'obiettivo di ridurre del 50% l'uso dei prodotti chimici entro il 2030 (Collinge et al., 2022).

## 1.4 UTILIZZI

I funghi e anche gli oomiceti possono essere usati nel biocontrollo delle malattie delle piante, degli insetti, dei nematodi e delle erbe infestanti.

**Malattie delle piante:** Numerosi funghi sono impiegati per contrastare i patogeni, ma il genere più importante è *Trichoderma*, la cui trattazione avverrà più avanti.

Altri importanti esempi sono riportati nella Tabella 1., di seguito se ne citano alcuni:

- *Pythium oligandrum* è un oomicete usato contro diversi patogeni. A differenza delle altre specie non patogeniche di *Pythium* e diversamente anche da *Trichoderma*, esso penetra all'interno delle radici senza però provocare danni alla pianta, ma al contrario ne promuove la crescita e induce resistenza contro i patogeni (Gerbore et al., 2014). Possiede diversi meccanismi d'azione a seconda del patogeno, ma prevalentemente agisce per micoparassitismo (per esempio contro *Fusarium*



*oxysporum* e *Pythium ultimum*) e antibiosi (per esempio contro *Mycosphaerella pinodes*) (Gerbore et al., 2014).

- *Coniothyrium minitans* è un ascomicete in grado di attaccare gli sclerozi di molti ascomiceti appartenenti al genere *Sclerotium*, agisce per competizione e soprattutto micoparassitismo e può sopravvivere nel suolo per qualche anno (Whipps et al., 2008).
- *Fusarium oxysporum* è uno dei più diffusi funghi patogeni che causano marciumi radicali e avvizzimento delle piante, ma comprende anche specie non patogeniche che colonizzano le radici senza causare danni (Sajeena et al., 2020).

**Tabella 1.** Funghi e rispettivi prodotti contro le malattie delle piante (Fonte: Savita e Anuradha Sharma, 2019)

Fungus	Product	Target	Producer
<i>Trichoderma harzianum</i>	Trichoderma 2000	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i>	Mycontrol (EFA1) Ltd, Israel
	Trichopel	Wide range of fungal diseases	Agrimm Technologies Ltd, New Zealand
	T-22 and T-22HB Bio-Trek, RootShield	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Sclerotina</i>	BioWorks (=TGT Inc) Geneva, USA
	Trichodex	Fungal diseases, e.g. <i>Botrytis cinerea</i>	Makhteshim-Agan, several European companies, e.g. DeCeuster, Belgium
<i>Trichoderma harzianum</i> and <i>T. viride</i>	Trichodowels, Trichoject, Trichoseal, and others	<i>Chondrostereum purpureum</i> and other soil and foliar pathogens	Agrimm Technologies Ltd, New Zealand
<i>Trichoderma harzianum</i> and <i>T. polysporum</i>	Binab T	Fungi causing wilt, wood decay	Bio-Innovation, Sweden
<i>Pythium oligandrum</i>	Polygandron, Polyversum	<i>Pythium ultimum</i>	Plant Protection Institute, Slovak Republic
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fusaclean	<i>Fusarium oxysporum</i>	Natural Plant Protection, France
	Biofox C	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i>	SIAPA, Italy
<i>Candida oleophila</i>	Aspire	<i>Botrytis</i> spp., <i>Penicil- lium</i> spp.	Ecogen Inc., USA
<i>Cryptococcus albidus</i>	YIELDPLUS	<i>Botrytis</i> spp., <i>Penicil- lium</i> spp.	Anchor Yeast, S. Africa
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	AQ10 Biofungicide	Powdery mildews	Ecogen Inc., USA
<i>Coniothyrium minitans</i>	Cotans WG	<i>Sclerotinia</i> species	Prophyta, Germany. KONI, Germany
<i>Gliocladium virens</i>	SoilGard (=GlioGard)	Several plant diseases Damping off and root pathogens	ThermoTrilogy, USA
<i>Gliocladium catenulatum</i>	Primastop	Several plant diseases	Kemira, Agro Oy, Finland
Rotstop	<i>Phlebiopsis</i> (= <i>Peniophora</i> ) <i>gigantea</i>	<i>Heterobasidion annosum</i>	Kemira Agro Oy, Finland

**Insetti:** per questo scopo vengono utilizzati i funghi entomopatogeni (Entomopathogenic fungi (EPF), appartenenti soprattutto alle divisioni degli Zigomiceti e Ascomiceti, in grado

di infettare e uccidere gli artropodi. I generi più importanti sono *Metarhizium* e *Beauveria*, che, oltre ad agire contro gli insetti, sono funghi endofiti che colonizzano le radici, fusti e foglie, promuovendo la crescita e inducendo resistenza contro i patogeni (Litwin et al., 2020).

I vantaggi nell'utilizzo di funghi entomopatogeni sono: specificità nel bersaglio, non sono tossici per l'ambiente, sono persistenti e spesso sono benefici anche per le piante, promuovendone la crescita e proteggendole dai patogeni (Litwin et al., 2020). Inoltre avendo numerosi meccanismi d'azione il rischio di insorgenza di resistenza è molto basso (Litwin et al., 2020). Tuttavia presentano anche alcune limitazioni, oltre ai costi di produzione molto elevati, come anche per i funghi utilizzati nel controllo fitopatologico, la loro efficacia è altamente influenzata dalle condizioni ambientali e spesso il processo è lento (Litwin et al., 2020).

**Nematodi:** i nematodi parassiti delle piante costituiscono una grande minaccia per l'agricoltura, arrivando a provocare perdite del 12% circa; il contenimento dei nematodi è difficile perché agiscono individualmente o congiuntamente ad altri microrganismi e i sintomi sono spesso simili a quelli provocati da altri patogeni (Singh et al., 2015). Un nematode particolarmente pericoloso è *Meloidogyne incognita*, che è in grado di parassitizzare più di 3000 specie di piante (Fontana et al., 2021). I funghi antagonisti possono essere predatori, che catturano i nematodi formando con le ife reti-trappole, anelli costringenti o trappole adesive, invadendo e poi svuotando il corpo (Savita e Anuradha Sharma, 2019), parassiti delle uova, nematofagi ed endofiti (Prasad et al., 2020). Un esempio di fungo usato contro i nematodi è *Purpureocillium lilacinum*, il quale parassitizza le uova e le femmine deponenti e promuove inoltre la crescita in mais e soia (Fontana et al., 2021).

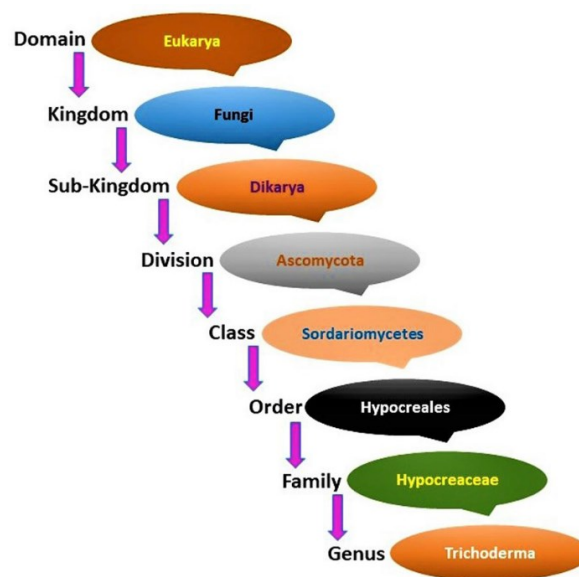
**Infestanti:** sono circa 36 i funghi individuati per il controllo delle malerbe, di cui la maggior parte sono biotrofi, come per esempio le ruggini (Den Breeyen et al., 2022). L'utilizzo delle ruggini per questo scopo è iniziato in Australia nel 1971 con l'introduzione di *Puccinia chondrillina* contro *Chondrilla juncea* (lattugaccio comune) (Tanner et al., 2015). *P. chondrillina* è specifica per *C. juncea* e attacca tutti gli stadi fenologici e tutti gli organi della pianta (Hasan e Wapshere, 1973). I funghi rappresentano ottimi candidati per il biocontrollo delle infestanti perché sono altamente specifici, si disperdono efficientemente raggiungendo anche le zone più inaccessibili e sono efficaci (Barton, 2012).

## 2. GENERE *TRICHODERMA*

*Trichoderma* è uno dei generi di funghi più studiati e più usati nel biocontrollo di funghi, insetti e nematodi, grazie alla propria capacità di adattamento e alla varietà di meccanismi d'azione (Ferreira e Musumeci, 2021); inoltre colonizzando le radici delle piante ne promuovono la crescita, favorendo la proliferazione di radici secondarie, la tolleranza agli stress e aumentando la resa (Hermosa et al., 2013). Per questi motivi le specie appartenenti a questo genere sono considerate le più promettenti e dominanti nel mercato dei BCA (Steyaert et al., 2010).

### 2.1 DESCRIZIONE

La tassonomia del genere *Trichoderma* è complicata e in continua evoluzione. È un genere di funghi imperfetti appartenente alla divisione degli *Ascomycota*, alla famiglia degli *Hypocreaceae* ed all'ordine degli *Hypocreales* (Figura 2, Adnan et al., 2019)



**Figura 2.** Tassonomia. (Fonte: Adnan et al., 2019)

I funghi appartenenti a questo genere sono caratterizzati dall'aver una crescita generalmente rapida e una grande produzione di conidi che di solito a maturità presentano una colorazione verde (Poveda et al., 2020). Il micelio è fioccoso, con conidiofori aventi delle ramificazioni che terminano con delle fialidi, ovvero delle ife conidiogene al cui apice sono posti i conidi. Inoltre formano delle clamidospore globulose in posizione terminale o intercalare, con funzione di sopravvivenza quando le condizioni ambientali sono avverse.

Le ife e i conidi sono caratterizzati dall'essere immersi in una sostanza mucillaginosa (Mukhopadhyay e Kumar, 2020).

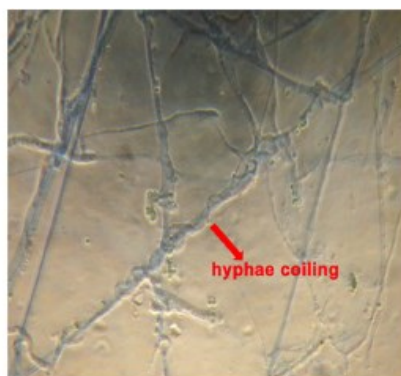
Il successo nella colonizzazione di un habitat dipende dalla capacità di un microrganismo di prosperare e difendersi in un ambiente altamente competitivo (Schuster e Schmoll, 2010). I funghi del genere *Trichoderma* sono ubiquitari e largamente diffusi in natura grazie alla loro capacità di adattamento a diverse condizioni ambientali ed alla loro competitività, sono ottimi degradatori della cellulosa e pertanto sono presenti ovunque ci sia materiale vegetale in decomposizione (Poveda et al., 2020). Le condizioni ottimali di crescita sono un pH compreso tra 4.6 e 6.8 e temperature tra 25 e 30°C (Singh et al., 2014). Si trovano inoltre nella rizosfera e sono in grado di colonizzare le radici, stabilendo con le piante relazioni mutualistiche e portando loro benefici come la promozione della crescita, maggiore disponibilità di nutrienti e protezione dai patogeni, sia attraverso meccanismi d'azione diretti sia attraverso meccanismi indiretti.

## 2.2 MECCANISMI D'AZIONE

### 2.2.1 MICOPARASSITISMO

Il micoparassitismo è uno dei principali meccanismi con cui *Trichoderma* esplica la sua funzione di agente di biocontrollo, inibendo la crescita dei funghi fitopatogeni e ricavando nutrimento da essi (Guzman et al., 2023). Il micoparassitismo può essere di due tipi: biotrofico, in cui il parassita ricava nutrimento da un ospite vivente che solo alla fine muore, o necrotrofico, in cui il parassita uccide l'ospite e ricava nutrimento dalle cellule morte (Viterbo e Horwitz, 2010). I necrotrofi, tra cui *Trichoderma* spp., sono più efficaci perché sono più aggressivi grazie all'abbondante produzione di enzimi, metaboliti e composti antimicrobici e hanno una vasta gamma di ospiti (Viterbo e Horwitz, 2010). *Trichoderma* produce in modo costitutivo enzimi idrolitici, che attaccando i patogeni causano il rilascio da parte di questi di piccole molecole, che costituiscono stimoli chemiotropici che consentono al micoparassita di crescere nella direzione dell'ospite (Vinale et al., 2008). Una volta a contatto con l'ospite differenzia delle strutture simili ad appressori che servono per la penetrazione, cresce lungo le sue ife o si avvolge attorno ad esse (*Figura 3*, Mukhopadhyay e Kumar, 2020) e penetra all'interno delle cellule, sia in modo meccanico attraverso le strutture di penetrazione, sia in modo enzimatico tramite la secrezione di CWDE, quali proteasi,  $\beta$  glucanasi, chitinasi (Viterbo e Horwitz, 2010). Il contatto con l'ospite è favorito dalle lectine presenti sulla sua superficie, che si legano a

carboidrati complessi presenti sulla superficie di *Trichoderma* inducendolo ad avvolgersi attorno alle ife dell'ospite e a formare le strutture di penetrazione (Omann e Zeilinger, 2010). La produzione di chitinasi e di altri enzimi litici è invece stimolata dai prodotti della degradazione delle cellule dell'ospite, che vengono percepiti da specifici recettori di membrana, i GPCR (G protein coupled receptors), che trasmettono l'informazione alle proteine G, in modo tale da innescare una cascata di eventi che porta all'attivazione dei geni per la produzione dei CWDE (Omann e Zeilinger, 2010). Le proteine G sono formate da tre subunità, una  $\alpha$ , una  $\beta$ , una  $\gamma$  e la subunità  $\alpha$  comprende tre sottogruppi (Omann e Zeilinger, 2010). I sottogruppi I e III sono fondamentali nella regolazione della produzione degli enzimi CWDE, di composti antimicrobici e delle strutture di penetrazione (Omann e Zeilinger, 2010). I principali CWDE sono chitinasi e  $\beta$ -1,3-glucanasi, che degradano le principali componenti della parete cellulare dei funghi, la chitina in primo luogo e  $\beta$ -1,3-glucano. L'ospite non subisce solamente ma reagisce con la produzione di metaboliti e specie reattive dell'ossigeno, contro cui *Trichoderma* risponde con l'attivazione di geni coinvolti nella detossificazione (Guzman et al., 2023). Oltre al micelio questo micoparassita è in grado di attaccare anche le strutture di conservazione, come gli sclerozi, che solitamente sono difficili da degradare a causa dello strato di cellule melanizzate (Viterbo e Horwitz, 2010).



**Figura 3.** Avvolgimento (“coiling”) attorno alle ife di *Rhizoctonia solani* (Fonte: Mukhopadhyay e Kumar, 2020).

### 2.2.2 ANTIBIOSI

L'antibiosi consiste nella produzione da parte di fungo antagonista di metaboliti secondari di diversa natura chimica e di basso peso molecolare, che limitano o inibiscono la crescita

di un altro microrganismo (Guzman et al., 2023). Dalle specie di trichoderma sono stati isolati più di 180 metaboliti secondari, con diverse funzioni: siderofori, antibiotici, promotori della crescita delle piante, induttori di resistenza nelle piante (Guzman et al., 2023). I peptaiboli sono polipeptidi con spiccata attività antimicrobica e capaci di indurre resistenza nelle piante, composti da aminoacidi non proteogenici e sintetizzati da sintetasi peptidica non ribosomiale (Sood et al., 2020). Questi complessi enzimatici sintetizzano anche altri peptidi non ribosomiali, che agiscono sinergicamente ai CWDE per bloccare il patogeno (Rai et al., 2019). Importanti metaboliti secondari sono rappresentati dalla gliotossina e dalla glioverina. La gliotossina appartiene ai ETPs (Epipolythiodioxopiperazines), metaboliti secondari tossici prodotti solo dai funghi, caratterizzati da un ponte disolfuro e un anello di dichetopiperazina (Gardiner et al., 2005). I meccanismi con cui agisce la gliocotossina sono due: il primo consiste nella formazione di un legame tra il ponte disolfuro e il gruppo tiolico di una proteina, causando la sua inattivazione; il secondo consiste nella formazione di specie reattive dell'ossigeno mediante reazioni di ossidoriduzione (Gardiner et al., 2005). La gliotossina viene prodotta dal ceppo Q di *Trichoderma virens* ed è efficace contro diversi funghi, come *Rhizoctonia solani*, *Pythium dehayhanum*, *Rhizoctonia bataticola*, *Sclerotium rolfii* e altri (Khan et al., 2020). La gliovirina è un altro composto appartenente ai ETPs che viene prodotto dai ceppi P di *Trichoderma virens*, ed è efficace contro *Pythium ultimum* (Khan et al., 2020).

Altri metaboliti tossici sono i pironi, in particolare il 6-pentil-a-pirone, un composto volatile che oltre ad essere antimicrobico promuove la crescita delle piante (Khan et al., 2020). Le viridine, prodotte da diverse specie di *Trichoderma*, come *T. virens*, *T. viride* e *T. koningii* limitano la germinazione delle spore di *Botrytis allii*, *Aspergillus niger*, *Fusarium caeruleum* e altri (Sood et al., 2020).

### 2.2.3 COMPETIZIONE

Nel suolo, specialmente nella rizosfera, c'è una forte competizione tra i microrganismi per l'approvvigionamento di nutrienti e spazio, poichè questa parte di suolo è resa particolarmente appetibile dagli essudati radicali rilasciati dalle piante, che comprendono zuccheri, aminoacidi, acidi organici, vitamine e altro. Rispetto agli altri microrganismi *Trichoderma* ha una maggiore efficienza nel mobilitare e assorbire i nutrienti, grazie alla secrezione di acidi organici come l'acido gluconico e citrico, con i quali è capace di abbassare il pH rendendo solubili nutrienti che prima non lo erano (Sood et al., 2020).

Grazie alla loro competitività, alla loro velocità di crescita e alla secrezione di composti antimicrobici, *Trichoderma* colonizza con successo la rizosfera, impedendo l'occupazione da parte di altri microrganismi e il loro sviluppo (Guzman et al., 2023). Questo meccanismo è molto importante nel biocontrollo di *Botrytis cinerea*, che è particolarmente sensibile alle carenze nutrizionali (Gajera et al., 2013).

#### 2.2.4 INDUZIONE DI RESISTENZA

Quando *Trichoderma* viene immesso nella rizosfera, esso stimola i meccanismi di difesa della pianta quali resistenza sistemica acquisita (SAR), resistenza sistemica indotta (ISR) e risposta ipersensibile, contro funghi, batteri e virus (Gajera et al., 2013). Durante le interazioni tra *Trichoderma* e pianta, esso produce degli elicitori (MAMP) che inducono la pianta a produrre le proteine legate alla patogenesi (proteine PR), fitoalessine e altre proteine coinvolte nelle risposte difensive (Gajera et al., 2013). A livello molecolare l'induzione di resistenza si traduce in un incremento di metaboliti ed enzimi coinvolti nelle risposte difensive (Sood et al., 2020). In particolare cresce la concentrazione di enzimi implicati nella biosintesi delle fitoalessine quali la fenilalanina ammonio liasi e la calcione sintasi, chitinasi e glucanasi, che sono proteine legate alla patogenesi (pathogenesis-related proteins) (Gajera et al., 2013). Aumenta anche la produzione di enzimi ossidativi come le perossidasi (Guzman et al., 2023). Un'altra risposta difensiva consiste nella deposizione di callosio sulle pareti cellulari per ostacolare la penetrazione da parte dei patogeni (Howell, 2003). Per fare un esempio, piante di tabacco e patata in cui è espressa la chitinasi Chit42 derivante da *Trichoderma harzianum* portano alla formazione di linee transgeniche tolleranti o quasi totalmente resistenti a patogeni quali *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* e *Rhizoctonia solani* (Sood et al., 2020). Quando *Trichoderma* colonizza le radici, può indurre lo stato di priming, in cui le risposte difensive non sono attivate ma sono in uno stato di allerta che consente alla pianta di rispondere a futuri attacchi di patogeni in modo più rapido ed efficace (Woo et al., 2023).

### 2.3 BENEFICI E PROMOZIONE DELLA CRESCITA NELLE PIANTE

*Trichoderma* non solo costituisce un ottimo agente di biocontrollo, ma anche un promotore della crescita delle piante, di cui colonizza le radici e oltre ad indurre resistenza offre

numerosi benefici. Nel suolo oltre ai microrganismi patogeni e a quelli benefici, è presente anche una microflora non patogena ma che influisce negativamente sulle piante tramite la secrezione di composti tossici, come il cianuro, che *Trichoderma* è in grado di degradare (Harman et al., 2004). *Trichoderma* è attratto dagli essudati radicali e quando giunge a contatto con le radici, l'ancoraggio ad esse è facilitato dalle idrofobine, piccole proteine prodotte dai funghi filamentosi che contengono un dominio di otto residui di cisteina e che svolgono numerose funzioni, tra cui appunto quella di migliorare l'ancoraggio all'apparato radicale (Sood et al., 2020). Una volta penetrato all'interno delle radici, *Trichoderma* completa la colonizzazione in modo rapido (Sood et al., 2020). L'efficacia nella colonizzazione si deve alla sua resistenza ai composti antimicrobici prodotti dalle piante durante le prime fasi dell'infezione, indipendentemente dal fatto che il microrganismo sia un patogeno o meno (Benitez et al., 2004). A livello morfologico esso determina un aumento del numero e della lunghezza sia di radici che di germogli, peli radicali più numerosi e maggiore area fogliare (Sood et al., 2020). Le radici di piante colonizzate da *Trichoderma* dimostrano dunque una maggiore capacità di esplorazione del suolo e un più efficiente assorbimento di macro e micronutrienti, portando ad un aumento delle concentrazioni di Zn, Cu, e Na e migliorando di conseguenza lo stato nutrizionale della pianta (Sood et al., 2020). Il fosforo rappresenta un elemento limitante la crescita delle piante perché spesso è presente nel suolo in forme indisponibili, fissato in composti del ferro, calcio e alluminio (Saravanakumar et al., 2013). Attraverso l'emissione di acidi organici *Trichoderma* solubilizza il fosforo che in questo modo risulta più assimilabile dalle piante. In particolare, il ceppo *Trichoderma harzianum* T-22 è largamente usato come agente di biocontrollo e si è dimostrato essere molto efficace nel promuovere la crescita di numerose colture, come il mais (Harman et al., 2004). T-22 stimola lo sviluppo radicale e ciò si traduce in una maggiore tolleranza alla siccità ed in un aumento di resa (Harman et al., 2004). Harman et al., (2004) riportano un aumento di resa in media del 5% in mais trattato con T-22 in oltre cinquecento sperimentazioni sul campo negli Stati Uniti. Occorre precisare che il migliore sviluppo radicale e la migliore tolleranza agli stress, sono anche dovuti all'azione di biocontrollo contro i patogeni e la microflora deleteria (Harman et al., 2004). Inoltre T-22 migliora lo stato nutrizionale del mais, rendendo maggiormente disponibili il ferro tramite la produzione di siderofori e altri nutrienti come fosforo, manganese, rame e zinco tramite solubilizzazione (Harman et al., 2004). T-22 migliora anche l'efficienza di assorbimento ed utilizzo dell'azoto: infatti Harman et al., 2004 riportano che piante di mais nate da semi trattati con questo ceppo, alle quali era stato



apportato un 40% in meno di fertilizzanti azotati, danno gli stessi livelli di resa di piante non trattate con T-22, il che risulta molto interessante in un'ottica di sostenibilità ambientale.

## 2.4 PRINCIPALI SPECIE UTILIZZATE

Le principali specie di *Trichoderma* usate come agenti di biocontrollo sono: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*, e *T. virens* (Guzman et al., 2023).

***Trichoderma atroviride*:** presente soprattutto in climi temperati, con temperatura ottimale di crescita di 25°C (Guzman et al., 2023). È caratterizzato dall'aver un odore che ricorda il cocco, che è causato dalla produzione di 6-pentil- $\alpha$ -pirone (6PP), composto volatile che esercita attività antifungina nei confronti di *Cylindrocarpon destructans* e di diverse specie di *Phytophthora* (Jin et al., 2020). Micoparassitismo e competizione sono i principali meccanismi di azione ma *T. atroviride* è in grado di sfruttare anche gli altri meccanismi precedentemente descritti; un esempio pragmatico consiste nell'inibizione della crescita e della formazione delle zoospore di *Phytophthora cinnamomic* mediante competizione (Guzman et al., 2023). È parassita di numerose specie di *Fusarium*, tra cui si citano *F. proliferatus* e *F. verticillioides*, di varie specie di *Penicillium*, tra cui *P. digitatum* e *P. commune*, e molti altri (Guzman et al., 2023).

***Trichoderma harzianum*:** è presente in climi temperati, con temperatura di crescita ottimale di 30°C (Guzman et al., 2023). Oltre ad essere presenti nel suolo è anche un endofita, impiega tutti i meccanismi d'azione e risulta efficace contro vari funghi, insetti e nematodi (Guzman et al., 2023). *T. harzianum* parassitizza efficacemente *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus carbonarius*, e *Aspergillus flavus* (Guzman et al., 2023). Esso invade il micelio e tramite la secrezione di enzimi litici lo degrada (Braun et al., 2018). *T. harzianum* produce numerosi metaboliti, tra cui si cita la aspartato preteasi rP6281, che inibisce la germinazione delle spore e la crescita di *Candida albicans*, *Botrytis cinerea*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, e *Rhizoctonia solani* (Deng et al., 2018). Per quanto riguarda *B. cinerea*, la aspartato proteasi causa la distruzione delle pareti cellulari, e la sua applicazione sulle ferite presenti nei frutti impedisce la formazione della muffa grigia (Deng et al., 2018). *T. harzianum* si dimostra

efficace anche contro insetti, come per esempio *Nezara viridula*, e nematodi (Guzman et al., 2023).

***Trichoderma asperellum***: è una specie cosmopolita, con un optimum di crescita tra i 25° e i 30°C, usufruisce di tutti i meccanismi d'azione e rappresenta un ottimo parassita sia di funghi patogeni che di insetti, in particolare le tignole (Guzman et al., 2023). Per esempio, sia *T. asperellum* che *Beauveria bassiana* sono in grado di parassitizzare *Ostrinia furnacalis*, anche se *B. bassiana* è più efficace (Batool et al., 2020). Tuttavia, l'uso di entrambi i funghi insieme in rapporto 1:1, porta ad un tasso di mortalità delle larve del 98% circa, con la più alta mortalità dopo 5 giorni dal trattamento. Inoltre, essendo particolarmente resistente agli stress abiotici, come la salinità, rappresenta un ottimo BCA anche in condizioni ambientali avverse (Guzman et al., 2023). Tellez et al., (2019) riportano che piantine di pomodoro cresciute in terreno inoculato con *T. asperellum*, dimostrano un tasso di crescita, un contenuto di clorofilla, uno sviluppo di radici e germogli maggiori rispetto alle piantine coltivate su un terreno normale. In aggiunta, l'applicazione di *T. asperellum* risulta in una riduzione o anche inibizione dell'accumulo di ROS causato dall'attacco del patogeno, che unito al migliore stato di salute della pianta, si traduce in una riduzione dei sintomi causati da *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* (Tellez et al., 2019).

***Trichoderma virens***: comprende due ceppi denominati P e Q sulla base dei metaboliti secondari prodotti. Gli individui del ceppo Q producono la gliotossina mentre quelli del ceppo P producono la gliovirina, ed entrambi i composti presentano un'elevata attività antimicrobica. *T. virens* è un micoparassita, per esempio penetra le ife di *Rhizoctonia solani* e ne inibisce la crescita, ma il suo principale meccanismo d'azione è l'antibiosi (Guzman et al., 2023). Altri metaboliti secondari sono responsabili dell'induzione di resistenza, come il ferricromo, un sideroforo che induce la resistenza di tipo ISR in mais contro *Cochliobolus heterostrophus* (Guzman et al., 2023).

***Trichoderma longibrachiatum***: predilige climi tropicali (Guzman et al., 2023). È l'unica specie del genere *Trichoderma* ad essere sospetta di provocare danni alla salute umana (Guzman et al., 2023). Hatvani et al., (2019) riportano quattro casi di micosi dovuti a *T. longibrachiatum* in quattro pazienti. Per quanto concerne il suo ruolo di agente di biocontrollo, esso è capace di parassitizzare diversi funghi, per esempio *Fusarium pseudograminearum*, e anche le uova di diverse specie di nematodi, come *Heterodera*

*avenae*, presenta inoltre attività antibatterica contro *Bacillus subtilis*, *B. mycooides*, e diverse specie di *Staphylococcus* (Guzman et al., 2023). Produce numerosi metaboliti secondari che possono essere usati singolarmente senza inoculare *T. longibrachiatum*, visto i rischi per la salute umana (Guzman et al., 2023).

***Trichoderma viride***: è una delle specie più comuni nel suolo, presenta una temperatura ottimale di crescita pari a 25°C (Guzman et al., 2023). Grazie alla sua capacità di degradare la chitina parassitizza sia funghi che insetti, è antagonista di *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, e *Sclerotium rolfsii* (Guzman et al., 2023). Produce metaboliti secondari con attività antibatterica che inibiscono *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas fluorescens* (Guzman et al., 2023). Oltre alle sue abilità da agente di biocontrollo, *T. viride* può anche essere usato per la promozione della crescita delle piante e per il biorisanamento dei suoli (Guzman et al., 2023).

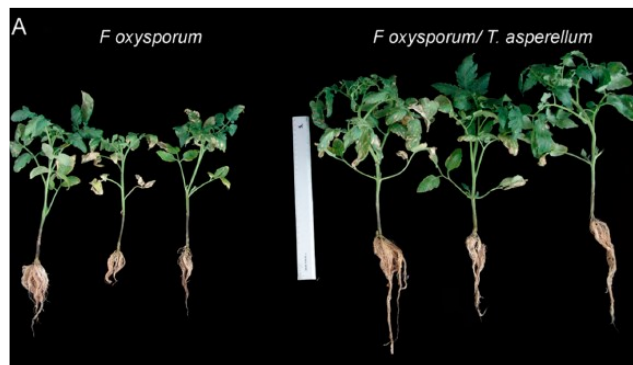
Si riporta di seguito un esempio di applicazione di *T. asperellum*, il cui successo nel ridurre i sintomi di *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* in piante di pomodoro è stato dimostrato da Tellez et al (2019). La formulazione usata per piante di *Lycopersicon esculentum* è composta da 20 g di avena, 50 ml di caolino, 100 ml di vermiculite, 60 ml di acqua e successivamente inoculata con *T. asperellum* e favorisce la proliferazione e la sopravvivenza del fungo nel suolo. Per valutare gli effetti di *Trichoderma* sulla crescita alcune piantine di due settimane circa sono state coltivate in un terreno sterile, altre in un terreno inoculato con *T. asperellum*, e dopo 40 giorni sono stati ricavati i seguenti risultati, riportati anche nella tabella 3: un aumento del 22% del tasso di crescita assoluto, del 16% del contenuto di clorofilla e del 30% del peso fresco e del peso secco rispetto alle piantine coltivate su suolo sterile.

**Tabella 3:** effetti di *T. asperellum* sulla crescita di piantine di pomodoro (Fonte: Tellez et a., 2019).

Treatments	AGR* (cm/day)	Leaf Area (cm <sup>2</sup> )	SPAD Units	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)
Control	0.394 ± 0.05 <sup>a</sup>	10.91 ± 3.00 <sup>a</sup>	22.46 ± 1.84 <sup>a</sup>	12.72 ± 1.38 <sup>a</sup>	0.957 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>T. asperellum</i>	0.50 ± 0.08 <sup>b</sup>	12.20 ± 2.90 <sup>a</sup>	26.75 ± 2.09 <sup>b</sup>	18.83 ± 0.58 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.01 <sup>b</sup>

Per valutare invece l'efficacia di *T. asperellum* come agente di biocontrollo contro *F. oxysporum*, piantine di due settimane coltivate su terreno inoculato con il fungo e su

terreno sterile sono state inoculate dopo tre settimane con *F. oxysporum*. Dopo altre tre settimane le piantine cresciute su terreno con *Trichoderma* mostravano avvizzimento e rachitismo meno evidenti rispetto alle piantine non trattate (Figura 4, Tellez et al., 2019)



**Figura 4:** sintomi di *F. oxysporum* in piantine non trattate e piantine trattate con *T. asperellum*  
(Fonte: Tellez et al., 2019)

Allo stesso modo, foglie staccate da piantine trattate con *Trichoderma* e non trattate furono inoculate con *B. cinerea*, e le foglie trattate mostrarono lesioni in quantità minore e meno gravi rispetto alle altre. Piantine pretrattate con *T. asperellum* mostrano una ridotta produzione di ROS. L'effetto protettivo della formulazione usata è causato in parte dalla stimolazione della crescita, che migliora lo stato fisiologico della pianta, ma soprattutto dall'inibizione dell'accumulo di specie reattive dell'ossigeno.

## 2.5 UTILIZZI

A causa della sempre maggiore attenzione riguardo la salute umana e la sostenibilità ambientale, i vari governi stanno sempre più limitando l'utilizzo di prodotti chimici per la protezione delle piante, a favore di alternative più naturali e sostenibili, come appunto l'uso degli agenti di biocontrollo e dei prodotti da loro derivati (Woo et al., 2014). Le specie di *Trichoderma* sono tra le più usate come ingredienti di bio-pesticidi e bio-stimolanti, grazie, oltre alla loro azione di biocontrollo, promozione della crescita e miglioratrice del terreno, anche alla loro adattabilità a diverse condizioni ambientali, alla loro velocità ed efficienza di moltiplicazione e alla loro generale compatibilità con altri microrganismi benefici e con molti prodotti chimici (Woo et al., 2014). Le formulazioni contengono le spore di *Trichoderma* e possono essere applicate in vari modi, per esempio sui semi, sul materiale di propagazione, sulle radici, sulle foglie, durante la potatura o possono essere inoculati nel terreno durante la semina (Woo et al., 2014). Solitamente sono previsti due momenti di

utilizzo, il primo durante la semina o trapianto, il secondo durante la crescita (Woo et al., 2014). I formulati possono contenere una sola specie di *Trichoderma*, più specie o una combinazione di *Trichoderma* e altri microrganismi benefici, come micorrize e batteri come *Bacillus thuringiensis* (Woo et al., 2014). La maggior parte dei prodotti a base di *Trichoderma* sono usati come fungicidi, in particolare contro patogeni “soilborne” come *Fusarium Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Pythium*, e contro patogeni fogliari come *Botrytis* e *Alternaria* (Woo et al., 2014). Le formulazioni solitamente consistono in polveri bagnabili, emulsioni o sospensioni che vengono mescolati con acqua per applicazioni con l'utilizzo di spray o l'irrigazione, oppure in granuli che vengono incorporati direttamente nel suolo durante la semina (Woo et al., 2014).

*Trichoderma* non viene utilizzato esclusivamente in campo agricolo, ma trova applicazioni in molti altri campi, grazie alla sua copiosa produzione di metaboliti secondari (Sood et al., 2020).

**Biorisanamento:** micorimediazione è il termine usato per indicare il biorisanamento del suolo da parte dei funghi (Solanki et al., 2019). Le sostanze inquinanti presenti nei suoli, come pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici (PAH), plastiche e metalli pesanti, sono difficili da rimuovere, e le tecniche attualmente disponibili sono molto costose, portano alla formazione di altre sostanze tossiche e non garantiscono la completa rimozione dei prodotti (Tripathi et al. 2013). La micorimediazione rappresenta un'alternativa più economica e più efficace (Tripathi et al. 2013). *Trichoderma* presenta un ottimo potenziale biodegradativo, grazie anche alla sua alta resistenza a metalli pesanti, cianuro, pesticidi e altre sostanze tossiche (Tripathi et al. 2013).

**Miglioramento profilo nutraceutico:** Marra et al., (2019) riportano che l'applicazione di *Trichoderma* o del 6-pentil- $\alpha$ -pirone (6PP) o dell'acido harzianico, che sono suoi metaboliti secondari, su semi di soia, oltre a causare un significativo aumento della crescita, innalza il contenuto di minerali e di acidi grassi come acido oleico, linoleico, 11-ecosenoico e stearico. un altro esempio di miglioramento delle caratteristiche nutrizionali viene riportato da Carillo et al., (2020). Trattamenti con il ceppo T-22 di *T. harzianum* o con 6PP causano un incremento del contenuto di licopene nei frutti, un antiossidante che oltre ad assicurare una maggiore conservabilità dei datterini, ha numerosi benefici per la salute umana (Carillo et al., 2020).

**Usi industriali:** gli enzimi litici prodotti da *Trichoderma*, nello specifico cellulasi, pectinasi ed emicellulasi, sono sfruttati anche nell'industria alimentare per gli animali, per rendere i mangimi più digeribili (Blaszczyk et al., 2014). Le cellulasi sono usate anche nell'industria tessile per ammorbidire i tessuti (Blaszczyk et al., 2014).

### 3. I FUNGHI ENTOMOPATOGENI

Il termine entomopatogeno si riferisce all'abilità di certi funghi di infettare ed uccidere gli insetti, capacità che può essere sfruttata allo scopo di contenere la popolazione di un insetto dannoso entro una soglia di danno economico e di controllare le popolazioni degli insetti vettori di malattie (Mora et al., 2018). I funghi entomopatogeni (EPF) appartengono alle seguenti divisioni: *Microsporidia*, *Entomophthoromycota*, *Basidiomycota*, *Zigomycota*, *Ascomycota* e anche *Oomycetes* e *Chytridiomycota*, gli ultimi due una volta classificati come funghi (Litwin et al., 2020). Tuttavia il numero maggiore di specie entomopogene è compreso negli *Ascomycota* e *Entomophthoromycota* (Litwin et al., 2020).

#### 3.1 INFEZIONE

I funghi entomopatogeni non hanno bisogno di essere ingeriti per infettare la vittima, infatti l'infezione avviene per contatto, in seguito al quale il fungo penetra attraverso la cuticola e raggiunge l'emocele (Litwin et al., 2020). Il contatto può avvenire direttamente tra un cadavere infetto e la nuova vittima o indirettamente per mezzo del vento o altri vettori (Mora et al., 2018). Un'adesione efficace e una germinazione veloce sono di estrema importanza nel determinare il successo dell'infezione (Qu e Wang, 2018). Nel processo di adesione del fungo sulla superficie dell'ospite sono coinvolte le idrofobine, che conferiscono proprietà idrofobiche alle pareti cellulari dei conidi, e le adesine, che permettono il riconoscimento dell'ospite e l'adesione (Mora et al., 2018). Inoltre, per assicurare la presenza di umidità necessaria alla germinazione, producono una mucillagine (Qu e Wang, 2018). Se le condizioni di umidità e temperatura sono ottimali e se c'è sufficiente disponibilità di nutrienti, avviene la germinazione (Mora et al., 2018). Temperature ideali sono in genere comprese tra 20°C e 30°C, anche se il range ottimale varia a seconda della specie (Litwin et al., 2020). La germinazione consiste nella formazione delle strutture di penetrazione, che di solito consistono in un tubetto

germinativo e un appressorio, ma alcuni *Entomophthorales* penetrano direttamente con il tubetto germinativo senza formare l'appressorio (Mora et al., 2018). Dopo la germinazione l'EPF penetra la cuticola dell'insetto, formata da epicuticola, esocuticola ed endocuticola, per mezzo sia della pressione meccanica da parte dell'appressorio, sia della secrezione di enzimi litici che degradano la cuticola permettendo il rilascio di nutrienti e facilitando la penetrazione (Singh et al., 2017). Questi enzimi comprendono lipasi, proteasi e chitinasi. I primi ad essere attaccati sono i lipidi e le lipoproteine per mezzo delle lipasi, le quali degradando questi composti liberano acidi grassi, facilitando in questo modo l'adesione alla cuticola grazie all'aumento delle interazioni idrofobiche (Santi et al., 2010). Le proteasi e le peptidasi degradano proteine e peptidi ed infine le chitinasi degradano la chitina, che è la principale componente della cuticola (Litwin et al., 2020). I funghi entomopatogeni producono molti altri enzimi, tra cui la trealasi, che degradando il trealosio, uno zucchero dell'emolinfa, libera molecole di glucosio che costituiscono nutrimento per il fungo (Litwin et al., 2020). Una volta raggiunto l'emocele, il fungo produce blastospore e si diffonde in tutto il corpo, dove produce numerosi metaboliti secondari tossici per proteggersi dalle difese dell'insetto e per danneggiarlo, alterandone il comportamento, causando convulsioni e mancanza di coordinazione (Mora et al., 2018). Tra i metaboliti più importanti ci sono delle particolari proteasi dette "destruxins" che mantengono aperti i canali del calcio causando la paralisi dell'insetto (Mora et al., 2018). Il corpo dell'insetto diventa sempre più rigido e alla fine muore di inedia e a causa dei danni agli organi (Litwin et al., 2020). Dopo la morte dell'insetto, se le condizioni di umidità e temperatura sono favorevoli, le ife fuoriescono dal corpo e formano nuovi conidi, che verranno dispersi dal vento (Mora et al., 2018).

### 3.2 *BIOCONTROLLO*

Anche per gli EPF le strategie di biocontrollo sono di tipo classico, aumentativo e conservativo.

La tipologia classica prevede il controllo di un insetto dannoso non autoctono che si è stabilito in una zona grazie all'assenza di nemici naturali, tramite l'introduzione permanente di un suo antagonista naturale proveniente dalla stessa regione (Shah e Pell, 2003). Un esempio di un'applicazione di successo di questa strategia viene dall'Australia, dove nel 1977 era stato introdotto *Therioaphis trifolii f. maculata*, un afide che divenne

estremamente dannoso per le leguminose destinate al pascolo del bestiame (Shah e Pell, 2003). Nel 1979 fu importata *Zoophthora radicans* da Israele, dove era nota per essere un efficace antagonista dell'afide in questione; dopo 5 settimane comparvero le prime infezioni, successivamente il fungo fu in grado di persistere grazie alla produzione di clamidospore e fu risolto il problema dell'afide (Shah e Pell, 2003).

Quando gli antagonisti naturali sono presenti nella stessa zona del bersaglio, ma non sono in grado di ridurre la popolazione perché sono troppo pochi o perché sono attivi troppo tardi, si ricorre al controllo aumentativo, che può essere di tipo inoculativo o inondativo (Sharma e Sharma, 2021). La prima tipologia prevede più rilasci di piccole quantità di EPF, di cui ci si aspetta la riproduzione e diffusione in modo tale da mantenere la popolazione bersaglio sotto una soglia economica di danno (Sharma e Sharma, 2021). Il controllo inondativo invece prevede il rilascio di una quantità massale di EPF, di cui non ci si aspetta la riproduzione, che porta ad una rapida riduzione della popolazione del bersaglio (Shah e Pell, 2003). Questo tipo di utilizzo è simile a quello dei pesticidi chimici, pertanto vengono impiegati termini come micopesticidi e micoinsetticidi (Shah e Pell, 2003). Un esempio di EPF prodotto in ingenti quantità per il biocontrollo è rappresentato da *Metarhizium anisopliae*, usato contro locuste e coleotteri (Singh et al., 2017).

Il metodo conservativo infine mira alla conservazione e aumento delle popolazioni di antagonisti naturali mediante l'adozione di pratiche per la creazione di un ambiente a loro favorevole, come per esempio un uso ridotto di prodotti chimici (Sharma e Sharma, 2021). I vantaggi dell'utilizzo dei EPF sono i seguenti: elevata specificità d'ospite, pertanto non hanno effetti negativi sugli organismi benefici e non bersaglio; non presentano rischi per l'ambiente, a differenza degli insetticidi chimici; sono persistenti (Singh et al., 2017); basso rischio di insorgenza di resistenza da parte dei bersagli; grazie alla loro elevata produzione di tossine, c'è grande margine di sviluppo di nuovi prodotti insetticidi; alcuni EPF sono endofiti delle piante, portando loro numerosi benefici e inducendo risposte difensive (Khan et al., 2012). Gli svantaggi invece comprendono: necessità di più strategie per controllare i vari insetti, a causa dell'elevata specificità d'ospite dell'EPF; lentezza del processo di uccisione, che va dalle 2 alle 3 settimane; bassa conservabilità; dipendenza da fattori ambientali e climatici (Khan et al., 2012).



### 3.3 *BEAUVIERA BASSIANA*

*Beauveria bassiana* è uno dei funghi entomopatogeni più studiati ed utilizzati. È un ascomicete appartenente all'ordine degli *Hypocreales*. Nel suolo vive da saprofita, ma può anche vivere da endofita nelle parti aeree delle piante, inducendo resistenza contro i patogeni (Mascarin e Jaronski, 2016). L'infezione inizia quando i conidi dispersi dal vento giungono sulla superficie dell'ospite dove germinano e attraverso la secrezione di enzimi il fungo penetra attraverso la cuticola, fino a raggiungere l'emolinfa (Mascarin e Jaronski, 2016). Quando questa viene raggiunta, il fungo si differenzia in blastospore, che sono strutture in grado di colonizzare i tessuti interni, moltiplicarsi rapidamente ed evitare le risposte difensive dell'insetto, e contemporaneamente produce una grande quantità di tossine che sopprimono la risposta immunitaria dell'ospite (Mascarin e Jaronski, 2016). Infine, quando l'ospite è morto, il fungo fuoriesce e produce nuovi conidi. Tra i fattori coinvolti nel processo ci sono: melanina, che contrasta l'attività dei lisozimi presenti nell'epidermide dell'insetto (Wang et al., 2021); superossido dismutasi, che aumenta la tolleranza allo stress ossidativo causato dalla produzione di ROS da parte dell'ospite convertendo l'anione superossido in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno (Xie et al., 2010); beauvericine e beauverolidi, composti con proprietà insetticide (Wang et al., 2021); la oosporeina, un derivato dell' 1-4 benzochinone, che promuove l'infezione inibendo l'attività della profenolossidasi e l'espressione di composti antifungini (Feng et al., 2015).

Insieme alle specie di *Metarhizium*, *Beauveria bassiana* è la più usata per il biocontrollo degli insetti (Mascarin e Jaronski, 2016). Circa il 90% dei formulati di *B. bassiana* sono a base di conidi, mentre la restante percentuale è a base di blastospore o micelio (Mascarin e Jaronski, 2016). Un esempio di prodotto a base di spore vive del ceppo GHA di *B. bassiana* è "BotaniGard 22WP", usato nell'Unione Europea, negli Stati Uniti, nel Messico e in Giappone (de Faria e Wraight, 2007). È usato contro tripidi, aleurodidi, acari e afidi, attivo contro tutti gli stadi di sviluppo, in particolare quelli giovanili. *B. bassiana* può essere usata singolarmente o sinergicamente ad un altro agente di biocontrollo come *Bacillus thuringiensis* o anche insieme ad altri insetticidi (Mascarin e Jaronski, 2016).

## CONCLUSIONI

L'intento della presente tesi è stato quello di mettere in evidenza capacità, potenzialità e vantaggi associati all'uso dei funghi come agenti di biocontrollo da utilizzare per proteggere le piante da agenti patogeni e da insetti dannosi. I funghi infatti rappresentano una valida alternativa, più sostenibile, all'uso di prodotti fitosanitari, i quali invece presentano molti più rischi per la salute umana, per la biodiversità e per l'ambiente. Inoltre, oltre a proteggere le piante e a promuoverne la crescita, questi funghi e le sostanze da loro prodotte possono trovare impiego anche in altri ambiti, per esempio in quello industriale. Al momento il genere più usato e studiato è *Trichoderma*, le cui specie più promettenti sono: *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens* e *T. viride*, ma esistono numerosi altri generi e specie incoraggianti. Le potenzialità effettive di questi BCA sono ancora completamente da svelare, come l'ottimale metodica d'utilizzo, ma l'ampia letteratura scientifica a disposizione in merito è un indicatore del crescente interesse verso opzioni più sostenibili nel fare agricoltura.

## BIBLIOGRAFIA

Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., ... & Lu, G. D. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial pathogenesis*, 129, 7-18.

Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21.

Anitha, R., & Murugesan, K. (2005). Production of gliotoxin on natural substrates by *Trichoderma virens*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 45(1), 12-19.

Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillet, B., Siegwart, M., et al. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front. Plant Sci.* 6:566.doi: 10.3389/fpls.2015.00566

Barton, J. (2012). Predictability of pathogen host range in classical biological control of weeds: an update. *BioControl*, 57(2), 289-305.

Batool, R., Umer, M. J., Wang, Y., He, K., Zhang, T., Bai, S., ... & Wang, Z. (2020). Synergistic effect of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma asperellum* to induce maize (*Zea mays* L.) defense against the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera, Crambidae) and larval immune response. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8215.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.

Blaszczyk, L. M. S. K. S., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., & Jedryczka, M. (2014). *Trichoderma* spp.—application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research*, 54(4).

Braun, H., Woitsch, L., Hetzer, B., Geisen, R., Zange, B., & Schmidt-Heydt, M. (2018). *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *International journal of food microbiology*, 280, 10-16.

Carillo, P., Woo, S. L., Comite, E., El-Nakhel, C., Roupael, Y., Fusco, G. M., ... & Vinale, F. (2020). Application of *Trichoderma harzianum*, 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone and plant biopolymer formulations modulate plant metabolism and fruit quality of plum tomatoes. *Plants*, 9(6), 771.

Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and energy security*, 6(2), 48-60.

Collinge, D. B., Jensen, D. F., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M. W., & Shaw, R. H. (2022). Biological control of plant diseases—What has been achieved and what is the direction?. *Plant Pathology*, 71(5), 1024-1047.

de Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*, 43(3), 237-256.

Den Breeyen, A., Lange, C., & Fowler, S. V. (2022). Plant pathogens as introduced weed biological control agents: Could antagonistic fungi be important factors determining agent success or failure?. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, 959753.

Deng, J. J., Huang, W. Q., Li, Z. W., Lu, D. L., Zhang, Y., & Luo, X. C. (2018). Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. *Enzyme and microbial technology*, 112, 35-42.

Feng, P., Shang, Y., Cen, K., & Wang, C. (2015). Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11365-11370.

Ferreira, F. V., & Musumeci, M. A. (2021). *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 90.

Fontana, D. C., de Paula, S., Torres, A. G., de Souza, V. H. M., Pascholati, S. F., Schmidt, D., & Dourado Neto, D. (2021). Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. *Pathogens*, 10(5), 570.

Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., & Golakiya, B. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol*, 1(4), 133-142.

Gardiner, D. M., Waring, P., & Howlett, B. J. (2005). The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*, 151(4), 1021-1032.

Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., & Rey, P. (2014). Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 4847-4860.

Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de Los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadiji, A. E., ... & Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. *Plants*, 12(3), 432.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., & Chen, J. (2004). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147-153.

Hasan, S., & Wapshere, A. J. (1973). The biology of *Puccinia chondrillina* a potential biological control agent of skeleton weed. *Annals of Applied Biology*, 74(3), 325-332.

Hatvani, L., Homa, M., Chenthamara, K., Cai, F., Kocsubé, S., Atanasova, L., ... & Kredics, L. (2019). Agricultural systems as potential sources of emerging human mycoses caused by *Trichoderma*: a successful, common phylotype of *Trichoderma longibrachiatum* in the frontline. *FEMS microbiology letters*, 366(21), fnz246.

Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int. Microbiol*, 16(2), 69-80.

Herrera-Téllez, V. I., Cruz-Olmedo, A. K., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M., Arce-Cervantes, O., Hernández-León, S., & Saucedo-García, M. (2019). The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 2007.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Howell, C. R., Stipanovic, R. D., & Lumsden, R. D. (1993). Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 3(4), 435-441.

Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary toxicology*, 9(3-4), 90.

Jin, X., Guo, L., Jin, B., Zhu, S., Mei, X., Wu, J., ... & He, X. (2020). Inhibitory mechanism of 6-Pentyl-2H-pyran-2-one secreted by *Trichoderma atroviride* T2 against *Cylindrocarpon destructans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104683.

Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1(2), 39-57.

Khan, R. A. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., & Li, Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*, 8(6), 817.

Khan, S., Guo, L., Maimaiti, Y., Mijit, M., & Qiu, D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding*, 3(7).

Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant*

science, 845.

Kumar, N., Pathera, A. K., Saini, P., & Kumar, M. (2012). Harmful effects of pesticides on human health. *Annals of Agri-Bio Research*, 17(2), 125-127.

Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 23-42.

Marra, R., Lombardi, N., d'Errico, G., Troisi, J., Scala, G., Vinale, F., ... & Lorito, M. (2019). Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(7), 1814-1822.

Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26.

Mitra, A., Chatterjee, C., & Mandal, F. B. (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Res J Environ Toxicol*, 5(2), 81-96.

Mora, M. A. E., Castilho, A. M. C., & Fraga, M. E. (2018). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84.

Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-8.

Omann, M., & Zeilinger, S. (2010). How a mycoparasite employs G-protein signaling: using the example of *Trichoderma*. *Journal of Signal Transduction*, 2010.

Poveda, J., Abril-Urias, P., & Escobar, C. (2020). Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11, 992.

Prasad, B. N., Subramanyam, B., Lakshmi pathi, R. N., Ansari, R. A., Rizvi, R., Sumbul,

A., ... & Rachmi, C. M. (2020). Utilization of beneficial microorganisms in sustainable control of phytonematodes. *Management of Phytonematodes: Recent Advances and Future Challenges*, 317-337.

Qu, S., & Wang, S. (2018). Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 96-103.

Sajeena, A., Nair, D. S., & Sreepavan, K. (2020). Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* as a biocontrol agent. *Indian Phytopathology*, 73, 177-183.

Santi, L., da Silva, W. O. B., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4), 874-880.

Saravanakumar, K., Arasu, V. S., & Kathiresan, K. (2013). Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquatic Botany*, 104, 101-105.

Savita, & Sharma, A. (2019). Fungi as biological control agents. *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment*, 395-411.

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 787-799.

Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5), 413-423.

Sharma, R., & Sharma, P. (2021). Fungal entomopathogens: a systematic review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 1-13.

Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., & Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology*, 3(1), 1-7.

Singh, D., Raina, T. K., & Singh, J. (2017). Entomopathogenic fungi: An effective



biocontrol agent for management of insect populations naturally. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(6), 833.

Singh, S., Singh, B., & Singh, A. P. (2015). Nematodes: A threat to sustainability of agriculture. *Procedia Environmental Sciences*, 29, 215-216.

Solanki, M. K., Kashyap, B. K., Solanki, A. C., Malviya, M. K., & Surapathrudu, K. (2019). Helpful Linkages of *Trichoderma* s in the process of Mycoremediation and Mycorestoration. *Plant Health Under Biotic Stress: Volume 2: Microbial Interactions*, 51-64.

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., ... & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762.

Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., ... & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665-676.

Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 156(10), 2887-2900.

Tanner, R. A., Pollard, K. M., Varia, S., Evans, H. C., & Ellison, C. A. (2015). First release of a fungal classical biocontrol agent against an invasive alien weed in Europe: biology of the rust, *Puccinia komarovii* var. *glanduliferae*. *Plant Pathology*, 64(5), 1130-1139.

Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D., & Promputtha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 604923.

Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T., & Tripathi, R. D. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15, 541-550.

Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., ... & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International journal of environmental research and public health*, 18(3), 1112.

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), 1-10.

Viterbo, A., & Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*, 676-693.

Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to insects. *Frontiers in Microbiology*, 12, 705343.

Whipps, J. M., Sreenivasaprasad, S., Muthumeenakshi, S., Rogers, C. W., & Challen, M. P. (2008). Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 323-330.

Woo, S. L., Hermosa, R., Lorito, M., & Monte, E. (2023). *Trichoderma*: A multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 312-326.

Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., ... & Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1).

Xie, X. Q., Wang, J., Huang, B. F., Ying, S. H., & Feng, M. G. (2010). A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal pathogen. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1543-1553.

Xu, X., Dailey, A. B., Talbott, E. O., Ilacqua, V. A., Kearney, G., & Asal, N. R. (2010). Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in US adults. *Environmental health perspectives*, 118(1), 60-66.