



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di laurea magistrale in Scienze Forestali ed Ambientali

PROVE DI ANTAGONISMO CONTRO ALCUNI PARASSITI DELLE
RADICI DEL CEDRO DELL'ORTO BOTANICO DI PADOVA

Relatore
Prof. Montecchio L.
Correlatore
Dott. Linaldeddu B. T.

Laureanda
Barbara Ruzzon
Matricola n.
1140642

ANNO ACCADEMICO 2017/2018

INDICE

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	9
<i>L'ORTO BOTANICO DI PADOVA</i>	9
<i>CONDIZIONE FITOSANITARIA</i>	11
<i>VULNERABILITÀ IDROLOGICA</i>	11
<i>DEPERIMENTO E MARCIUME RADICALE</i>	12
<i>IL CEDRO DELL'HIMALAYA</i>	15
<i>LOTTA BIOLOGICA</i>	18
OBIETTIVI.....	21
MATERIALI E METODI.....	23
<i>CAMPIONAMENTO</i>	23
<i>ISOLAMENTO E RICONOSCIMENTO MORFOLOGICO</i>	23
<i>IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI</i>	24
<i>PROVE DI ANTAGONISMO</i>	25
RISULTATI.....	29
<i>ISOLAMENTO</i>	29
<i>IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI</i>	30
<i>PROVE DI ANTAGONISMO</i>	32
DISCUSSIONE.....	37
CONCLUSIONI	41
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	43
ALLEGATI.....	46

RIASSUNTO

L'Orto botanico di Padova ospita nella sua collezione numerosi alberi monumentali che rivestono un ruolo di prim'ordine nel rappresentarne l'importanza storica e botanica.

Tra questi vi è il bicentenario *Cedrus deodara* Roxb G.Don che risulta essere il primo esemplare di questa specie importato in Italia nel 1828.

Sebbene si sia manifestato un diffuso stato di deperimento in buona parte della componente arborea dell'Orto Botanico, le condizioni fitosanitarie del Cedro si sono rivelate tra le più gravi, rendendo necessaria la pianificazione di interventi atti a migliorarne la stabilità e ad aumentarne la vigoria.

Il presente lavoro si è inserito proprio in quest'ambito e attraverso lo studio della micoflora presente nell'apparato radicale del Cedro, ha permesso di isolare generi fungini noti per essere comuni agenti di marciume radicale, come *Fusarium spp.*, *Cylindrocarpon spp.* e *Armillaria spp.*, contestualmente ad altri con comportamento antagonistico del genere *Trichoderma*.

Mediante l'allestimento di prove di antagonismo *in vitro* tra le diverse colonie fungine ed opportune analisi dei risultati si è potuto valutare quale fosse il migliore trattamento di controllo biologico da utilizzare in campo, per rallentare l'azione dei microrganismi parassiti che hanno colonizzato l'apparato radicale del Cedro.

ABSTRACT

The Botanical Garden of Padua holds in its collection several monumental trees that play a major role in showing its historical and botanical importance. Among these, the bicentennial *Cedrus deodara* Roxb G. Don is reported as the first of its species imported in Italy, in 1828.

Although a widespread root and wood decay in many of the oldest trees located in the Botanical Garden, phytosanitary conditions of the *Cedrus* are the most serious, making a management plan necessary to improve quickly its stability and to increase its vigour.

Through a detailed survey, the main components of its root mycoflora were isolated, showing a high presence of both tip's parasites (i.e. *Fusarium spp.*, *Cylindrocarpon spp.*, *Armillaria spp.*) and fungal antagonists (*Trichoderma spp.*).

Laboratory tests allowed to suggest a biological control treatment directly in field using *Trichoderma*, to slow down the action of root parasites already present in the *Cedrus* root system.

INTRODUZIONE

L'Orto Botanico di Padova

L'Orto Botanico di Padova fu istituito nel 1545 per volere del Senato della Repubblica Veneta, in accoglimento alle istanze presentate da dottori e studenti dell'Ateneo patavino.

Da tempo infatti si avvertiva la necessità di creare un luogo dove poter disporre di una collezione botanica che agevolasse gli studenti nello studio e riconoscimento delle erbe medicinali di cui leggevano sui libri.

Da quando fu fondato ad oggi ha ispirato molti studi concernenti il rapporto tra Uomo e Natura e ha affascinato innumerevoli visitatori con la sua grande varietà botanica.

L'Orto Botanico di Padova è inoltre il più antico orto botanico del mondo ad aver mantenute inalterate posizione e struttura nei secoli, caratteristica che insieme ai motivi sopra citati, gli ha valso l'inserimento nella lista dei patrimoni mondiali dell'umanità da parte dell'Unesco nel 1997.

La motivazione proposta in quell'occasione fu la seguente:

“L'Orto Botanico di Padova è all'origine di tutti gli orti botanici del mondo e rappresenta la culla della scienza, degli scambi scientifici e della comprensione delle relazioni tra la natura e la cultura. Ha largamente contribuito al progresso di numerose discipline scientifiche moderne, in particolare la botanica, la medicina, la chimica, l'ecologia e la farmacia.”

L'area su cui sorge era di proprietà dei Monaci Benedettini di Santa Giustina e già prima della sua edificazione, veniva utilizzata dall'Ordine per la coltivazione delle piante officinali.

Da quanto documentato, i monaci fecero scavare un fossato attorno al terreno, affinché fosse sempre cinto d'acqua e non avesse mai problemi di siccità.

Il canale dell'Alicorno, che tutt'oggi lo circonda, alimenta anche una falda sotterranea che si estende al di sotto dell'intera superficie dell'Orto Botanico; la presenza della falda acquifera riveste da sempre un ruolo fondamentale nel garantire un migliore approvvigionamento idrico alle piante della collezione.

D'altro canto, spesse volte ci furono inondazioni causate dalle acque dell'Alicorno e della falda e per questo, più di una volta i prefetti che si susseguirono alla sua amministrazione, si videro costretti a far aggiungere terreno per innalzare il livello del suolo e a rinforzare gli argini del canale. Ad oggi l'altezza della falda, che è fortemente influenzata dagli eventi meteorologici, oscilla tra i -57cm in inverno e -175cm in estate, con una profondità media di -122cm (Giardini e Morari, 2000).



Figura 1 Planimetria dell'Orto Botanico risalente al 1887 eseguita da Francesco Saccardo

La struttura originale dell'Orto Botanico, che inizialmente si limitava all'area circolare che venne poi circonscritta dalle mura, fu più volte impreziosita con altre strutture, tra le quali numerose fontane, vasche e busti di personaggi celebri. Col passare dei secoli si decise di ampliare la collezione botanica anche al di fuori delle mura dell'*Hortus Cinctus* e fu quindi istituito l'Arboretum dove vennero ospitati numerose piante, alcuni delle quali sono giunte fino ad oggi.

Ci sono infatti diversi esemplari arborei che per il loro valore storico scientifico sono stati considerati alberi storici o monumentali. Tra i più conosciuti va ricordata la famosa Palma di S. Pietro piantata nel 1585, detta anche Palma di Goethe per il fatto che ispirò allo scrittore il suo "Saggio sulla metamorfosi delle piante" pubblicato nel 1790.

Ma anche il maestoso esemplare maschile di *Gingko biloba*, importato nel 1790 su cui venne successivamente innestato un ramo femminile a scopo didattico e la *Magnolia grandiflora* che sembra essere l'esemplare più antico d'Italia, introdotto nel 1786.

Al di fuori delle mura si trovano il Platano orientale piantato nel 1680 reso cavo da un fulmine e il Cedro dell'Himalaya che a quanto documentato è il primo esemplare introdotto in Italia, nel 1828.

Ognuno di questi alberi, contribuisce con la sua sola presenza a dare lustro all'Orto Botanico e alla città di Padova ed è quindi di fondamentale importanza tutelarli e prendersene cura nel migliore dei modi.

Condizione fitosanitaria

Negli anni '90 si assistette ad un progressivo deperimento della collezione botanica, in particolare della componente arborea. Si rese quindi indispensabile procedere con un'indagine fitosanitaria per comprenderne le cause e cercare di contenere i danni agli alberi di maggiore importanza.

Fu l'allora Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Padova che nel 1996 procedette all'analisi delle condizioni edafiche e dello stato fitosanitario delle piante.

Dallo studio emerse che molte di esse presentavano un apparato radicale sofferente.

Anzitutto si riscontrò una bassa vitalità degli apici radicali e buona parte delle radici fini apparivano interessate da necrosi; inoltre gli apici radicali erano scarsamente o per nulla micorrizzati (Rossi, 1997).

Generalmente si stima che un albero maturo abbia circa l'80% degli apici interessati da simbiosi micorriziche. Questa caratteristica gli consente di espandere la superficie assorbente grazie allo sviluppo del micelio fungino che convoglia i nutrienti verso l'apice e di garantirsi una discreta protezione da agenti patogeni a cui viene impedito l'ingresso proprio dalla barriera fisica e dai metaboliti prodotti dal fungo simbiote.

È logico quindi aspettarsi che degli alberi con un apparato radicale in queste particolari condizioni, non siano perfettamente efficienti nell'assorbimento di acqua e nutrienti e a lungo andare possano manifestare sintomi di stress.

Vulnerabilità idrologica

A questa sofferenza radicale, comune alla gran parte degli alberi si aggiunse un altro fattore che verosimilmente aggravò le condizioni di salute degli esemplari più fragili.

In un'area situata al confine est dell'Orto Botanico vennero eseguiti dei lavori edili per la costruzione di un nuovo complesso abitativo che comprendeva anche la costruzione di garage interrati; per l'esecuzione dei lavori fu necessario emungere l'acqua della falda ipodermica che altrimenti avrebbe allagato il cantiere.

Queste operazioni richiesero qualche mese e durante questo arco di tempo il livello dell'acqua della falda diminuì considerevolmente, rimanendo tale fino al compimento dei lavori.

Sebbene alcuni studi sostengano che grazie alle abbondanti precipitazioni di quell'anno, lo stress idrico causato dall'abbassamento della falda sia stato molto limitato, gli stessi ammettono che alcuni individui arborei, che hanno sviluppato il loro apparato radicale per trarre il maggior beneficio dall'acqua presente nel sottosuolo e che comunque risentivano già

dei sopracitati problemi alle radici, possano avere accusato molto più pesantemente di altre piante gli effetti della carenza d'acqua, divenendo così ancor più soggetti all'azione di patogeni secondari (Giardini e Morari, 2000).

La vulnerabilità idrologica dell'Orto Botanico ha fatto sì che venisse inserito nella *List of the Most Endangered Sites 1998-99* redatta dal *World Monuments Fund* e che si procedesse alla realizzazione di un moderno impianto di irrigazione.

Successivamente ai lavori, diverse piante mostrarono sintomi di deperimento tali, da rendere necessari interventi mirati per ognuna di esse; ad oggi alcuni esemplari si sono stabilizzati mentre altri continuano lentamente a deperire nonostante vengano effettuati controlli e operazioni di salvaguardia.

Deperimento e Marciume radicale

Il deperimento è un fenomeno che non si può associare ad una specifica causa biotica o abiotica; è opinione diffusa che esso sia legato alla concomitanza di più fattori che solo quando si manifestano congiuntamente riescono a produrre danni consistenti all'albero, che altrimenti non risentirebbe dell'effetto di ognuno di essi preso singolarmente.

Manion nel 1991 suddivise i fattori in 3 categorie:

- fattori Predisponenti: condizioni del suolo e fattori climatici;
- fattori Scatenanti: insetti defogliatori, siccità, salinità, temperature estreme invernali, infezioni virali, aumento della temperatura del suolo, cambiamento della microflora del suolo;
- fattori Concomitanti: includono gran parte dei fattori prima menzionati, oltre al ruolo svolto dagli insetti xilofagi della corteccia e del legno, funghi patogeni e altri agenti di infezione, gelate tardive o precoci.

La concomitanza di diversi fattori fa sì che la pianta manifesti numerosi sintomi, che però sono tutti estremamente generici come:

- rarefazione della chioma, talvolta preceduta da clorosi fogliari e avvizzimenti (Raddi, 1984) e accompagnata da microfillia;
- emissione di rametti epicormici lungo il fusto e fessurazioni longitudinali della corteccia, talvolta associate a colate mucillaginose (Guillamin et al., 1985; Bakry, 1994; Fellner e Caisovà, 1994);
- riduzione della massa radicale, soprattutto a carico delle radici assorbenti e del numero di apici micorrizzati (Zak, 1964; Schutt et al., 1985; Wargo, 1988; Perrin, 1989).

Una pianta che per lungo tempo è stata indebolita da fattori di stress, non ha abbastanza energie per difendersi da eventuali attacchi di patogeni secondari, che non trovando ostacoli, riescono a penetrare nell'albero colonizzandone i tessuti.

Punti d'accesso preferenziali per questi parassiti sono in genere le aperture nei tessuti, che possono essere dovute a cause naturali (stomi, lenticelle) o artificiali (ferite) e gli apici radicali non micorrizzati. Una volta penetrati si sviluppano nutrendosi dei tessuti dell'albero fino a provocarne la morte.

Il fenomeno del marciume radicale può suddividersi in due categorie:

la prima riguarda i danni causati da microrganismi patogeni che degradano la struttura delle radici di sostegno in piante con apparati radicali sviluppati e con radici legnose di almeno 1cm di diametro; la seconda comprende tutti i danni arrecati dai patogeni alle radici fini e agli apici radicali, cioè a quelle che sono le strutture assorbenti della pianta (Capretti, Ragazzi, 2009).

Nel primo caso la pianta subisce un danno strutturale e viene compromessa irrimediabilmente la sua stabilità con conseguenti rischi di ribaltamento; nel secondo caso invece la pianta soffre per la carenza di nutrienti ed acqua e incorre quindi in condizioni di stress.

Comunemente gli organismi patogeni appartenenti ai phyla *Basidiomycota* e *Ascomycota* sono i maggiori responsabili di marciume radicale di entrambe le categorie sopra citate.

In particolare, i generi *Cylindrocarpon* e *Fusarium* sono comunemente noti come parassiti ai danni delle radici assorbenti, mentre per quanto concerne le radici di sostegno l'agente più diffuso nelle nostre zone è sicuramente *Armillaria spp.*

In Europa si distinguono cinque diverse specie appartenenti al genere *Armillaria*, che differiscono per habitat, tipo di ospite e patogenicità.

Generalmente si comportano da parassiti non obbligati, cioè possono vivere sia su matrici morte che su matrici vive (Capretti, Ragazzi, 2009): nella fase saprotrofa vivono al suolo su resti di legno morto o su fusti morti in piedi e si possono trovare anche appoggiati ad apparati radicali di piante asintomatiche; nella fase parassitica aggrediscono piante già debilitate da altri fattori di deperimento (Butin, 1995).

Il micelio si sviluppa sotto corteccia con una serie di ventagli bianchi, che successivamente si organizzano in fasci di ife; quando le condizioni non sono più ottimali per la crescita del fungo, i fasci di ife che inizialmente erano bianchi, si organizzano a formare grossi cordoni o placche di colore grigio-nero e consistenza rigida ma fragile. Queste strutture di resistenza,

dette rizomorfe, permettono al fungo di sopravvivere esposto all'aria senza disidratarsi e di colonizzare anche ambienti poco favorevoli in attesa che le condizioni migliorino.

Risalendo lungo il fusto, *Armillaria spp.* si nutre della lignina contenuta nei tessuti della pianta, facendo assumere alle cellule una colorazione chiara ed una consistenza soffice e fibrosa dovuta alla presenza della cellulosa che non viene degradata; proprio per questo aspetto la malattia viene definita carie bianca (Capretti, Ragazzi, 2009).

Altrettanto comuni sono le specie appartenenti al genere *Fusarium*, responsabili di danni all'apparato radicale di giovani piante, specialmente semenzali, a tal punto che la loro presenza è molto temuta nei vivai in quanto ne provocano la morte per avvizzimento.

Su esemplari di maggiori dimensioni invece, difficilmente arrivano a causare la morte della pianta, ma sono comunque responsabili di danni all'apparato radicale che ne compromettono la funzionalità, minandone la salute e facilitando l'ingresso a patogeni secondari molto più aggressivi.

Il genere *Fusarium* appartiene agli Ascomiceti e comprende diverse specie più o meno patogene e con aspetto molto diverso tra loro, diffuse praticamente in tutti i suoli e nella rizosfera di molte piante.

Alcune specie agiscono penetrando nelle radici e interferendo con il sistema vascolare della pianta, provocando l'avvizzimento e l'ingiallimento della chioma (*F. oxysporum*); in altri casi si verificano delle lesioni su foglie, fusto e radici che si espandono progressivamente formando cancri che spesso provocano la morte dell'ospite (*F. lateritium*) (Walker, 1981).

Per quanto riguarda il genere *Cylindrocarpon* (anamorfo di alcuni generi tra cui *Dactylonectria* e *Ilyonectria*) anch'esso appartiene agli Ascomiceti ed è comunemente presente nella maggior parte dei suoli e nella rizosfera della gran parte delle piante.

Il micelio ha la capacità di creare spore a sessuate dette clamidospore, con funzione di riserva, in grado di produrre nuovo micelio nel momento in cui vi sia la presenza di essudati prodotti da piante indebolite. Il micelio neo prodotto penetra all'interno della pianta, invadendo i tessuti corticali e vascolari e provocando il marciume radicale (James, 1994).

È doveroso sottolineare che la presenza di agenti patogeni, che subentrano in seguito a condizioni di stress della pianta, rientra nella normale successione ecologica degli eventi, in cui, un individuo malato viene rimosso e degradato per far posto ad altri più adatti a quel particolare ambiente. Purtroppo in realtà urbane o comunque antropizzate come l'Orto Botanico, l'importanza di questa successione di eventi non può essere apprezzata, in quanto

ogni qual volta viene compromessa la stabilità di un albero, questo arreca gravi oneri per le amministrazioni e rischi per la cittadinanza.

Il Cedro dell'Himalaya

In particolare questo studio si è occupato del caso del Cedro dell'Himalaya situato tra la Fontana delle Quattro Stagioni (Porta Est) e la montagnola del Belvedere al confine est dell'Orto Botanico.

Il *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don è una conifera proveniente dalla catena dell'Himalaya; si può trovare dai 1000 ai 3000 m di quota, in ambienti con umidità dell'aria elevata e buona esposizione al sole, con preferenza per i suoli ben drenati, profondi e freschi senza particolari esigenze in fatto di acidità.

Furono gli inglesi i primi ad importare in Europa questa specie nel 1822, utilizzandola a scopo ornamentale per impreziosire parchi e giardini grazie al suo portamento elegante.

Ben presto l'interesse per questa specie si diffuse e sulla base dei documenti a disposizione si può affermare che l'esemplare presente all'interno dell'Orto Botanico, piantato nel 1828, sia il primo ad essere stato importato in Italia.

Ne consegue che questo esemplare rivesta un ruolo di primaria importanza sia dal punto di vista storico che botanico.

Tuttavia oggi le condizioni di salute del Cedro dell'Himalaya non sono delle migliori e ormai da diversi anni la sua situazione sta lentamente ma inesorabilmente peggiorando.

Dopo il primo monitoraggio fitosanitario, ci fu un tentativo di rivitalizzazione dell'apparato radicale che risultava fortemente compromesso dagli agenti di marciume radicale descritti precedentemente, sia per quanto riguarda la stabilità che per la capacità assorbente.

In primo luogo venne asportato il terreno presente intorno al Cedro, per un'area di circa 4m di diametro, attraverso l'utilizzo di apposite apparecchiature ad aria compressa in grado di rimuovere il terreno senza danneggiarne le radici. Venne quindi aggiunto nuovo terreno mescolato ad argilla espansa per permetterne una migliore ossigenazione e favorire la formazione di radici fini assorbenti.

Successivamente vennero posizionati 3 tubi in policarbonato trasparente di 2m di lunghezza per l'osservazione dello sviluppo dell'apparato radicale nel tempo con metodo non distruttivo grazie all'utilizzo dei minirizotroni (Bonifazi, 2005).

In effetti, negli anni seguenti ci fu una grossa produzione di apici radicali e radici assorbenti, che però risultò essere superiore al dovuto ed addirittura eccessiva per quelle che erano le reali esigenze del Cedro.

In occasione dei lavori venne anche asportato un grosso cordone radicale in direzione ovest, che risultava eccessivamente compromesso dall'azione di *Armillaria spp.*, e fu eseguito un primo consolidamento, con l'installazione di un cablaggio fissato ad un albero adiacente.

Come conseguenza alle condizioni dell'apparato radicale, si verificò un progressivo disseccamento della chioma che rese necessari ripetuti interventi di potatura per eliminare le branche morte, sia per motivi estetici che per motivi di sicurezza.

Ad oggi la chioma dell'albero è confinata nella parte sommitale del fusto e continua a diminuire inesorabilmente.

Inoltre a causa della presenza di *Armillaria spp.* fu necessario rimuovere un'ampia porzione di corteccia alta 2,3m e larga 1,5m che viene ancora oggi periodicamente trattata con sali quaternari d'ammonio per contenere la ricomparsa del patogeno.



Figura 2 Porzione del fusto privata della corteccia, rivolta verso il lato sud-est dell'Orto Botanico con particolare del moncone di radice asportato durante il primo intervento di recupero.

Ad aprile di quest'anno, il Cedro è stato sottoposto ad analisi di stabilità condotta secondo la metodologia nota come V.T.A. (*Visual Tree Assessment*) e supportata da una successiva valutazione strumentale eseguita con tomografo sonico (Argus PICUS Sonic Tomograph) da parte del Dott. Agr. Giovanni Morelli.

Come indicato dal nome, la tecnica V.T.A. consiste nell'analisi visiva della pianta per valutarne i difetti e la stabilità sulla base dei segnali esterni che esse presenta, prendendo come riferimento le caratteristiche di un albero perfettamente sano. Nel caso in cui la presenza di difetti necessiti di un ulteriore accertamento, si procede con l'analisi strumentale, che può essere effettuata con metodi invasivi (Resistograph, martello elettronico ad impulsi, frattometro) o non invasivi (termografia, risonanza magnetica, tomografia sonora). Come accennato, per l'analisi strumentale del Cedro è stata utilizzata la tomografia sonora, fatta al livello del colletto (a 10 cm dal suolo), che grazie all'utilizzo di onde sonore e idonei sensori, permette di ottenere indicazioni sulla morfologia interna del fusto attraverso un'immagine rielaborata con falsi colori.

Di seguito viene riportata la diagnosi effettuata dal dott. Morelli sulla base di quanto rilevato dalla tomografia: "L'esame del colletto ha evidenziato la presenza di un processo degenerativo di natura cariogena a carico del cilindro centrale, in posizione eccentrica e con sviluppo preferenziale in direzione Nord-Est [...]. La lesione appare in fase mediamente espansiva."

L'analisi ha quindi confermato che sebbene la presenza di *Armillaria spp.*, sia tenuta sotto controllo, la sua azione continua tutt'ora a danneggiare i tessuti strutturali interni dell'ospite.

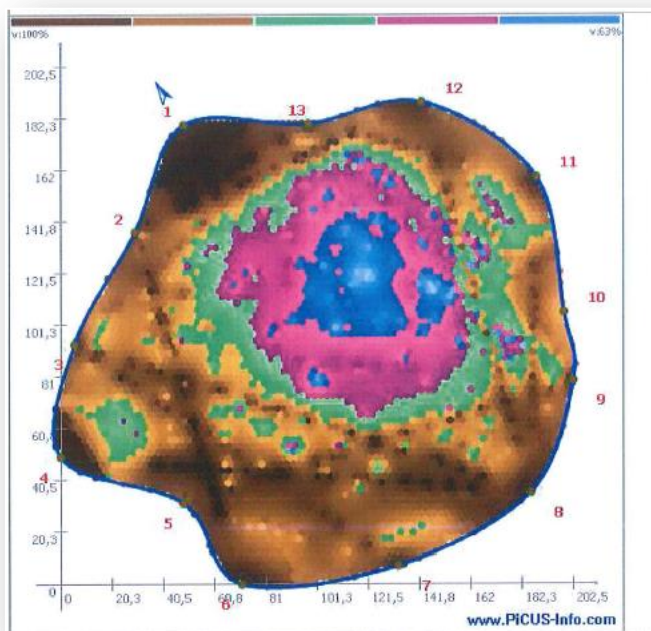


Figura 3 L'immagine riporta il risultato ottenuto con la tecnica della tomografia sonora; i colori dal nero al giallo indicano legno sano, in verde il legno in fase di transizione mentre in rosa e blu il legno cariato. (Fonte: Relazione tecnica a cura del Dott. Agr. G. Morelli)

Dopo i rilievi il Cedro è stato classificato secondo il metodo delle Classi di Propensione al Cedimento (C.P.C) che assegna ogni albero ad una determinata classe, (A, B, C, C/D, D) in base al suo stato fitosanitario.

L'attribuzione del Cedro alla classe C/D (pericolosità elevata) implica l'obbligo di intervenire per ridurre il livello di pericolosità. Gli interventi da eseguire consigliati dal dott. Morelli comprendono l'alleggerimento della chioma di almeno un quarto della superficie fotosintetizzante, rimonda del secco e verifica della funzionalità del consolidamento già presente. Viene inoltre consigliata un'ulteriore indagine da svolgere con modalità a trazione controllata (S.I.M., *Static Integrated Method*).

Il S.I.M. prevede una sollecitazione dell'albero che simuli l'azione del vento, misurandone gli effetti grazie all'utilizzo di un elastometro (valuta la resistenza alla rottura) e di un inclinometro (valuta l'inclinazione dell'apparato radicale) per verificarne la stabilità.

Oltre a questi interventi nel prossimo futuro sono previste altre operazioni finalizzate al miglioramento dello stato di salute del Cedro e al suo consolidamento.

Anzitutto è previsto l'ancoraggio del fusto a tre punti posti circa a 120° di ampiezza tra loro, con due cablaggi di 17m ancorati a plinti di cemento appositamente creati e uno di 21m ancorato ad un albero antistante il Cedro.

Una volta garantita la stabilità si potrà procedere nuovamente con la rimozione del terreno, scoprendo l'apparato radicale, che sarà sostituito da una miscela studiata ad hoc di argilla espansa e terriccio inoculato con funghi antagonisti che possano favorire il rallentamento dell'attività dei parassiti.

Nel caso in cui gli interventi si rivelino efficaci, sarà possibile ricollocare il Cedro in una delle classi di propensione al rischio più basse, previa analisi di stabilità.

Lotta biologica

Ormai da anni la ricerca sta studiando alternative valide per ridurre al minimo l'utilizzo di sostanze chimiche contro i microorganismi patogeni, sia negli ambiti agro-forestali che in quelli urbani, per evitare gli effetti collaterali che certi prodotti di sintesi possono avere sulla salute umana e sulla qualità dell'ambiente (Viminale et al., 2007).

Uno dei metodi più promettenti sembra essere la lotta biologica operata da microorganismi già presenti in natura definiti BCA, biocontrol agents.

Carpanelli definisce la lotta biologica come "l'insieme di tecniche atte alla conservazione e all'uso degli antagonismi esistenti in natura, con la finalità di controllare la densità delle

popolazioni fitofaghe e fitoparassite cercando di limitarle [...]; ciò parte dal presupposto che in natura esistano già organismi che svolgono azione repressiva nei confronti di una data malattia, anche in presenza di condizioni favorevoli allo sviluppo del patogeno e di colture ospiti suscettibili” (Carpanelli, 2000).

Per definizione l’antagonismo è una relazione interspecifica nella quale una o ambedue le specie in relazione subiscono un danno e le cui principali relazioni sono: antibiosi, parassitismo, predazione e competizione.

Per quanto riguarda questo studio, si è focalizzata l’attenzione sulla possibilità di contrastare gli agenti di marciume radicale del Cedro, sia quelli attuali che quelli potenziali, utilizzando la già nota azione antagonista del genere *Trichoderma*.

Questo genere appartenente agli Ascomiceti comprende specie saprotrofe diffuse nei suoli di tutte le fasce climatiche e viene studiato da molti anni proprio per la sua peculiare abilità nel colonizzare un ospite o un ambiente, soppiantando eventuali altre specie presenti.

Ovviamente l’interesse per il genere *Trichoderma* nasce dal fatto che riesce ad interagire antagonisticamente contro gli organismi patogeni, senza nuocere in alcun modo all’ospite.

Le diverse specie sono caratterizzate da rapido accrescimento, con notevole capacità sporigena e grande produzione di enzimi degradatori di parete cellulare (chitinasi, cellulasi, glucanasi) e di sostanze antibiotiche (Hassan et al., 2014).

Il loro utilizzo come BCA fu suggerito già 80 anni fa da Weindling (1932) il quale fu il primo a dimostrarne l’attività parassitica sul patogeno *Rhizoctonia solani* (Chet, 1990; Weindling, 1932).

In seguito, numerosi studi hanno dimostrato come svariate specie di *Trichoderma spp.*, esercitino meccanismi di antagonismo contro funghi considerati patogeni, attraverso diverse strategie di interazione di seguito elencate:

- Antibiosi: produzione da parte del fungo non patogeno di sostanze antibiotiche o metaboliti tossici che esplicano un’azione dannosa su un altro organismo patogeno; comprende la produzione di vari enzimi per la maggior parte chitinolitici, i quali sono responsabili della degradazione della parete cellulare dei funghi, costituita essenzialmente da chitina (Carpanelli, 2000);
- Competizione: attività relativa alla sottrazione di spazio e nutrienti adoperata da un organismo verso un altro;
- Micoparassitismo: processo complesso costituito da più eventi che includono la ricognizione dell’ospite, l’attacco e la successiva penetrazione e uccisione (Hassan et al., 2014).

Altri studi inoltre sottolineano come la presenza di *Trichoderma spp.* attivi l'espressione di geni coinvolti nel sistema di difesa della pianta e promuova lo sviluppo dell'apparato radicale garantendo una maggior disponibilità di risorse nutritive (Hanson and Howell, 2004).

OBIETTIVI

Alla base di questo lavoro vi è la consapevolezza che l'aggravarsi delle condizioni di salute del *Cedrus deodara* dell'Orto Botanico di Padova è da imputare, in larga misura, alla presenza di parassiti fungini dell'apparato radicale.

Partendo da questo presupposto, il primo obiettivo del presente studio consiste nell'individuazione della popolazione di microorganismi già presenti nella rizosfera del Cedro, mediante isolamento in laboratorio dei funghi che ne compongono la micoflora.

In seconda analisi è necessario identificare a livello morfologico e molecolare i principali potenziali parassiti e i loro eventuali antagonisti già presenti all'interno della popolazione campionata.

I generi di maggior interesse, selezionati secondo la loro attitudine, vengono messi a confronto mediante allestimento di prove di antagonismo *in vitro*, che permettano il monitoraggio e la comprensione delle loro interazioni e del loro sviluppo.

Sulla base dei risultati così ottenuti si potranno individuare quale o quali sono i microorganismi che mostrano azione antagonistica più efficace, da poter utilizzare in un eventuale inoculo massivo nel terreno come trattamento di controllo biologico dei patogeni radicali.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Per lo studio della micoflora radicale del Cedro, le radici sono state campionate ad inizio primavera a circa 150 cm di distanza dal colletto dell'albero, dove non erano presenti altre piante legnose nelle immediate vicinanze, così da avere la certezza che le radici prelevate appartenessero al soggetto in esame.

Un campionamento di micelio è stato inoltre eseguito su una vecchia ceppaia presente dietro alla Fontana delle Quattro Stagioni, a pochi metri dal Cedro lungo il confine est dell'Orto Botanico, sulla quale si erano sviluppati dei corpi fruttiferi verosimilmente appartenenti al genere *Armillaria* (fig. 4).

Tutti i campioni sono stati analizzati presso i laboratori di Patologia vegetale del Dipartimento TESAF dell'Università di Padova.



Figura 4 Ceppaia con corpi fruttiferi di *Armillaria* spp. da cui è stato prelevato il micelio.

Isolamento e riconoscimento morfologico

Le radici prelevate sono state lavate in acqua sterile deionizzata con tensioattivo Tween®20, mantenute in agitazione al fine di rimuovere al meglio le particelle di terreno, e risciacquate con ulteriore acqua sterile deionizzata. Le radici così ripulite sono state osservate allo stereomicroscopio e suddivise in 2 categorie, “necrotizzate” e “non necrotizzate”, a loro volta ulteriormente distinte in “apici radicali” “radici fini”, “radici 1”, “radici 2”.

La distinzione nelle 4 sottocategorie è avvenuta in base alla lignificazione del campione e alle dimensioni: “apici radicali” e “radici fini” corrispondevano a campioni non lignificati, “radici 1” comprendevano campioni lignificati di massimo 2mm di diametro, mentre “radici 2” campioni lignificati con diametro superiore ai 2mm.

Dai campioni raccolti dalla ceppaia invece, sono state prelevate delle scaglie di tessuto sottocorticale che si presentavano colonizzate da micelio bianco.

Tutti i campioni ottenuti sono stati posti ad incubare a 22°C in capsule Petri da 90mm di diametro contenenti ciascuna 10ml di PDA (Potato Dextrose Agar, BD Difco™) e chiuse con Parafilm®M, mantenendo la suddivisione tra le diverse categorie. Questa operazione è stata eseguita in cappa a flusso laminare orizzontale.

Al fine di isolare e differenziare tutti i diversi miceli fungini sviluppatisi, i campioni incubati sono stati monitorati con cadenza giornaliera per un periodo di circa 20 giorni e tutte le colonie fungine presenti sono state trasferite singolarmente in capsule Petri di diametro 60mm contenenti il medesimo substrato artificiale.

Ciascuna delle colonie morfologicamente diversa dalle altre, è stata analizzata microscopicamente mediante l’allestimento di vetrini in cappa biologica a flusso laminare verticale e l’osservazione al microscopio ottico Leica DME.

Tra i generi ottenuti, quattro sono stati selezionati per le successive fasi del lavoro; *Cylindrocarpon spp.*, *Fusarium spp.* e *Armillaria spp.*, in quanto ben noti parassiti degli apparati radicali e *Trichoderma spp.* come possibile antagonista dei primi.

Identificazione degli isolati

L’identificazione degli isolati fungini ottenuti nel corso delle indagini è stata effettuata attraverso l’analisi delle sequenze nucleotidiche dell’intera regione degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) incluso il gene 5.8S del rDNA. L’estrazione del DNA fungino è stata effettuata prelevando una porzione di micelio da colonie pure su PDA di 4-8 giorni di età utilizzando il kit Instagene Matrix (BioRad Laboratories, Hercules, CA), secondo le istruzioni della casa produttrice. Attraverso la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata amplificata la regione ITS utilizzando i *primers* universali ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenente: 18,7 µl di H₂O; 10 µl di Buffer 5x; 5 µl di dNTPs; 5 µl di BSA; 5 µl di ciascun primer; 0,3 µl di GoTaq polymerase (Promega); 1 µl di DNA. La reazione d’amplificazione è stata eseguita con un termociclatore (SimpliAmp™ Thermal Cycler), utilizzando i cicli termici riportati da

Linaldeddu et al. (2013). Aliquote di 5 µl di ciascun prodotto di amplificazione e dello standard costituito dal 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) sono stati fatti migrare mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3), usando come tracciante molecolare il SYBR-Safe (Invitrogen™). La dimensione degli ampliconi (bp) così come la loro concentrazione (ng/µl) è stata determinata attraverso il sistema per la documentazione dei gel, VWR® imager2. I prodotti PCR sono stati quindi purificati utilizzando il Kit EUROGOLD Gel Extraction (EuroClone), seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice. I purificati sono stati quindi quantificati ed una aliquota è stata spedita presso i laboratori della BMR Genomics s.r.l. (www.bmr-genomics.it). Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute sia in *forward* che in *reverse* sono stati letti separatamente e poi confrontati, al fine di ottenere una sequenza consenso attraverso il programma FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; <http://www.geospiza.com/finchtv>). La sequenza consenso di ciascun isolato è stata infine confrontata con le sequenze disponibili nel database online GenBank utilizzando il programma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Prove di antagonismo

Gli isolati fungini selezionati per la successiva prova di antagonismo sono stati i seguenti:

- 11 colonie pure appartenenti al genere *Fusarium* di una settimana di sviluppo;
- 4 colonie pure appartenenti al genere *Cylindrocarpon* di una settimana di sviluppo;
- 1 colonia pura appartenente al genere *Armillaria* di due settimane di sviluppo;
- 4 colonie pure appartenenti al genere *Trichoderma* di tre giorni di sviluppo.

La scelta di riferirsi a colonie di età diverse è dipesa dalla differente velocità di accrescimento e di sviluppo degli isolati.

Le tesi formulate sono state 64, con 10 ripetizioni ciascuna, a cui sono state aggiunte le prove di controllo replicate in ugual misura. Ogni tesi ha previsto una coltura duale per ognuno dei parassiti contro ciascuna delle quattro specie di *Trichoderma spp.* isolate. I controlli di riferimento hanno previsto, invece, una coltura singola per ciascuno dei 20 microrganismi.

Ulteriori 10 tesi eseguite contestualmente alle prime e seguendo il medesimo protocollo, hanno messo a confronto tramite colture duali le quattro diverse colonie di *Trichoderma spp.* utilizzate nello studio; l'analisi dei dati verrà trattata in seguito.

Le tesi sono state predisposte ponendo coppie di plug di micelio di 3mm di diametro in capsule Petri da 90mm contenenti 10mL di PDA, a 4cm di distanza tra loro e a 2,5cm dal margine.

L'operazione è stata eseguita in cappa biologica a flusso laminare verticale e tutto è stato incubato al buio in cella termostata a $20\pm 1^\circ\text{C}$ per 3 giorni.

Per le tesi che hanno riguardato *Armillaria spp.*, la posa dei plug di *Trichoderma spp.* è avvenuta 5 giorni dopo rispetto a quella del parassita; questa precauzione si è resa necessaria a causa della lentezza con cui si sviluppa il micelio di *Armillaria spp.* Il conteggio dei 3 giorni è iniziato quando si è aggiunta alla coltura anche la seconda colonia.

Durante ciascuno dei 3 giorni successivi alla posa dei tondelli, sono state rilevate le aree di accrescimento dai margini di ogni micelio. La scelta preventiva di riportare le aree di accrescimento dopo 24, 48 e 72 ore è stata fatta considerando la velocità di sviluppo dei miceli, il tempo in cui sarebbero ipoteticamente venuti a contatto tra loro e il tempo che avrebbero impiegato ad occupare l'intera superficie della piastra.

Dopo una settimana dall'inizio della prova, sono stati prelevati dei tondelli di 3mm di diametro dalla zona di contatto tra i miceli dei due funghi, con i quali sono state eseguite delle strisciate su PDA, per verificare se entrambi fossero ancora vitali.

Tutte le aree di crescita giornaliera sono state misurate in mm^2 mediante tavoletta grafica Bamboo Fun pen & touch Wacom e software di elaborazione digitale delle immagini ImageJ 1.46r NIH USA.

I dati ricavati sono stati, infine, organizzati con l'utilizzo del software Microsoft Excel e successivamente elaborati statisticamente con il software XLSTAT 2008.4.02 Addinsoft™.

Per uniformare i dati raccolti, le aree misurate in mm^2 sono state convertite in aree d'accrescimento percentuali, posta pari a 100 l'intera superficie della Petri.

Con analisi statistica, sono state verificate preliminarmente le assunzioni di normalità e omoschedasticità richieste per un'eventuale analisi ANOVA, attraverso il test di normalità di Shapiro-Wilk e il test di omogeneità delle varianze di Levene, con $\alpha = 0.05$.

Non avvalorando tali requisiti, in seguito i dati sono stati analizzati con test statistici di tipo non parametrico. In particolare, il test U di Mann-Whitney per il confronto tra coppie di campioni indipendenti e il test Kruskal-Wallis per l'analisi della varianza non parametrica ad una via seguito dal test post hoc di Dunn per confronti multipli.

A tutti i campioni che avevano evidenziato una differenza statisticamente significativa ad un livello $\alpha = 0.05$ rispetto al controllo nel test di Mann-Whitney, si è attribuito un Indice di inibizione percentuale (Iin%) calcolato secondo la seguente formula:

$$\mathbf{Iin\% = (1-AT/AC)*100}$$

dove AT equivale all'area di accrescimento percentuale del parassita messo in coltura duale con *Trichoderma spp.* e AC corrisponde all'area di accrescimento percentuale dello stesso parassita nella tesi di controllo (Gautam e Gupta, 2014).

L'attività antagonistica di *Trichoderma spp.* contro i generi *Fusarium*, *Cylindrocarpon* e *Armillaria* è stata valutata dopo 20 giorni di incubazione a temperatura ambiente, utilizzando un indice di antagonismo (IA) calcolato secondo la metodologia proposta da Badalyan et al. (2002), riportata in Tabella 1.

Secondo questo metodo le interazioni tra le colonie di specie a confronto si suddividono in 7 diversi comportamenti, ognuno dei quali corrisponde ad un punteggio specifico.

L'indice di antagonismo è calcolato secondo la formula:

$$IA = \sum n \times i$$

dove *n* rappresenta la frequenza di ogni tipologia di comportamento e *i* il relativo valore.

In Tabella 1 si riportano i diversi tipi di interazione con relativa descrizione e punteggio.

Tabella 1 Tipi di interazione e relativi punteggi per il calcolo dell'Indice di Antagonismo secondo il metodo proposto da Badalyan (2002).

Tipo di Interazione	Natura dell'Interazione	Valore
A	Arresto della crescita delle colonie per contatto con reciproca inibizione	1
B	Arresto a distanza senza contatto miceliare	2
C	Crescita di una colonia sull'altra senza arresto iniziale	3
CA1	Parziale crescita di una colonia sull'altra dopo arresto per contatto	3.5
CA2	Completa crescita di una colonia sull'altra dopo arresto per contatto	4.5
CB1	Parziale crescita di una colonia sull'altra dopo arresto a distanza	4
CB2	Completa crescita di una colonia sull'altra dopo arresto a distanza	5

L'ultima fase dello studio si è concentrata sulle prove di antagonismo *in vitro* effettuate tramite colture duali tra i diversi *Trichoderma sp.* Il protocollo seguito è stato il medesimo utilizzato per le precedenti prove sia per l'allestimento sia per la raccolta dati. Anche in questo caso le aree di accrescimento sono state misurate in mm² e successivamente trasformate in aree di accrescimento percentuali.

Sono stati infine utilizzati i dati rilevati il terzo giorno di incubazione per verificare se vi fossero delle interazioni positive o negative tra i quattro *Trichoderma sp* monitorati in questo studio.

RISULTATI

Isolamento

Dai campioni di radici raccolti dal Cedro dell'Himalaya sono state isolate 50 colonie fungine morfologicamente diverse tra loro che sono state attribuite a 15 differenti generi attraverso il riconoscimento microscopico. In Tabella 2 si riporta per ogni genere la zona radicale da cui è stato isolato.

Tabella 2 Elenco dei generi identificati e ambito da cui sono stati isolati;
A.R. = apici radicali; R.F. = radici fini; R.1 = radici 1; R.2 = radici 2.

Genere	Non necrotizzate				Necrotizzate			
	A.R.	R.F.	R.1	R.2	A.R.	R.F.	R.1	R.2
<i>Alternaria</i>								•
<i>Arthrinium</i>				•			•	
<i>Cladosporium</i>					•			
<i>Curvularia</i>					•			
<i>Cylindrocarpon</i>					•			
<i>Cylindrocladium</i>			•		•	•	•	•
<i>Fusarium</i>		•	•	•	•		•	•
<i>Mortierella</i>				•				
<i>Penicillium</i>	•				•			
<i>Pestalotia</i>					•			•
<i>Phoma</i>				•	•			
<i>Phomopsis</i>					•		•	
<i>Pithium</i>			•					•
<i>Rhizopus</i>		•			•			
<i>Trichoderma</i>		•	•		•			•

Come già specificato, *Armillaria spp.* è stata isolata dal materiale campionato da una ceppaia situata non lontano dal Cedro e non dal suo apparato radicale; per questo motivo non viene riportata in tabella.

Identificazione degli isolati

L'identificazione delle 20 colonie selezionate è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS dell'rDNA.

Nello specifico si sono ottenute similarità elevate con le sequenze i cui accession numbers vengono riportati in Tabella 3.

In tabella vengono anche riportati il codice di riferimento di ciascuna colonia, il relativo binomio latino, il numero di paia di basi che compone la sequenza consenso e la percentuale di similarità tra la sequenza consenso e le sequenze depositate in GenBank e, quando possibile in CBS, oltre ai codici di accesso delle sequenze stesse.

Per ogni microorganismo viene allegata la sequenza in formato FASTA ottenuta dall'analisi molecolare e utilizzata per l'identificazione (Allegato 1).

Ciascuna colonia identificata è stata utilizzata nella successiva fase del lavoro, l'allestimento di colture duali e singole per le prove di antagonismo *in vitro*. In questa fase dello studio, le colonie appartenenti alla stessa specie sono state distinte in differenti morfotipi (Tavola I, II, IIIa degli Allegati) mantenendo comunque il codice di isolamento originale come riportato successivamente in Tabella 4.

Tabella 3 Elenco delle specie fungine identificate tramite l'analisi molecolare. Vengono riportati i codici identificativi, il binomio latino, il numero di paia di basi sequenziate, la similarità con le sequenze disponibili online nel database GenBank e CBS di cui si riporta l'accession number. Il simbolo ^T identifica le sequenze type.

Codice	Nome	Paia di basi	Similarità	CBS code	GenBank code
T1	<i>Trichoderma atroviride</i>	543	100%	CBS 142.95	AY380906
T2	<i>Trichoderma harzianum</i>	526	100%		MG807335
T3	<i>Trichoderma harzianum</i>	526	100%		MG807335
T4	<i>Trichoderma harzianum</i>	555	100%		MF780869
AL	<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	480	100%	CBS 112615 ^T	AY677290
AM	<i>Ilyonectria sp.</i>	486	100%		LC133822
AW	<i>Ilyonectria sp.</i>	486	100%		LC133822
BI	<i>Dactylonectria torresensis</i>	481	100%	CBS 129086 ^T	JF735362
C	<i>Fusarium oxysporum</i>	480	100%	CBS 133023	KF255448
F	<i>Fusarium oxysporum</i>	480	100%		MH410498
N	<i>Fusarium graminearum</i>	480	100%		KP003943
P	<i>Fusarium oxysporum</i>	480	100%		MH410498
AB	<i>Fusarium solani</i>	502	100%		KT313633
AC	<i>Fusarium graminearum</i>	480	99%		KP003943
AP	<i>Fusarium lateritium</i>	459	99%		FN547424
AV	<i>Fusarium oxysporum</i>	480	100%		MH410498
BD	<i>Fusarium lateritium</i>	459	100%		FN547424
BE	<i>Fusarium oxysporum</i>	480	100%		MH410498
BF	<i>Fusarium oxysporum</i>	480	100%		MH410498
ARM	<i>Armillaria mellea</i>	821	99%		JN657464

Prove di Antagonismo

Dall'esecuzione delle prove d'antagonismo si sono ottenuti i dati relativi agli accrescimenti giornalieri rilevati il primo, secondo e terzo giorno. Nell'Allegato 2 si riportano i valori delle aree di accrescimento misurati il terzo giorno di incubazione, trasformati in percentuale considerando pari a 100 l'intera superficie della Petri.

Come si può vedere per ogni parassita si sono ottenuti 5 campioni, il primo costituito dalle aree di accrescimento del controllo in coltura singola e altri quattro riportanti le aree di accrescimento della colonia parassita in coltura duale con ciascun antagonista.

Mediante il test U di Mann-Whitney per il confronto tra coppie di campioni indipendenti ogni campione ricavato dalle colture duali è stato confrontato con il rispettivo controllo.

Per tutti i campioni che hanno mostrato una differenza statisticamente significativa dal controllo ad un livello $\alpha = 0,05$ si è proceduto con il calcolo dell'Indice di inibizione (Iin%), mentre ai campioni che non mostravano tale differenza è stato assegnato un Iin% = 0,00 (Tabella 4).

Le successive analisi hanno evidenziato le differenze statisticamente significative per ogni *Trichoderma sp.* in base all'efficacia nell'inibire lo sviluppo della colonia del patogeno (Tab. 4). Di seguito si riporta il valore percentuale complessivo relativo alla frequenza di efficacia (f.e.%) per ciascun *Trichoderma sp.* secondo i risultati ottenuti:

*Trichoderma atroviride*_T1 è risultato il più efficace nel 62.5% dei casi

Trichoderma harzianum morf.1_T2 è risultato il più efficace nel 6.25% dei casi

Trichoderma harzianum morf.2_T3 è risultato il più efficace nel 18.75% dei casi

Trichoderma harzianum morf.3_T4 è risultato il più efficace nel 31.25% dei casi.

Tabella 4 Indice di Inibizione percentuale (Iin%) calcolato per ogni campione statisticamente diverso dal controllo in accordo con il test di Mann-Whitney; gli apici riportano i risultati dell'ANOVA non parametrica e del post hoc test di Dunn.

%	<i>Trichoderma atroviride</i> T1	<i>Trichoderma harzianum</i> morf.1 T2	<i>Trichoderma harzianum</i> morf.2 T3	<i>Trichoderma harzianum</i> morf.3 T4
<i>Dactylonectria macrodidyma</i> _AL	48.66 ^A	36.04 ^B	29.35 ^B	54.86 ^A
<i>Ilyonectria</i> sp. morf.1_AM	0.00	0.00	23.22	0.00
<i>Ilyonectria</i> sp. morf.2_AW	0.00	0.00	0.00	24.05
<i>Dactylonectria torresensis</i> _BI	35.06 ^A	7.44 ^C	15.59 ^{BC}	29.50 ^{AB}
<i>Fusarium solani</i> _AB	23.23	0.00	0.00	0.00
<i>Fusarium graminearum</i> morf.1_N	46.35 ^A	20.05 ^B	22.40 ^B	24.53 ^B
<i>Fusarium graminearum</i> morf.2_AC	32.92 ^{AB}	19.97 ^B	38.31 ^A	32.03 ^{AB}
<i>Fusarium lateritium</i> morf.1_AP	0.00	0.00	0.00	21.86
<i>Fusarium lateritium</i> morf.2_BD	24.67 ^A	0.00	14.42 ^B	15.57 ^B
<i>Fusarium oxysporum</i> morf.1_C	36.08 ^A	19.22 ^{BC}	14.67 ^C	27.80 ^{AB}
<i>Fusarium oxysporum</i> morf.2_F	31.67 ^A	12.59 ^B	14.97 ^B	23.13 ^{AB}
<i>Fusarium oxysporum</i> morf.3_P	33.97 ^A	21.83 ^B	0.00	16.23 ^B
<i>Fusarium oxysporum</i> morf.4_AV	25.54 ^{BC}	22.85 ^C	29.44 ^{AB}	33.55 ^A
<i>Fusarium oxysporum</i> morf.5_BE	34.77 ^A	9.11 ^C	25.34 ^{BC}	33.48 ^{AB}
<i>Fusarium oxysporum</i> morf.6_BF	25.73 ^A	14.57 ^B	27.97 ^A	29.91 ^A
<i>Armillaria mellea</i> _ARM	0.00	30.30 ^A	20.02 ^{AB}	21.04 ^{AB}

In Tabella 5 si riportano gli Indici di Antagonismo (IA) stimati per ogni *Trichoderma sp.* mediante la valutazione qualitativa dei comportamenti *in vitro* con ogni parassita.

Tabella 5 Indici di Antagonismo (IA) ottenuti secondo il metodo proposto da Badalyan (2002); viene riportato anche il codice relativo al tipo di interazione osservato per ciascuna tesi.

	AL	AM	AW	BI	C	F	N	P	AB	AC	AP	AV	BD	BE	BF	ARM	IA
T1	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	C	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	C	69
T2	CA2	CB2	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CB1	CA1	A	CA1	A	CA1	CA1	C	49.5
T3	CA1	CA1	CA1	CA2	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	CA1	A	CA2	A	CA2	CA2	C	54.5
T4	CA2	C	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA1	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	CA2	C	68

In Figura 5 vengono accostati i valori stimati relativi alla frequenza di efficacia percentuale (f.e.%) per ciascun *Trichoderma sp.* con gli Indici di Antagonismo ottenuti mediante il metodo di Badalyan.

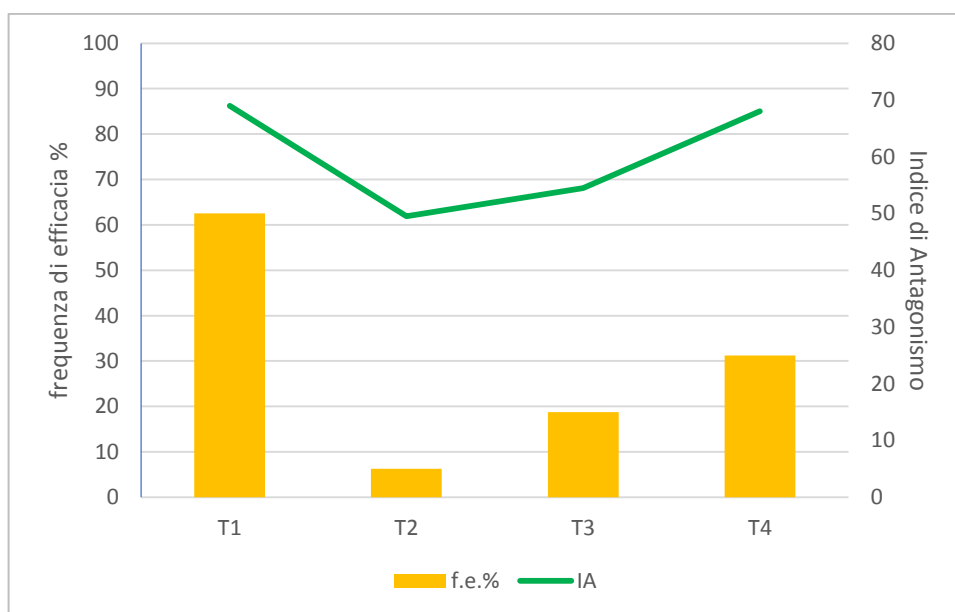


Figura 5 Confronto tra la frequenza di efficacia percentuale (f.e.%) e l'Indice di Antagonismo stimato per ogni *Trichoderma sp.*

Relativamente alle prove di antagonismo allestite tra i diversi *Trichoderma sp.* sono stati considerati i valori corrispondenti al terzo giorno di misurazione (Allegato 3) che sono stati mediati per monitorare l'andamento *in vitro* dello sviluppo delle colonie stesse (Tab.6).

Tabella 6 Accrescimento medio percentuale relativo alle colture duali tra antagonisti.

	Area di accrescimento %					Media %
<i>Trichoderma atroviride_T1</i>	50.4	53.3	65.1	56.3	53.1	55.6
<i>Trichoderma harzianum morf.1_T2</i>	51.3	50.5	49.1	47.2	55.0	50.6
<i>Trichoderma harzianum morf.2_T3</i>	53.2	50.9	49.5	53.9	55.9	52.7
<i>Trichoderma harzianum morf.3_T4</i>	53.7	50.1	54.6	56.8	70.3	57.1

DISCUSSIONE

Lo studio della micoflora presente nelle radici del *Cedrus deodara* dell'Orto Botanico di Padova ha permesso di isolare numerose colonie fungine morfologicamente diverse tra loro appartenenti a 15 generi differenti.

Gli isolamenti hanno rivelato la presenza di parassiti fungini su porzioni radicali necrotizzate e non, confermando inoltre la presenza di microorganismi comunemente noti come agenti di marciume radicale appartenenti ai generi *Fusarium*, *Cylindrocarpon* e *Armillaria*. Contestualmente sono stati isolati anche funghi con riconosciute capacità antagonistiche del genere *Trichoderma*.

Dall'analisi molecolare è emerso che alcune delle 20 colonie selezionate per le prove di antagonismo appartenevano alla stessa specie pur presentando delle differenze morfologiche tali da non poter essere considerate il medesimo microorganismo.

Per un'identificazione genetica più accurata si sarebbe potuta ripetere l'analisi molecolare utilizzando dei primer codificanti altre regioni più specifiche del DNA, ma considerando lo scopo di questo lavoro, ciò non è stato ritenuto necessario.

Per questo motivo, le colonie appartenenti alla stessa specie ma con aspetto differente, sono state comunque distinte tra loro nei diversi morfotipi (Tavole I, II, IIIa degli Allegati).

Per ciascuno dei parassiti fungini identificati sono state osservate le interazioni *in vitro* contro i diversi *Trichoderma spp.* attraverso l'allestimento di prove di antagonismo.

Le prove di antagonismo rappresentano un metodo diretto per osservare le interazioni tra due diversi funghi. Nonostante *in vitro* non si possano ricreare le effettive condizioni ambientali che si troverebbero in natura, permettono comunque di monitorare lo sviluppo di due specie diverse nel momento in cui si trovano costrette a condividere delle risorse limitate.

La diversa abilità nello sfruttamento delle risorse e i diversi meccanismi di sopravvivenza che mettono in atto, possono essere osservati direttamente, monitorando le condizioni in cui ciò avviene. Sebbene la coltura *in vitro* sia una semplice modellizzazione di ciò che accade in realtà, offre comunque ottime basi da cui partire per la successiva sperimentazione in campo dei risultati ottenuti.

La competizione per lo sfruttamento delle risorse e per la colonizzazione degli spazi è uno dei principali meccanismi con cui gli appartenenti al genere *Trichoderma* agiscono nei confronti degli altri microorganismi fungini, limitandone o addirittura inibendone lo sviluppo.

Questo comportamento è presente trasversalmente in tutto il genere ma, come emerso dallo studio, non con la stessa intensità tra le diverse specie; mediante le prove di antagonismo

infatti, si è potuta evidenziare una discreta differenza nell'efficacia nell'inibire lo sviluppo dei parassiti dei diversi *Trichoderma sp.*

In base ai dati ottenuti mediante analisi statistica, riportati in Tabella 4, si è potuto determinare che le colonie di microrganismi patogeni in cui era stato inoculato *Trichoderma atroviride* (T1) hanno subito un'inibizione dell'accrescimento maggiore rispetto alle colonie in coltura duale con gli altri antagonisti.

In particolare, la presenza di *Trichoderma atroviride* (T1) ha provocato una significativa inibizione nello sviluppo delle colonie dei funghi parassiti in più della metà delle tesi sviluppate, mentre *Trichoderma harzianum* morf.3 (T4) e *Trichoderma harzianum* morf.2 (T3) si sono rivelati i più efficaci in meno della metà di esse. Nel caso di *Trichoderma harzianum* morf.1 (T2) pur essendosi dimostrato il meno efficiente nel contenere lo sviluppo degli Ascomiceti, si è rivelato essere il più efficace nell'inibire la crescita del Basidiomicete *Armillaria mellea*. Di particolare interesse risulta quindi il confronto tra le abilità antagonistiche di *Trichoderma atroviride* (T1) e *Trichoderma harzianum* morf.1 (T2) che hanno rivelato comportamenti diametralmente opposti nei confronti di Ascomiceti e Basidiomiceti. Oltre ciò, bisogna considerare che anche gli altri due morfotipi di *Trichoderma harzianum* (T3 e T4) hanno ottenuto risultati soddisfacenti, agendo laddove *Trichoderma atroviride* aveva fallito.

È stata effettuata anche un'analisi qualitativa dei comportamenti osservati *in vitro* applicando il metodo degli Indici di Antagonismo (IA) proposto da Badalyan (2002) che ha portato a risultati non troppo dissimili da quelli ottenuti mediante analisi statistica.

Come riportato in Tabella 5, i valori più elevati sono stati attribuiti a *Trichoderma atroviride* (T1) e *Trichoderma harzianum* morf.3 (T4) che hanno dimostrato un comportamento più aggressivo nei confronti dei funghi parassiti rispetto agli altri antagonisti; nettamente inferiori invece, i punteggi assegnati a *Trichoderma harzianum* morf.2 (T3) e *Trichoderma harzianum* morf.1 (T2). Salvo alcuni casi sporadici, le colonie di *Trichoderma sp.*, non hanno mostrato particolari difficoltà a colonizzare gli spazi occupati dal micelio dei funghi parassiti posti in coltura duale con loro, comportamento che descrive un carattere antagonistico comunque presente, anche se più o meno accentuato a seconda dei casi.

I risultati ottenuti applicando i due metodi fin qui descritti, sono stati accostati in Figura 5; gli istogrammi rappresentano la frequenza di efficacia espressa in percentuale (f.e.%) per ogni *Trichoderma sp.*, mentre la linea spezzata descrive l'Indice di Antagonismo (IA) attribuito ad ognuno. Come si può notare l'andamento delle due serie è grossomodo sovrapponibile ad

indicare che le due analisi, seppur basate su metodologie differenti, hanno condotto a risultati simili.

Con l'ultima fase del lavoro si sono studiate le interazioni tra i quattro *Trichoderma sp* isolati per capire se, trovandosi a condividere risorse limitate, la presenza di uno interferisse con la presenza di un altro. In tabella 6 vengono riportate le aree di accrescimento percentuale medio per ogni *Trichoderma sp*, basate sulle misurazioni effettuate il terzo giorno cioè quando, i miceli delle due colonie poste in coltura duale, avevano già colonizzato l'intera superficie della capsula. Si può notare come in tutti i casi, entrambi i microrganismi abbiano colonizzato almeno il 50% dello spazio disponibile in Petri, indipendentemente dalla velocità con cui si sono accresciuti. Inoltre, in quasi tutte le tesi, ogni colonia ha raggiunto una superficie che superava di poco la metà della capsula: questo è riferibile al fatto che spesso si è assistito ad una leggera sovrapposizione dei miceli nella zona di contatto tra le due colonie.

In tutti i casi, il principale limite imposto da una colonia sull'altra è stato di tipo spaziale; nei giorni successivi ai tre occorsi per le misurazioni, le colonie hanno comunque mantenuto la stessa spartizione spaziale derivata dall'iniziale sviluppo del micelio. La tavola IIIb degli Allegati riporta una prova effettuata a scopo puramente descrittivo, inoculando nella medesima capsula Petri da 90mm di diametro, i quattro *Trichoderma sp.* studiati.

La figura mostra colonie al quinto giorno di sviluppo e come precedentemente descritto per le colture duali, ogni colonia occupa una precisa superficie sovrapponendosi di poco con le colonie limitrofe, ripartendo la Petri in quattro quadranti.

CONCLUSIONI

Dallo studio è emerso che tutti i *Trichoderma sp.* hanno svolto un'azione contenitiva nei confronti dei diversi funghi parassiti, nonostante sia stata descritta una differente aggressività dettata anche dal tipo di patogeno con cui sono stati messi a confronto (Ascomicete o Basidiomicete).

Inoltre è stato evidenziato come i diversi *Trichoderma sp.*, una volta inoculati in uno stesso ambiente limitato, siano riusciti a spartirsi gli spazi e le risorse senza che nessuno primeggiasse sull'altro.

Alla luce dei risultati e considerando il fine ultimo di questo lavoro, sarebbe quindi inopportuno indirizzare la propria scelta verso un unico fungo antagonista, in quanto potrebbe portare a risultati parziali e approssimativi.

La scelta migliore è probabilmente quella di includere tutti i *Trichoderma sp.* tra gli antagonisti da utilizzare nella lotta biologica ai parassiti del Cedro, creando una miscela che opportunamente inoculata nel terreno, possa assicurare un'azione ad ampio spettro e quanto più efficace possibile.

BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

- Badalyan S. M., Innocenti G., Garibyan N. G. (2002), Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea*, 41 (3), 220 – 225
- Barky M., 1994. Problems of Oak decline in Morocco. Estratti del Convegno: “Environmental constraints and oaks: ecological and physiological aspects”, Nancy (Francia), 29 agosto – 1 settembre 1994: 146
- Barnett H. L., Hunter B. B., 1998, Illustrated genera of imperfect fungi. APS PRESS.
- Bonifazi B., 2005, Monitoraggio della dinamica radicale del *Cedrus Deodara* G. Don dell’Orto Botanico di Padova. Tesi di Laurea, Università di Padova, a.a. 2004/2005
- Butin H., 1995, Tree disease and disorders. Causes, biology and control in forest and amenity trees. Oxford
- Capretti P., Ragazzi A., 2009, Elementi di patologia forestale. Patron editore bologna
- Chet I., 1990, Biological Control of Soilborne Plant Pathogens, Hornby D., ed., CAB Intl., Wallingford, UK, pp. 15-25.
- Deriu L., 2009, Selezione di funghi endofiti antagonisti di patogeni forestali. Tesi di Dottorato di Ricerca, Università degli Studi di Sassari, a.a. 2008/2009
- Fellner R., Caisovà V., 1994. Ecological aspects of mycorrhizae decline and oak dying in the Czech Republic. Estratti del Convegno: “Environmental constraints and oaks: ecological and physiological aspects”, Nancy (Francia), 29 agosto – 1 settembre 1994: 142
- Giardini L., Morari F., 2000, Ecosistema e irrigazione dell’Hortus Patavinus. Patron editore bologna.
- Gautam C. and Gupta S., 2014 Antagonistic effect of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* against plant pathogenic fungi and its growth on different agro-waste substrates. *International Journal of Engineering and Technical Research* ISSN: 2321-0869, Special Issue.
- Guillamin J. J., Bernard Ch., Delatour C., Belgrand M., 1985. Contribution à l’étude du dépérissement du Chêne: pathologie racineire en foret de Tronçais. *Annales Sciences Forestière*, 42(1): 1-22
- Hanson, L.E., Howell, C.R., 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 94, 171–176.
- Hassan S.A., Gowen S. R., Pembroke B., 2012, Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascularwilt disease: efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. *Journal of Plant Protection Research*, Vol. 53, No. 1 (2013)

- Index Fungorum, <http://www.indexfungorum.org>
- James, R.L.; Dumroese, R.K.; Wenny, D.L. 1994. Observations on the association of *Cylindrocarpon* spp. with diseases of container-grown conifer seedlings in the inland Pacific Northwest of the United States.
- Linaldeddu B.T., Franceschini A., Alves A., Phillips A.J.L. (2013). *Diplodia quercivora* sp. nov.: a new species of *Diplodia* found on declining *Quercus canariensis* trees in Tunisia. *Mycologia* 105 (5): 1266-1274.
- Meneghini R., 2004, Esiti degli interventi di risanamento sulle dinamiche radicali di un cedro deperiente dell'Orto Botanico di Padova. Tesi di Laurea, Università di Padova, a.a. 2003/2004.
- Mycobank Database, <http://www.mycobank.org>
- National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Perrin R., Estivalet D., 1989. Mycorrhizal association and forest decline (yellowing of spruce). *Agr. Ecosystem and Environment*, 28: 381-387
- Raddi P., 1984. Il deperimento del bosco. Atti del Convegno "Problemi fitopatologici delle piante forestali", Venezia – Mestre 14 dic. 1984, A.R.F.del Veneto
- Rossi S., 1997, Simbiosi ectomicorrizica in alcune piante dell'Orto Botanico di Padova. Tesi di Laurea, Università di Padova, a.a. 1996/1997.
- Schutt P. e Cowling E. B., 1985. Waldsterben, a general decline of forest in central Europe: symptoms, development and possible causes. *Plant Disease*, 69: 548-558
- Watanabe T., 2002, Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. CRC PRESS.
- Walker H. L., *Fusarium lateritium*. A Pathogen of Spurred Anoda (*Anoda cristata*), Prickly Sida (*Sida spinosa*), and Velvetleaf (*Abutilon theophrastii*). *Weed Science*, 1981. Volume 29:629-631
- Wargo P. M., 1988. Root vitality and mycorrhizal status on different health classes of red spruce trees. *Phytopathology* 78: 1533
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplified and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego, pp 315-322.
- Zak B., 1964. Role of mycorrhizae in root disease. *Annals Review of Phytopathologist*, 2: 377-392

ALLEGATI

Allegato 1: Sequenze in formato FASTA ottenute dall'analisi molecolare

>*Trichoderma atroviride* T1

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGGCGGGTTCACGCC
CCGGGTGCGTTCGACAGCCCCGGAACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACCTTTTTCTGTAGTCCCCTCG
CGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTC
CGGGGGTTCGGCGTTGGGGACCTCGGGAGCCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTC
GCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGGCGTCCACGTCCGTAACACAC
CCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Trichoderma harzianum* T2

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGGCGGGATCTCTGCC
CCGGGTGCGTTCGACAGCCCCGGAACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACCTTTTTGTATACCCCTCG
CGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAG
TGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGGTCCACAGCC
GTTAAACACCCA

>*Trichoderma harzianum* T3

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGGCGGGATCTCTGCC
CCGGGTGCGTTCGACAGCCCCGGAACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACCTTTTTGTATACCCCTCG
CGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAG
TGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGGTCCACAGCC
GTTAAACACCCA

>*Trichoderma harzianum* T4

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGGCGGGATCTCTGCC
CCGGGTGCGTTCGACAGCCCCGGAACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACCTTTATTGTATACCCCTCG
CGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCA
AACCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACA
GTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGGTCCACAGC
CGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Dactylonectria macrodidyma* AL

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATTTGTTGCCTCGGGCGGTGCCTGTTCCGA
CAGCCCGCCAGAGGACCCCAAACCCCTGATTACATTTAAGAAGTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGCTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCTCCGCGCCCCGCGTCCCCTAAA
TCTAGTGGCGGTCTCGCTGTAGCTTCTCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGGAAACAGCGCGGCCACGCC
GTTAAACCCCAACTTCTGAACGTTGACCTCGGATCAGG

>*Ilyonectria* sp. AM

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATTATCGTTGCCTCGGCCGGTGCCCGCTTCG
GCGGCCCGCCAGAGGACCCAAACCCCTGAATTTTTATTACAGTTATCTTCTGAGTACATGATTAAATCAATCA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTC
GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGTGGAGATCGGCCGGGCCCTTCGGGGCGCGCCGCCTC
CCAAATATAGTGGCGGTCTCGCTGTAGCTTCTCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGAAAACAGCGCGGCC
ACGCCGTTAAACCCCCCACTTCTGAAAGGTTGACCTCGGATCAGG

>*Ilyonectria* sp. AW

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATTATCGTTGCCTCGGCCGGTGCCCGCTTCG
GCGGCCCGCCAGAGGACCCAAACCCCTGAATTTTTATTACAGTTATCTTCTGAGTACATGATTAAATCAATCA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTC
GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGTGGAGATCGGCCGGGCCCTTCGGGGCGCGCCGCCTC
CCAAATATAGTGGCGGTCTCGCTGTAGCTTCTCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGAAAACAGCGCGGCC
ACGCCGTTAAACCCCCCACTTCTGAAAGGTTGACCTCGGATCAGG

>*Dactylonectria torresensis* BI

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATTATTTGTTGCCTCGGCCGGTGCTGTCCGA
CAGCCCGCCAGAGGACCCAAACCCCTGATTACATTTAAGAAGTCTTCTGAGTAAACCGATTAAATAAATCAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGCTTGGTGTGGGGATCGGCCGAGCCTCCGCGCCCGCGTCCCTAAA
TCTAGTGGCGGTCTCGCTGTAGCTTCTCTGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGGAAACAGCGCGGCCACGCC
GTTAAACCCCCCACTTCTGAACGTTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium oxysporum* C

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATTGTTGCCTCGGCCGGATCAGCCCGCTCC
CGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAA
ATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAAT
TGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC
GTTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium oxysporum* F

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATTGTTGCCTCGGCCGGATCAGCCCGCTCC
CGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAA
ATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAAT
TGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC
GTTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium graminearum* N

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCATTATGTTGCCTCGGCCGGATCAGCCCGCGCC
CCGTAAAAGGGACGGCCCGCCAGGAACCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTATAAAAAACAA
ATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCCAAA
TACATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC
CGTTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium oxysporum* P

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTGCCTCGGCGGATCAGCCCCGTCC
CGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAA
ATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAAT
TGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC
GTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium solani* AB

GATCATTACCGAGTTATACAACCTCATCAACCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGG
CCCTGTAACAACGGGCCGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTTTATAATGTTTTTCTGAGTAAAACAAGC
AAATAAATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGC
ATGCCGTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCAGAAGCCCCCTGTG
GGCACACCGTCCCTCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAA
CTGGAGAGCGGCGCGGCCATGCCGTAAAACACCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGG

>*Fusarium graminearum* AC

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATATCTTATGTTGCCCTCGGCGGATCAGCCCCGCC
CCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACTTCTGAGTATAAAAAACAA
ATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCGAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCCAAA
TACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGC
CGTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium lateritium* AP

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTGCCCTCGGCGGATCAGCCCCGCC
CCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTTCTGAGTAAAACAAA
CAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTGGTATTCCGGCGGG
CATGCCGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCTCACGGCG
GTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCGCTGCAGCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGA
ACGGCGCGCGGCCATGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium oxysporum* AV

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTGCCTCGGCGGATCAGCCCCGTCC
CGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAA
ATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAAT
TGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC
GTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium lateritium* BD

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTAATGTTGCCCTCGGCGGATCAGCCCCGTC
CCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTTCTGAGTAAAACAAA
CAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTGGTATTCCGGCGGG
CATGCCGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCTCACGGCG
GTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCGCTGCAGCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGA
ACGGCGCGCGGCCATGCC

>*Fusarium oxysporum* BE

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCC
CGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAA
ATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAAT
TGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC
GTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Fusarium oxysporum* BF

GATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCC
CGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAA
ATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAAT
TGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC
GTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGG

>*Armillaria mellea* ARM

GATCATTAAATGAACTTGAATTCGTAGCATTGAGAACTGTTGCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCAAAA
GTGTTACGGGTTCTGTTCTAATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGGTTAAGCTTCGCTTTCGAGCGGTTTGAA
GGGTTGCTTGCTTTCGAGCTGAGCTCCGTTTGTCTTACCGAGTCTATGTCTATATAAACTTTTGTATGTTTAGAA
TGCTTTGTTTATAGGACGCAAGTCCTTTAAATGTTATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC
CTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATCTCAACCTCGCCTTCTTTTATTA
CAAGTGGCGTGGATTGGATTATGGGGGTTTGTGCTCTTAACGAGATCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCAG
AAACCGTTTGACTTTGGCTGTAGGCTGTGATAATATCTACGCTTTGGTAGTCGGGTTGGAATATAAAGTGTTA
GAGTGGTAAGGAACTGGCTTAGGATCGGTTTGGAGGGTTGCTTAACGGCTCCTTTTACTTTCTCCCTTTGTTG
GAGATACTTGTCGATTGTAAGAGAGGAAAAGCTTAGCGCAAGCTTAGCTTTCCAAGAGTTTCTTGTACGGCT
TGACTTTGTAGAAGGATTCAGCTTCTAACGGTCCATTGACTTGACAATTTATTGACTATTTGACCTCAAATCA
GGT

Allegato 2 : Aree di accrescimento percentuali relative al terzo giorno di incubazione delle colture duali con parassiti e antagonisti, posta pari a 100 l'intera superficie della Petri.

%	AL	AM	AW	BI	C	F	N	P	AB	AC	AP	AV	BD	BE	BF	ARM
CTR	2.89	2.21	3.65	4.72	8.66	7.92	38.09	11.38	6.14	9.24	1.17	13.59	1.97	7.02	12.53	1.49
	3.28	1.77	4.23	5.08	8.50	7.98	31.44	9.95	6.10	7.03	1.14	12.93	1.70	7.09	12.67	1.79
	3.06	2.65	3.65	5.02	7.46	9.42	36.04	12.14	5.84	6.87	0.99	13.66	1.98	7.35	11.97	1.86
	3.16	2.54	3.85	4.74	8.35	7.93	24.02	12.07	5.74	6.53	1.19	13.55	1.81	7.32	12.44	2.07
	3.13	2.34	5.01	4.69	7.83	7.35	27.75	12.18	5.31	8.55	1.30	13.92	1.91	7.88	11.95	2.30
	3.06	2.20	4.58	4.66	6.56	8.56	27.64	11.22	5.00	8.76	1.17	14.18	2.01	7.07	11.56	1.91
	3.15	2.46	4.72	4.71	7.44	7.48	40.01	11.77	6.11	7.16	1.12	13.64	1.99	7.15	12.52	1.65
	3.09	2.48	6.11	4.70	7.48	7.96	37.55	10.15	5.66	7.75	1.28	12.63	2.21	7.14	11.97	1.66
	3.24	2.66	6.27	4.40	8.07	7.83	37.89	9.83	6.14	8.17	1.32	12.98	2.10	7.47	13.17	1.36
	3.08	2.65	5.38	4.46	9.05	7.28	25.79	8.67	6.16	8.97	1.13	13.04	1.92	6.90	10.85	1.65
T1	1.54	2.42	3.96	2.82	5.08	5.29	16.01	6.39	4.68	4.79	1.12	9.98	1.49	4.92	8.59	1.60
	1.61	0.82	4.63	2.92	4.95	5.46	15.95	7.59	4.01	5.42	1.10	10.36	1.58	4.51	8.57	1.68
	1.71	2.05	4.66	2.91	5.12	5.83	20.47	6.32	4.30	4.69	1.20	10.37	1.46	4.68	8.71	2.15
	1.76	1.97	4.53	2.97	4.47	4.66	22.43	7.21	4.57	5.22	1.10	9.95	1.67	4.40	8.99	1.56
	1.68	2.13	4.23	3.06	5.14	4.66	19.05	6.82	4.51	6.37	1.18	9.79	1.35	5.17	9.95	1.37
	1.60	2.01	4.31	3.29	5.85	6.30	12.74	7.82	4.74	4.98	1.14	9.74	1.69	5.03	9.29	1.47
	1.53	2.94	4.17	3.05	4.85	5.45	17.12	7.43	4.67	4.70	1.04	9.71	1.64	4.63	8.94	1.69
	1.59	3.17	3.90	3.41	5.22	5.77	16.94	7.39	4.48	5.25	1.05	9.96	1.27	4.56	8.74	1.37
	1.71	0.73	3.69	2.93	4.68	5.35	17.60	7.63	4.30	5.63	1.06	9.72	1.45	4.47	9.17	1.28
	1.73	1.14	3.82	3.17	5.15	5.89	16.60	7.38	4.43	5.94	1.16	10.18	1.46	4.58	9.67	1.45
T2	2.14	1.77	5.82	4.37	5.09	6.40	23.66	9.10	5.09	5.25	1.11	9.56	1.92	5.81	10.53	1.17
	2.16	2.39	5.63	4.23	6.29	7.09	27.37	8.76	5.70	6.23	1.29	10.32	1.85	6.24	10.49	1.29
	1.90	1.76	5.25	4.27	6.92	8.26	28.84	8.66	5.09	6.61	1.17	9.85	1.85	6.76	10.27	1.16
	1.92	2.09	5.36	4.19	6.44	7.22	28.26	8.64	5.52	7.64	1.17	10.40	1.99	6.72	10.61	1.27
	1.94	2.08	4.90	4.61	6.94	6.71	24.48	8.56	5.75	5.79	1.11	10.57	1.84	6.29	10.80	1.10
	2.03	2.29	5.02	4.47	6.67	6.44	24.76	8.66	6.01	6.54	1.34	10.14	1.77	6.56	10.99	1.31
	2.13	1.93	5.80	4.33	6.64	6.62	19.72	7.39	5.63	6.03	1.32	9.93	1.78	6.72	10.34	1.20
	1.98	2.78	5.31	4.25	6.32	6.71	29.60	8.83	5.95	5.59	1.33	10.97	1.92	6.95	10.08	1.27
	2.50	3.06	4.59	4.11	6.30	7.04	28.52	7.73	5.79	6.31	1.13	10.89	1.86	6.77	9.31	1.53
	2.01	2.54	5.08	4.67	6.20	7.45	25.41	8.89	6.17	7.23	1.20	10.76	1.85	6.62	10.81	1.26
T3	1.78	1.31	5.51	4.07	6.17	6.17	26.97	10.55	6.17	4.88	0.99	10.19	1.61	5.30	9.46	1.31
	1.63	1.52	5.37	3.82	7.00	6.93	25.97	10.84	6.23	5.16	1.17	9.89	1.75	5.61	10.36	1.64
	2.09	1.50	4.29	3.75	6.36	6.25	23.64	10.89	6.03	5.60	1.09	8.72	1.82	5.20	9.53	1.29
	2.23	1.32	4.20	3.83	6.87	7.07	23.10	11.55	5.89	4.20	1.11	9.74	1.51	4.88	7.46	2.43
	2.76	2.61	4.56	3.76	7.06	7.99	23.63	10.50	5.64	6.30	1.24	8.82	1.76	5.29	7.64	1.34
	2.35	2.91	4.54	4.15	6.25	6.91	27.53	10.68	5.64	4.74	1.25	9.99	2.03	5.66	8.07	1.35
	2.22	1.80	4.03	4.11	7.18	7.16	27.02	11.56	5.90	4.40	1.23	9.37	1.66	5.24	7.32	1.46
	2.19	1.25	4.76	3.97	6.71	6.78	25.15	10.40	6.00	4.13	0.97	9.34	1.64	5.77	9.85	1.00
	2.06	1.76	4.49	4.17	6.87	5.79	26.84	9.57	5.89	4.31	1.02	9.28	1.64	5.95	9.00	1.18
	2.02	2.42	4.56	4.06	6.94	6.97	23.12	10.20	5.58	5.02	1.02	9.21	1.68	4.88	9.20	1.39
T4	1.97	2.44	3.15	3.20	5.43	6.06	23.59	9.75	6.21	3.74	1.11	8.86	1.62	4.69	8.36	1.60
	1.47	2.15	3.07	3.27	5.98	5.92	21.41	8.92	6.22	4.95	0.90	9.23	1.81	5.02	9.47	1.33
	1.32	1.27	3.10	3.40	5.87	6.50	25.99	8.33	5.98	7.15	0.91	9.24	1.67	5.19	7.17	1.48
	1.43	2.74	3.03	3.32	5.41	5.76	25.84	9.00	5.72	6.59	0.78	8.84	1.59	4.70	7.52	1.38
	1.47	2.20	3.60	3.38	5.24	5.62	23.66	9.23	6.14	6.42	0.91	8.33	1.75	5.01	8.23	1.33
	1.61	0.64	3.68	3.16	5.74	7.04	27.00	9.14	5.82	4.15	0.84	8.85	1.77	4.20	8.95	1.33
	1.48	2.26	4.13	2.90	6.07	6.34	26.18	9.25	6.13	4.80	1.10	8.55	1.69	4.88	8.73	1.45
	1.40	2.10	4.32	3.28	6.12	5.78	23.49	9.36	6.07	4.50	0.75	9.40	1.78	4.50	8.75	1.35
	1.42	2.27	3.67	3.66	5.26	6.46	24.43	9.01	6.36	5.42	0.88	8.77	1.71	4.92	9.05	1.58
	1.33	2.00	4.29	3.57	5.92	6.01	24.47	9.31	5.85	5.99	1.03	8.98	1.50	4.77	9.28	1.39

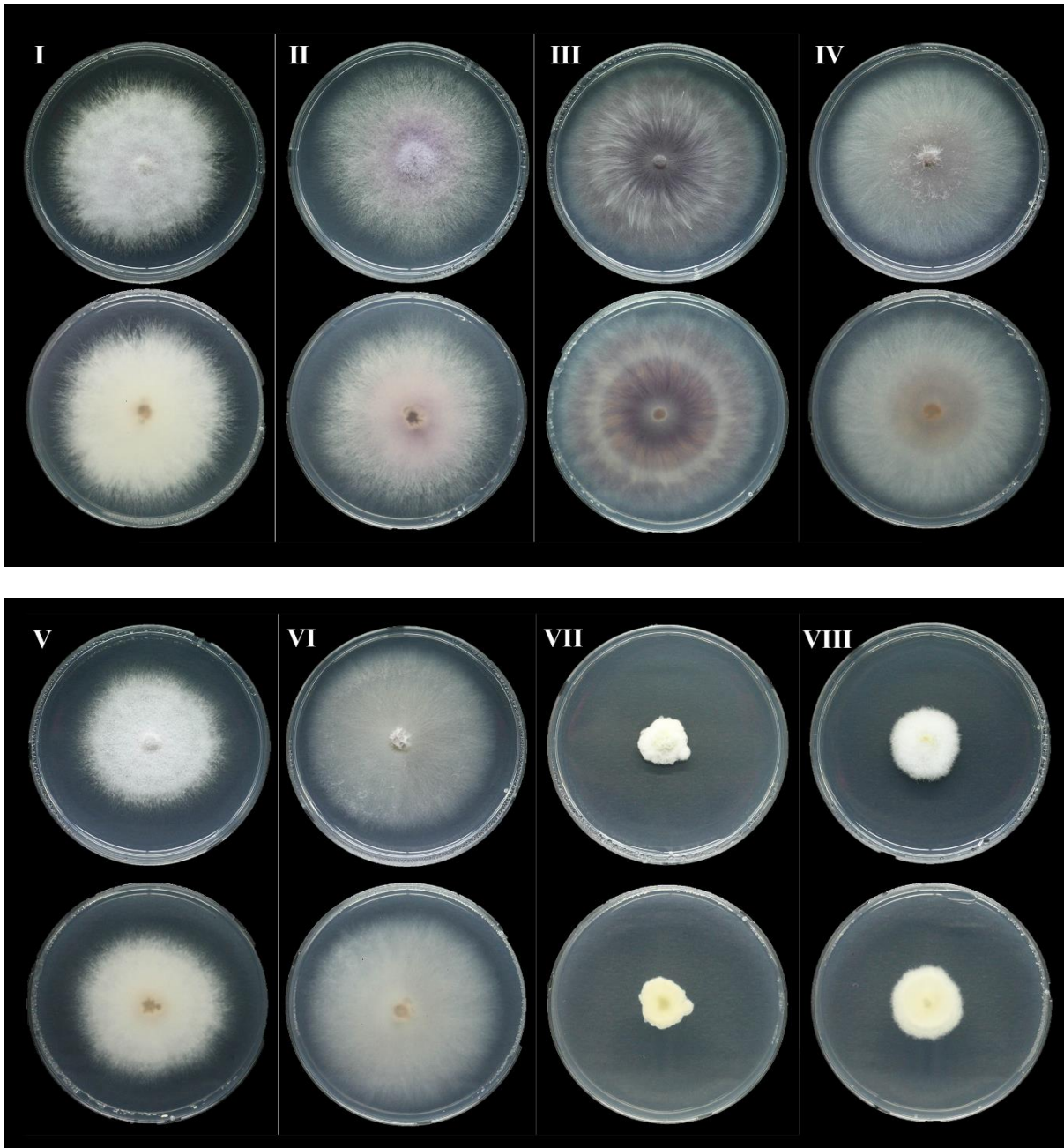
Allegato 3 : Aree di accrescimento percentuale relative al terzo giorno di incubazione delle colture duali con i diversi *Trichoderma sp.*, posta pari a 100 l'intera superficie della Petri.

T1	T1	T1	T2	T1	T3	T1	T4	T2	T2
51.48	52.43	61.31	54.45	55.99	55.62	52.63	71.74	50.49	50.46
51.80	52.66	67.50	53.79	56.00	58.29	52.61	69.12	51.08	50.60
50.23	53.77	64.65	54.71	57.69	54.83	50.99	70.01	50.46	51.33
51.77	51.87	63.65	54.92	54.39	55.73	51.90	68.33	52.65	48.90
48.03	54.57	65.04	56.03	55.04	57.22	55.23	66.30	52.62	50.09
49.58	54.09	66.13	55.57	57.23	55.22	55.66	69.49	51.18	50.79
51.15	52.42	64.63	54.77	56.15	54.59	54.22	69.94	51.69	50.13
49.15	54.22	65.18	55.59	55.24	57.80	52.69	73.43	51.85	50.05
53.05	51.24	67.17	55.13	56.11	56.46	53.26	69.83	51.15	50.77
47.86	55.33	65.30	55.15	58.95	53.69	52.19	74.86	49.31	51.54

T2	T3	T2	T4	T3	T3	T3	T4	T4	T4
50.49	52.62	48.53	55.81	52.73	51.47	50.81	54.11	53.79	49.18
50.58	54.21	48.41	55.21	54.20	50.59	49.16	54.70	55.07	48.68
46.16	56.29	46.30	57.91	53.94	50.07	47.25	56.68	54.68	50.07
49.90	53.06	46.70	57.02	54.43	50.00	49.15	54.33	54.71	49.99
48.32	54.45	49.43	54.99	52.93	50.70	50.63	53.02	50.73	53.84
49.55	54.12	45.94	58.05	52.41	51.18	50.31	53.72	55.48	49.33
48.06	53.01	45.75	58.31	51.28	52.20	49.08	54.74	52.29	50.55
49.90	53.11	46.67	58.07	54.53	49.51	51.16	52.77	53.81	49.36
51.85	51.63	47.34	56.70	52.21	51.67	48.03	55.78	55.83	46.84
46.12	56.78	46.74	55.41	53.51	51.33	48.90	55.86	50.70	53.25

Tavola I

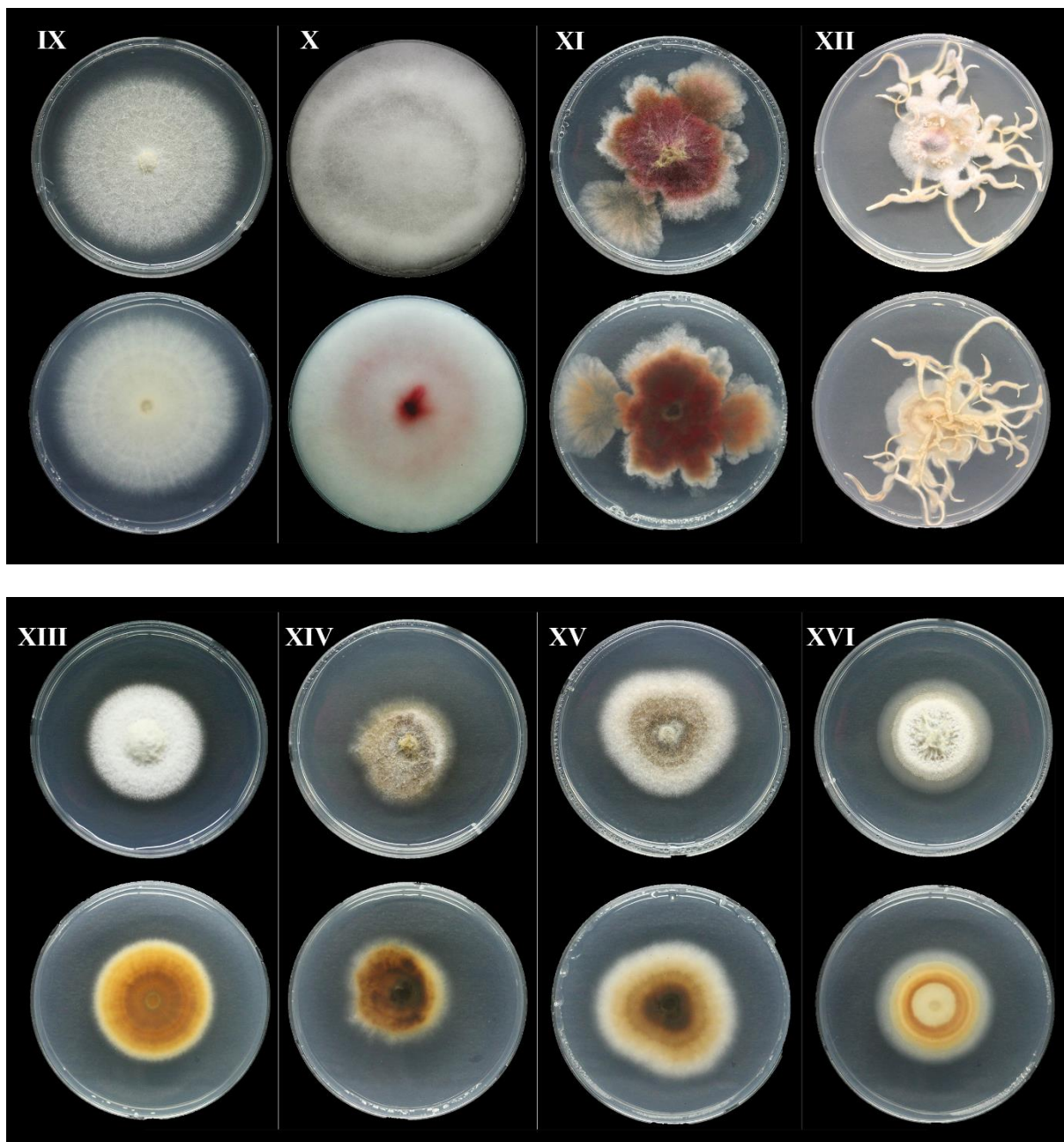
Fotografie fronte-retro delle colonie fungine identificate con l'analisi molecolare, al sesto giorno di incubazione a 20°C.



I *Fusarium oxysporum* morf.1 C; **II** *Fusarium oxysporum* morf.2 F; **III** *Fusarium oxysporum* morf.3 P; **IV** *Fusarium oxysporum* morf.4 AV; **V** *Fusarium oxysporum* morf.5 BE; **VI** *Fusarium oxysporum* morf.6 BF; **VII** *Fusarium lateritium* morf. 1 AP; **VIII** *Fusarium lateritium* morf. 2 BD.

Tavola II

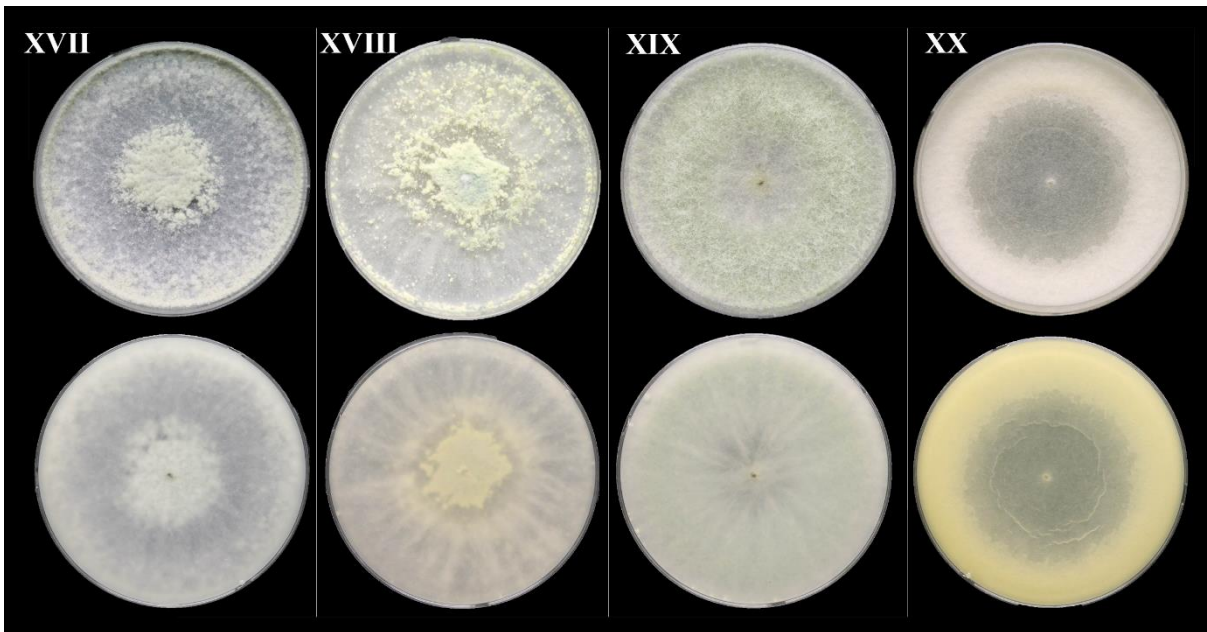
Fotografie fronte-retro delle colonie fungine identificate con l'analisi molecolare, al sesto giorno di incubazione a 20°C; per *Armillaria mellea* al diciassettesimo giorno di incubazione a 20°C.



IX *Fusarium solani* AB; **X** *Fusarium graminearum* morf.1 N; **XI** *Fusarium graminearum* morf.2 AC; **XII** *Armillaria mellea* ARM; **XIII** *Dactylonectria macrodidyma* AL; **XIV** *Ilyonectria* sp. morf.1 AM; **XV** *Ilyonectria* sp. morf.2 AW; **XVI** *Dactylonectria torresensis* BI.

Tavola IIIa

Fotografie fronte-retro delle colonie fungine identificate con l'analisi molecolare, al quinto giorno di incubazione a temperatura ambiente.



XVII *Trichoderma atroviride* T1; **XVIII** *Trichoderma harzianum* morf.1 T2; **XIX** *Trichoderma harzianum* morf.2 T3; **XX** *Trichoderma harzianum* morf.3 T4;

Tavola IIIb

Fotografie fronte-retro di Petri inoculate con i quattro diversi *Trichoderma sp.* utilizzati nelle prove d'antagonismo, al quinto giorno di incubazione a 20°C. I codici assegnati corrispondono a quelli riportati nella Tavola IIIa.

