

PYTHIUM OLIGANDRUM, NUOVO BIOFUNGICIDA PER IL CONTROLLO DI BOTRITE E SCLEROTINIA SU VITE, FRAGOLA E ORTICOLE

S. ALEGI¹, Z. CHROMY²

¹Gowan Italia srl – Via Morgagni, 68, Faenza (RA)

²Biopreparáty, spol. s r.o., Úherce I, Czech Republic
salegi@gowanitalia.it

RIASSUNTO

Polyversum® è un formulato fungicida che contiene *Pythium oligandrum* (ceppo M1), oomicete appartenente alla famiglia delle *Pythiaceae*. *P. oligandrum*, ha un'attività diretta nel controllo di agenti patogeni (micoparassitismo) e/o effetti indiretti, di induzione della resistenza e promozione della crescita. Il microrganismo è molto aggressivo e può attaccare una vasta gamma di ospiti tra cui oltre venti generi di funghi patogeni di interesse agrario. Diversi esperimenti hanno riportato che il trattamento di piante con ife di *P. oligandrum* o con suoi elicitori, quali oligandrine e le proteine della parete cellulare (CWP), inducono l'attivazione di sistemi di resistenza da parte delle piante. Polyversum è registrato in Italia su vite, fragola e colture orticole, in pieno campo e in coltura protetta, per il controllo di *Botrytis* spp. e *Sclerotinia* spp. ed è impiegabile anche in agricoltura biologica. L'indagine di campo, condotta fra il 2010 e il 2015 in Francia, Italia e Spagna attraverso circa sessanta prove, ha dimostrato che, utilizzato come fungicida preventivo alle dosi autorizzate, Polyversum possiede un'elevata attività biologica nei confronti di *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* nelle colture della vite da vino e da tavola, della fragola e della lattuga. Inoltre, l'uso di *P. oligandrum* non influenza i processi fermentativi nonché gli aspetti chimico-fisici ed organolettici dei vini.

Parole chiave: micoparassitismo, *Sclerotinia* spp., *B. cinerea*, resistenza indotta, Polyversum

SUMMARY

PYTHIUM OLIGANDRUM, NEW BIOFUNGICIDE FOR GREY MOLD AND

SCLEROTINIA CONTROL ON GRAPE, STRAWBERRY AND VEGETABLE CROPS

Polyversum® is a novel biofungicide containing *Pythium oligandrum* (strain M1), an oomycete belonging to the *Pythiaceae*. *P. oligandrum* has a direct activity in the control of pathogens (mycoparasitism) and/or various indirect effects such as induced defense responses in plants and plant growth promotion. It is a very aggressive mycoparasite and it can attack a wide range of hosts including more than 20 species of plant pathogenic fungi. Several experiments, carried out over the last years, reported that plants treated with *P. oligandrum* hyphae or its elicitors, such as oligandrin and cell wall proteins (CWP), showed a wide range of defense mechanisms. Polyversum is registered in Italy on wine and table grape, strawberries and vegetable crops (both in open field and green house) for the control of *Botrytis* spp. and *Sclerotinia* spp; it can be used in organic farming. The field tests, conducted between 2010 and 2015 in France, Italy and Spain with about 60 trials, showed that Polyversum, used as a preventive fungicide has a high biological activity against *B. cinerea* and *S. sclerotiorum* in wine and table grape, strawberry and lettuce. Furthermore, the use of *P. oligandrum* does not affect fermentation as well as the chemical-physical and organoleptic features of wines.

Keywords: mycoparasite, *Sclerotinia* spp., *Botrytis cinerea*, induced defense, Polyversum

INTRODUZIONE

Le nuove esigenze nella protezione delle colture agricole spingono verso una progressiva integrazione fra i trattamenti chimici e soluzioni a essi alternative, quali gli agenti di controllo biologico (BCA), la cui presenza nei programmi di difesa di numerose colture è aumentata significativamente negli ultimi anni.

Fra questi è stato recentemente registrato il nuovo agrofarmaco microbiologico Polyversum® a base di *Pythium oligandrum* Dreschler, la cui prima descrizione fu data appunto da Dreschler nel 1930. Si tratta di un oomicete appartenente alla famiglia *Pythiaceae* (ordine *Peronosporales*) a lungo considerato un microrganismo non patogeno (Al-Hamdani e Cooke, 1983; Kilpatrick, 1968; Martin e Hancock, 1986). Il ceppo identificato come M1 (DV74 in USA), derivato da un ceppo selvatico di *P. oligandrum* isolato dal suolo e non geneticamente modificato, è stato incluso il 1 maggio 2009 nell'allegato I della Direttiva 91/414/CE nella categoria dei fungicidi (Direttiva 2008/113/CE dell'8 dicembre 2008). Polyversum, formulato in polvere bagnabile costituita da un supporto siliceo, ha una concentrazione totale minima di unità formanti colonia pari a 1×10^6 UFC/g. Già autorizzato nei Paesi dell'Europa centrale, e in particolare in Repubblica Ceca, Ungheria, Polonia, Slovacchia e Austria alla data della presente relazione, Polyversum è stato immesso in commercio in Italia da Gowan Italia (Decreto n.16654 del 21/7/2017 del Ministero della Salute, tabella 1). Gli studi tossicologici condotti non hanno rilevato alcun pericolo per la salute umana. Inoltre, *Pythium oligandrum* ceppo M1 è un componente naturale dell'ambiente: non sono state, altresì, identificate proprietà dannose per l'ambiente durante la valutazione del rischio. Infine, non sono stati rilevati effetti dannosi sulle api e su altri artropodi e sugli organismi del suolo (Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products - *Pythium oligandrum* M1 Assessment Report, 2015).

Dal 1986, almeno 44 pubblicazioni hanno dimostrato che *P. oligandrum* è attivo nei confronti dei funghi patogeni. Interagisce direttamente con i patogeni attraverso modalità distinte o combinate, come il micoparassitismo, l'antibiosi, la competizione per i nutrienti e per lo spazio, e/o indirettamente inducendo resistenza nelle piante. Inoltre, promuove la crescita della pianta.

Tabella 1. Colture e modalità d'impiego attualmente autorizzate in Italia

Coltura	Avversità	Dose (g/ha)
Vite da vino e da tavola	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>)	200-300
Fragola	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>)	200-300
Ortaggi a foglia, erbe fresche e fiori commestibili	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>), marciume del colletto (<i>Sclerotinia</i> spp.)	200-300
Pomodoro, peperone, melanzana	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>), marciume del colletto (<i>Sclerotinia</i> spp.)	200-300
Cetriolo, zucchini	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>), marciume del colletto (<i>Sclerotinia</i> spp.), oidio (<i>Sphaerotheca fusca</i>)	200-300
Asparago, cardo	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>)	200-300
Fagiolino	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>), marciume del colletto (<i>Sclerotinia</i> spp.)	200-300
Ornamentali	Muffa grigia (<i>Botrytis cinerea</i>)	200-300

Dati disponibili in letteratura, ottenuti da numerose prove *in vitro* e *in vivo*, dimostrano che *P. oligandrum* è un micoparassita molto aggressivo e può attaccare una vasta gamma di ospiti tra cui oltre 20 generi di funghi patogeni di interesse agrario, quali *Botrytis* spp, *Sclerotinia* spp., *Sphaeroteca* spp, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp., *Verticillium* spp., *Rizoctonia* spp., *Pythium* spp., ecc (tabella 2). L'attività di parassitismo di *P. oligandrum* si esplica attraverso la produzione di enzimi idrolitici (chitinasi e cellulasi) che decompongono la parete cellulare degli ospiti e consentono l'assorbimento dei nutrienti dal loro contenuto interno attraverso la penetrazione delle ife *P. oligandrum* all'interno delle cellule e la completa distruzione del citoplasma delle cellule ospiti (Benhamou et al., 1997, 1999; Picard et al., 2000a; Rey et al., 2005). Tale modalità d'azione è mediata da intime interazioni ifali e da antibiosi con alterazione delle ife degli ospiti prima del contatto con l'antagonista stesso. Possiamo ipotizzare che *P. oligandrum* modula la produzione di composti antifungini in base al patogeno bersaglio, utilizzando due strategie: il micoparassitismo, associato agli enzimi idrolitici, o il parassitismo tramite l'antibiosi. La prima strategia sembra più frequente. *P. oligandrum*, quindi, sembra adattarsi ai patogeni fungini e tenta di sopraffarli attraverso il parassitismo diretto, l'antibiosi o una combinazione dei due processi (Benhamou et al., 2012). Questo riflette la molteplicità delle interazioni che esistono in natura.

Tabella 3. Specie di funghi parassitati da *P. oligandrum* con relativo riferimento in letteratura

<i>Agaricus bisporus</i>	Flectcher et al. (1990)
<i>Aphanomyces cochlioides</i>	McQuilken et al. (1990)
<i>Botryotrichum piluliferum</i>	Laing e Deacon (1991)
<i>Botrytis cinerea</i>	Laing e Deacon (1991)
<i>Fusarium culmorum</i>	Laing e Deacon (1991); Mulligan e Deacon (1992)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Laing e Deacon (1991)
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i>	Benhamou et al. (1999)
<i>Fusarium solani f.sp. pisi</i>	Bradshaw-Smith et al. (1991)
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Vesely e Koubova (1993)
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	Bradshaw-Smith et al. (1991)
<i>Ophiostoma</i> spp.	Cizova e Svecova (1997)
<i>Phialophora</i> spp.	Foley e Deacon (1986); Laing e Deacon (1991)
<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i>	Bradshaw-Smith et al. (1991)
<i>Phytophthora megasperma</i>	Benhamou et al. (1999)
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Chang et al. (1993)
<i>Pythium graminicola</i>	Laing e Deacon (1991; Chang et al. (1993)
<i>Pythium irregule</i>	He et al. (1992)
<i>Pythium nunn</i>	Laing e Deacon (1991)
<i>Pythium spinosum</i>	He et al. (1992)
<i>Pythium ultimum</i>	McQuilken et al. (1990); He et al. (1992); Chang et al. (1993)
<i>Pythium vexans</i>	Laing e Deacon (1991; Chang et al. (1993)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Laing e Deacon (1991); He et al. (1992)
<i>Trichoderma aureoviride</i>	Laing e Deacon (1991);
<i>Verticillium albo-atrum</i>	Benhamou et al. (1999)

In alcuni studi è stato dimostrato che il micoparassitismo operato da *P. oligandrum* è anche parzialmente associato alla competizione per i nutrienti: in laboratorio una delle due attività sembra prevalere sull'altra a seconda delle condizioni sperimentali e del tipo di isolati utilizzati (Martin e Hancock, 1986). Tuttavia, Benhamou et al., (2012) riferiscono che studi francesi e giapponesi su *P. oligandrum* descrivono il micoparassitismo e/o la resistenza indotta come le principali modalità di azione. Pertanto, la competizione per lo spazio e i nutrienti è probabilmente un meccanismo minore utilizzato per il controllo biologico da parte del fungo antagonista.

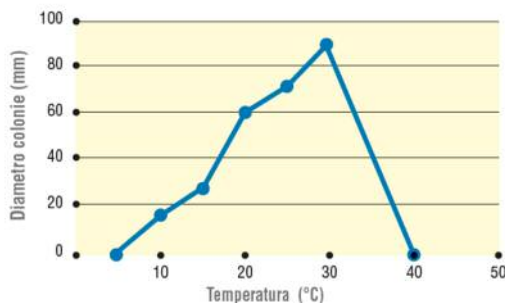
Diversi esperimenti hanno riportato che il trattamento di piante con ife di *P. oligandrum* o suoi elicitori, quali le oligandrine e le proteine della parete cellulare (CWP), inducono l'attivazione di sistemi di resistenza da parte delle piante. Nelle piante, la resistenza a vari funghi patogeni vegetali, quali *B. cinerea*, *P. ultimum* e *R. solani*, sembrano essere indotte da *P. oligandrum* (Benhamou et al., 1997; Brozova 2002; Le Floch et al., 2003a). Questo ampio spettro d'azione nei confronti di numerose specie di funghi patogeni dimostra una stimolazione non specifica delle difese delle piante indotta indirettamente da *P. oligandrum*. Per quanto riguarda la resistenza sistemica, studi condotti nel 2003 (Le Floch et al., 2003a), hanno mostrato una maggiore induzione delle proteine PR, ovvero PR-3b, PR-5a e una nuova isoforma di PR-3b, in piante di pomodoro colonizzate a livello radicale da *P. oligandrum* e poi infettate inoculando sulle foglie il patogeno *B. cinerea*. È interessante notare che la sintesi delle proteine PR è stata attivata solo nelle piante trattate con *P. oligandrum* quando le foglie sono state attaccate dal patogeno. Questo fenomeno, chiamato "priming", corrisponde ad un particolare stato fisiologico in cui le piante innescano i loro meccanismi di difesa più rapidamente e ad un livello più alto quando attaccate da un determinato agente patogeno (Conrath, 2009). *P. oligandrum* produce due tipi di elicitori: oligandrina e CWP, che sembrano essere specifici di questo oomicete (Masunaka et al., 2010). Picard et al., (2000b) hanno scoperto una proteina extra-cellulare chiamata oligandrina estratta dal filtrato di coltura dell'oomicete. Questa proteina da 10 kDa è stata classificata come una proteina simile alla elicitina. L'oligandrina è stata utilizzata con successo per indurre resistenza sistemica nel tabacco contro l'infezione da fitoplasmi (Lherminier et al., 2003), nel pomodoro contro *P. parasitica* e *B. cinerea* (Lou et al., 2011, Picard et al., 2000b) e nella vite contro *B. cinerea* (Mohamed et al., 2007). Questo polipeptide induce risposte di difesa ma senza innescare la reazione ipersensibile (HR) associata alla risposta necrotica (Picard et al., 2000b). Da studi condotti su vite (Mohamed et al., 2007) è emerso che in applicazioni di oligandrina da sola o di un inoculo costituito da oospore di *P. oligandrum* su radici di vite per controllare *B. cinerea*, il livello di protezione nelle foglie delle piante trattate ha raggiunto il 75% e non sono state osservate differenze significative tra il trattato con l'agente di biocontrollo e l'oligandrina. Il secondo tipo di elicitore, classificato come una proteina simile alla elicitina (Takenaka et al., 2006), corrisponde alle proteine della parete cellulare (CWP), codificate POD-1 e POD-2 ed attive nei confronti di numerosi patogeni fungini (*Rhizoctonia solanacearum*, *Fusarium graminearum*, ecc.) (Takenaka et al., 2003).

Il coinvolgimento di *P. oligandrum* nella stimolazione della crescita delle piante è stata anche oggetto di studi condotti da vari autori e associata alla produzione di composti auxinici. Le Floch et al. (2003b) ha riferito che la via della triptamina esiste nelle ife di oomiceti. *P. oligandrum* è in grado di metabolizzare un composto auxinico, la triptamina (TNH2), da triptofano ad acido indolacetico (IAA). TNH2 viene assorbito dal sistema radicale principale e successivamente è stato osservato lo sviluppo delle radici secondarie. In un esperimento di 6 mesi fatto su una coltura senza suolo di pomodoro (Le Floch et al., 2003a) si è evidenziato un aumento della resa dopo la colonizzazione delle radici da parte di *P. oligandrum*. Infine, in esperienze recenti fatte in ambiente controllato hanno evidenziato che vasetti, contenenti semi di pomodoro, irrorati 2

volte con una soluzione contenente *P. oligandrum* (alla semina e dopo 7 giorni) hanno generato piante con un apparato radicale più sano e molto più sviluppato delle piante non trattate (studi interni, 2017). Anche le interazioni tra *P. oligandrum* e le piante ospiti risultano abbastanza peculiari di questa specie. Il fungo ha una relazione atipica con la pianta in quanto, naturalmente presente nella rizosfera, riesce a penetrare rapidamente nei tessuti delle radici pur non essendo sistemico e né in grado di rimanere in vita *in planta*. L'ingresso di *P. oligandrum* all'interno delle radici sembra essere decisamente più veloce e più profondo rispetto a *Trichoderma harzianum* (Le Floch et al., 2009) e il suo ingresso è rapido quanto quello del *Pythium* patogeno; tuttavia al contrario di quest'ultimo, *P. oligandrum* non provoca danni ai tessuti vegetali né sembra alterare la biodiversità della microflora sulle radici. (Rey et al., 1996). Dopo la colonizzazione della radice, a causa dell'effetto elicitorio indotto da *P. oligandrum* al sistema di difesa delle piante, le stesse sono protette da una serie di agenti patogeni.

Studi condotti negli anni '90 hanno descritto il comportamento dell'oomicete in funzione di temperatura e pH. La biomassa e la produzione di oospore di *P. oligandrum* sono state esaminate in un mezzo a base di glucosio e asparagina (Quilken et al., 1992). La produzione ottimale di biomassa si è verificata tra 20 e 35 °C, con una crescita minima inferiore a 10 °C o superiore a 35 °C. La produzione di biomassa era massima tra pH 6 e 7,5 ed era totalmente inibita a pH 4,5 e 9,5.

Figura 1. Temperatura di crescita (Lewis, K., Whipps, J. M e Cooke, R.C., 1989)



P. oligandrum ha due distinti cicli di vita, asessuale e sessuale. Nel ciclo di vita asessuale, *P. oligandrum* esiste come zoospora, una cellula flagellata contenente materiale genetico. La zoospora di *P. oligandrum* è diploide (contiene il genoma completo), ed è un importante stadio del ciclo del fungo oomicete grazie alla capacità della stessa di muoversi attraverso l'acqua mediante il suo flagello. Il ciclo vitale è caratterizzato anche dalla presenza di oospore con pareti spesse. Le oospore sono caratterizzate da spesse pareti cellulari, sono cellule relativamente grandi e sono coperte da escrescenze a forma di spine, che le distinguono dalle altre specie di *Pythium* (figura 3). Il loro stadio maturo è multi-cellulare e filamentoso.

P. oligandrum formulato come Polyversum è utilizzabile in agricoltura biologica: è stato autorizzato secondo il regolamento (CEE) n. 2092/91 poi sostituito dal regolamento (CE) n. 834/2007 del 28 giugno 2007 (vedi allegato II del regolamento (CE) n. 889/2008, modificato con regolamento n. 354/2014 dell'8 aprile 2014. L'efficacia di *P. oligandrum* è stata verificata in diversi studi internazionali e in questi ultimi anni anche in Italia.

Sintesi delle indagini condotte sull'attività biologica di *P. oligandrum* nell'areale mediterraneo

Già autorizzato in diversi Paesi del Centro Europa per il contenimento di alcune fitopatie di colture estensive (*Fusarium* spp. nei cereali tipo frumento e *S. sclerotiorum* nel colza), Polyversum è stato oggetto di una vasta indagine di campo per caratterizzarne l'attività fungicida e valutarne l'efficacia negli ambienti del Sud Europa e nei confronti di agenti patogeni della vite e delle colture orticole dell'areale mediterraneo. L'indagine è stata condotta fra il 2010 e il 2015 in Francia, Italia e Spagna ed ha avuto come obiettivo chiave la valutazione dell'attività e la verifica della possibilità di inserimento in strategie di prevenzione di diverse fitopatie in sostituzione o a complemento di strategie alternative con prodotti di sintesi. Le colture e le fitopatie sulle quali si è concentrata l'indagine sono state vite, fragola, lattughe e altri ortaggi a foglia, pomodoro, peperone, melanzana, zuccina, cetriolo. Circa 60 prove sono state condotte sulle colture sopra indicate, in pieno campo e in coltura protetta; tutte sono state condotte seguendo le linee guida EPPO da centri di ricerca e sperimentazione certificati per la sperimentazione di agrofarmaci. Per ciò che riguarda vite, fragola e lattughe, le colture autorizzate più importanti fra quelle sopra citate, i risultati della sperimentazione, sono qui riassunti a titolo esclusivamente indicativo dell'attività biologica di Polyversum; essi sono indicati nei grafici che seguono come percentuale d'efficacia media rispetto alla coltura non trattata, a confronto con i prodotti di riferimento del mercato. L'utilizzo di Polyversum nelle prove sperimentali è stato fatto seguendo le buone pratiche agricole (meglio note come GAP, Good Agricultural Practices) proposte per l'autorizzazione e successivamente riportate come prescrizioni d'uso nel prodotto commerciale. I prodotti utilizzati come standard di riferimento sono stati applicati secondo le rispettive prescrizioni di etichetta.

Figura 2. Efficacia verso *B. cinerea* su fragola: % controllo su non trattato, media di 3 prove (Italia, Spagna, 2014)

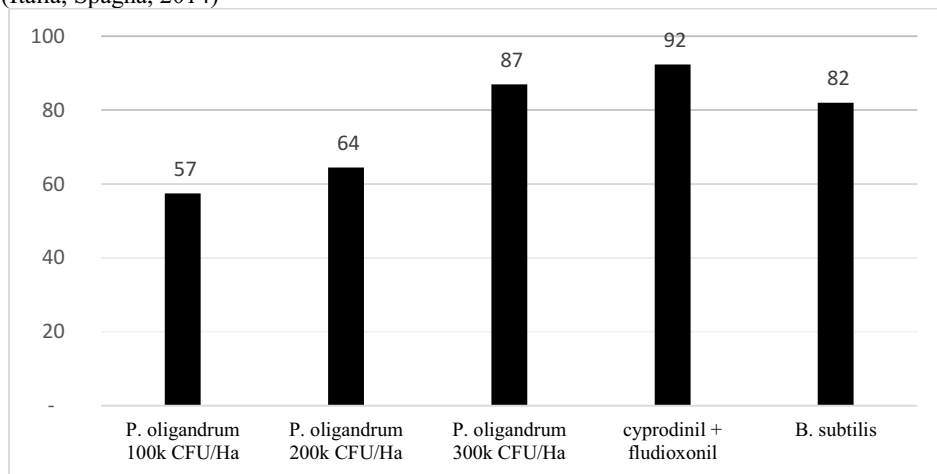


Figura 3. Efficacia verso *B. cinerea* su vite: % controllo su non trattato, media di 10 prove (Italia e Spagna, 2014)

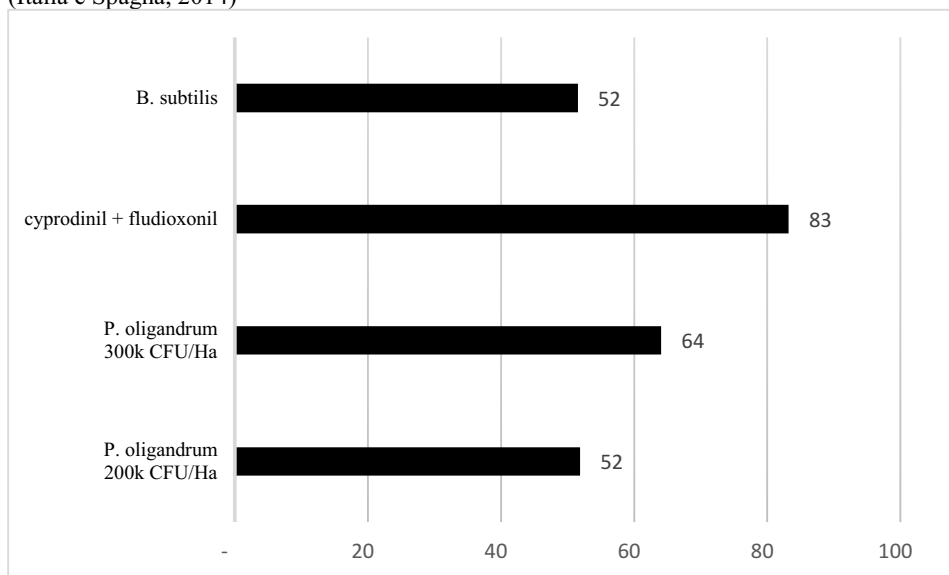


Figura 4. Efficacia verso *B. cinerea* su lattuga: % controllo su non trattato, media di 12 prove (Italia e Spagna, 2010-2011-2013)

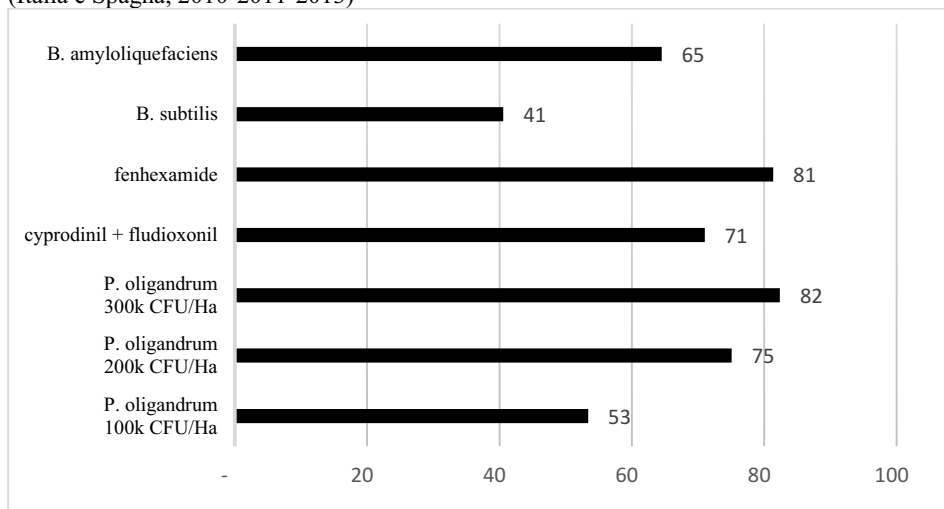
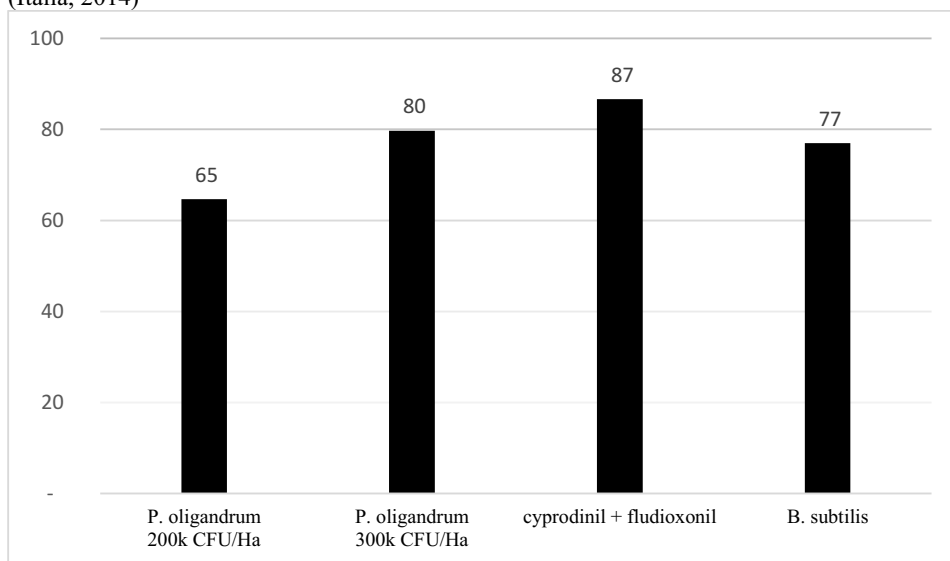


Figura 5. Efficacia verso *S. sclerotiorum* su lattuga: % controllo su non trattato, media di 6 prove (Italia, 2014)



I dati riportati nelle tabelle, come già detto, vanno considerati a titolo esclusivamente indicativo. Sintetizzando i risultati di numerose prove essi mostrano comunque che Polyversum, utilizzato come fungicida preventivo alle dosi autorizzate, possiede un'elevata attività biologica nei confronti di *B. cinerea* e di *S. sclerotiorum* e può essere uno strumento molto importante per il controllo di queste fitopatie nelle colture della vite da vino e da tavola, della fragola e della lattuga.

Per quanto concerne l'impatto sui processati, in uno studio condotto su vite per verificare l'impatto sulla fermentazione, *P. oligandrum* ha fornito risultati migliori rispetto al prodotto chimico testato (Kyseláková e Nemcova, 1997). Recentemente, è stata valutata l'interazione dell'oomicete con *Saccharomyces cerevisiae bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae* tramite l'identificazione dell'attività antimicrobica mediante protocollo standard CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ed è stata determinata la MIC (Minima Concentrazione Inibente) sui lieviti d'interesse (studi interni, 2017). Sono stati, inoltre, condotti test di campo in GEP su varietà a bacca bianca e rossa aventi lo scopo di determinare l'impatto dell'uso di Polyversum sulla fermentazione per la produzione di vino e, infine, sulla qualità del vino, valutata attraverso la determinazione sia analitica che parametri sensoriali (studi interni, 2014). Per massimizzare il potenziale impatto di *P. oligandrum* sulla fermentazione, l'applicazione è stata effettuata a partire dalla fine della fioritura sulla varietà a bacca bianca e nelle ultime fasi di maturazione su sulla varietà a bacca rossa; l'ultimo trattamento è stato poi fatto 3-4 settimane prima della raccolta, per massimizzare la potenziale presenza del micoparassita sulle uve raccolte e la potenziale inibizione dell'attività dei lieviti. I risultati confermano che, seguendo le dosi e gli impieghi proposti in etichetta per la vite (200-300 g/ha), l'uso di *P. oligandrum* non influenza i processi fermentativi nonché gli aspetti chimico-fisici ed organolettici dei vini stessi.

CONCLUSIONI

Questo documento offre una sintesi delle caratteristiche di *P. oligandrum*, ampiamente indagate nel corso degli ultimi anni di ricerche. In particolare gli studi sull'antagonismo di *P. oligandrum* hanno rivelato l'esistenza di un processo complesso che dipende dalle specie bersaglio coinvolte: un effetto diretto attraverso il controllo di agenti patogeni (micoparassitismo) e/o effetti indiretti, mediati dal fungo stesso, quali induzione di resistenza e promozione della crescita. Polyversum, agrofarmaco biologico a base di *P. oligandrum* di recente introduzione in Italia, la cui efficacia come fungicida è stata ampiamente dimostrata nel corso di numerosi studi e ricerche, si dimostra essere uno strumento flessibile ed efficace da utilizzare in specifiche strategie di prevenzione delle malattie e può essere una valida alternativa e/o un partner di soluzioni chimiche e non chimiche per la protezione da Botrite e Sclerotinia. L'assenza di un residuo definito, associato al minore impatto rispetto alle soluzioni chimiche sulla biodiversità della microflora e alla possibilità di applicazione senza intervallo di sicurezza lo rendono uno strumento molto flessibile sia per la viticoltura che per l'orticoltura nell'ambito di moderni e sostenibili programmi di difesa.

LAVORI CITATI

- Al-Hamdani AM, Cooke RC, 1983. Effects of the mycoparasite *Pythium oligandrum* on cellulolysis and sclerotium production by *Rhizoctonia solani*. *Trans Br Mycol Soc* 81, 619–621.
- Benhamou N, Rey P, Cherif M, Hockenhull J, Tirilly Y, 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathol* 87 (1), 108–122.
- Benhamou N, Rey P, Picard K, Tirilly Y, 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathol* 89 (6), 506–517.
- Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P., 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiol* 158, 2679–2694.
- Brozova J., 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Prot Sci* 38(1), 29–35
- Conrath U., 2009. Priming of induced plant defense responses. *Loon LCV (ed) Advances in botanical research. Academic, New York*, 361–395.
- Direttiva 2008/113/CE della Commissione, 2008. *Modifica della Direttiva 91/414/CEE del Consiglio per includervi alcuni microorganismi come sostanze attive*.
- Drechsler C., 1930. A new species of *Pythium*. *J Wash Acad Sci* 20 (16), 398–418.
- Gazzetta Ufficiale n. 146 del 26-6-2009, Inclusione di alcuni microrganismi nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 194, in attuazione della direttiva 2008/113/CE dell'8 dicembre 2008 della Commissione (09A07208).
- Kilpatrick RA, 1968. Seedling reaction of barley, oats and wheat to *Pythium* species. *Plant Disease* 52, 209–212.
- Kyseláková M., Němcová A., 1997. Study of biofungicide efficacy against grey mould on grapevine (*Botryotinia fuckeliana* de Bary Whetzel). *Horticulture*, 3, 99–104.
- Le Floch G, Rey P, Dénier F, Benhamou N, Picard K, Tirilly Y., 2003a. Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. *Agron* 23(5–6), 455–460.

- Le Floch G, Rey P, Benizri E, Benhamou N, Tirilly Y., 2003b. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant Soil* 257(2), 459–470.
- Le Floch G, Vallance J, Benhamou N, Rey P., 2009. Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biol Control* 50(3), 288–298.
- Lewis, K.; Whipps, J.M.; Cooke, R.C., 1989. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. *Biotechnology of fungi for improving plant growth Symposium of the British Mycological Society held at the University of Sussex*, September 1988, 191–217.
- Lherminier J, Benhamou N, Larrue J, Milat ML, Boudon-Padieu E, Nicole M, Blein JP., 2003 Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathol* 93(10), 1308–1319.
- Lou BG, Wang AY, Lin C, Xu T, Zheng XD., 2011. Enhancement of defense responses by oligandrin against *Botrytis cinerea* in tomatoes. *Afr J Biotechnol* 10(55), 442–449.
- Martin FN, Hancock JG, 1986. Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. *Phytopathol* 76 (11), 1221–1231.
- Masunaka A, Sekiguchi H, Takahashi H, Takenaka S., 2010. Distribution and expression of elicitin-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *Phytopathol* 158(6), 417–426.
- Mohamed N, Lherminier J, Farmer MJ, Fromentin J, Beno N, Houot V, Milat ML, Blein JP., 2007. *Defense responses in grapevine leaves against Botrytis cinerea induced by application of a Pythium oligandrum strain or its elicitin, oligandrin, to roots*. *Phytopathol* 97(5), 611–620.
- Picard K, Tirilly Y, Benhamou N., 2000a. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Appl Environ Microbiol* 66(10), 4305–4314.
- Picard K, Ponchet M, Blein JP, Rey P, Tirilly Y, Benhamou N., (2000b). A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol* 124(1), 379–395 Plaats-Niterink AJVd.
- Quilken M.P., Whipps J.M., Cooke R.C., 1992. Nutritional and environmental factors affecting biomass and oospore production of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 14, Issue 2, February 1992, Pages 106–111.
- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y, 1996. Ultrastructural and cytochemical studies of cucumber roots infected by two *Pythium* species with different modes of pathogenicity. *Physiol Mol Plant Pathol* 49 (4), 213–231.
- Rey P, Le Floch G, Benhamou N, Salerno MI, Thuillier E, Tirilly Y, 2005. Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and two types of sclerotia of plant-pathogenic fungi. *Mycol Res* 109, 779–788.
- Takenaka S, Nishio Z, Nakamura Y., 2003. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology* 93(10), 1228–1232.
- The Czech Republic, 2015. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products - *Evaluation of active substances: Pythium oligandrum M1 Assessment Report*, 3–25.