UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente

Studi di efficacia dell'applicazione di *Trichoderma spp*. come biostimolante sul mais Ottofile del Pavese

Relatore:
Prof.ssa Michela Veronica Landoni

Correlatore:
Dott. Andrea Giacomelli

Tesi Sperimentale di
Federico Bertoli

Anno Accademico 2025/2026

ABSTRACT 3
RIASSUNTO 4
1. INTRODUZIONE 6
1.1 Cambiamento climatico ed effetti sull'agricoltura 6
1.2 Sicurezza alimentare 7
1.3 Le colture cerealicole 9
1.3.1 *Zea mays* L. 10
1.3.2 Fisiologia 12
1.3.3 Domesticazione 12
1.4 Limiti dell'agricoltura industriale 13
1.5 Valorizzazione delle varietà tradizionali 15
1.6 I biostimolanti vegetali 17
1.7 Strategie per migliorare le performance delle varietà tradizionali mediante l'utilizzo di *Trichoderma* 20
2. SCOPO 24
3. MATERIALI E METODI 25
3.1 Materiale vegetale 25
3.2 Biostimolante 25
3.3 Campi sperimentali 28
3.4 Analisi del suolo 29
3.5 Piano sperimentale 29
3.6 Riproduzione di varietà locali tramite impollinazione controllata 30
3.7 Test di germinazione e analisi del seedling 30
3.8 Parametri agronomici 33
3.9 Analisi genetica 34
3.9.1 Estrazione del DNA 34
3.9.2 Amplificazione tramite PCR 35
3.9.3 Elettroforesi su gel 35

3.9.4 Analisi SSR eseguita da BMR. 36
3.9.5 Genetic Diversity Analysis 36
3.10 Analisi statistiche 37
4. RISULTATI 38
4.1 Clorofilla nelle foglie 39
4.2 Altezza pianta 43
4.3 Analisi del peso di mille semi (TSW) 46
4.4 Peso dei semi per spiga 49
4.5 Percentuale delle piante infettate 52
4.7 Analisi genetica tramite marcatori SSR 54
4.7.1 Controllo dell'efficienza dei marcatori SSR scelti 54
4.7.2 Analisi genetica sulle 4 varietà: Ottofile del Pavese, Ottofile tortonese, Ottofile di Codera, Ottofile del Garda (effettuata da BMR) 54
5 DISCUSSIONE 56
6 CONCLUSIONE 58
7 BIBLIOGRAFIA 59

ABSTRACT

I cambiamenti climatici e il degrado dei suoli suggeriscono l'adozione di modelli agricoli sostenibili in cui possono ricoprire un ruolo chiave le varietà locali (*landraces*) e biostimolanti microbici. Il presente studio valuta l'efficacia dell'inoculo tramite biopriming del fungo benefico *Trichoderma asperellum* sullo sviluppo fisiologico, la produttività e la tolleranza ai fitopatogeni nel mais Ottofile del Pavese (*Zea mays* L.), una varietà tradizionale coltivata nell'Italia settentrionale.

La sperimentazione è stata condotta nel biennio 2025–2026 presso due siti sperimentali caratterizzati da differenti regimi di gestione e contesti pedoclimatici: il sito di Landriano (PV), caratterizzato da un ambiente di pianura con lavorazione convenzionale e irrigazione, e il sito di Romagnese (PV), caratterizzato da un ambiente collinare appenninico condotto con minima lavorazione (minimum tillage) e assenza di irrigazione. Sulle piante della varietà Ottofile del Pavese coltivate nei due siti sono stati quantificati lo stato nutrizionale azotato/clorofilliano (indice SPAD), i parametri biometrici (altezza della pianta), le componenti di resa (peso dei mille semi - TSW, peso della granella per spiga) e l'incidenza di infezioni da *Fusarium verticillioides* e *Ustilago maydis*.

I risultati evidenziano che l'effetto del trattamento con *Trichoderma asperellum* è strettamente condizionato dalle condizioni pedoclimatiche e gestionali del sito. Nel contesto collinare marginale (Romagnese), in presenza di stress idrico e minimum tillage, l'inoculo ha determinato incrementi significativi dell'indice SPAD ($p < 0,0001$) e dell'altezza della pianta ($p < 0,0001$), oltre a ridurre l'incidenza di *Fusarium verticillioides* (2,14% vs 4,17% del controllo) e *Ustilago maydis* (0,71% vs 1,67%). Al contrario, nel sito idricamente ed edaficamente ottimale (Landriano), non sono emerse differenze significative nei parametri di crescita durante la prima stagione (effetto saturation), mentre nel 2026 il biostimolante ha svolto un'azione mitigativa nei confronti dello stress termico presente. Le componenti di resa granellare (TSW e peso spiga) sono risultate dipendenti dalla variabilità interambientale piuttosto che dal trattamento. *Trichoderma asperellum* si conferma un microrganismo efficace per il biocontrollo e la biostimolazione, particolarmente idoneo a migliorare la resilienza e la stabilità fisiologica di varietà tradizionali di mais in agroecosistemi marginali o a basso input agronomico.

RIASSUNTO

L'agricoltura attualmente si trova a dover affrontare una doppia sfida: garantire la sicurezza alimentare e far fronte ai cambiamenti climatici. L'elevata omogeneità genetica delle cultivar commerciali limita la resistenza e la resilienza ai cambiamenti, rendendo più vulnerabile il sistema agroalimentare. Lo studio e la valorizzazione delle varietà locali (*landraces*), note per gli alti livelli di resilienza e l'uso di pratiche agricole sostenibili basate su biostimolanti microbici si presentano come possibili soluzioni alle suddette sfide. Il presente lavoro di tesi, condotto nell'ambito del progetto RUSTICO, ha valutato l'efficacia del biopriming dei semi di mais della varietà locale Ottofile del Pavese mediante il fungo *Trichoderma asperellum*, noto per le sue proprietà biostimolanti e di biocontrollo. La ricerca ha analizzato la risposta fisiologica, biometrica e produttiva della coltura in due ambienti edafici e climatici contrastanti nel biennio 2025–2026, verificato l'efficacia di *Trichoderma* contro *Fusarium verticillioides* e *Ustilago maydis*, noti patogeni del mais, e ha confermato la diversità genetica dell'Ottofile del Pavese, rispetto alle altre varietà Ottofile coltivate in Lombardia, utilizzando marcatori molecolari (SSR). La sperimentazione è stata svolta in due località della provincia di Pavia: Landriano e Romagnese. I semi sono stati trattati tramite biopriming con una sospensione di spore di *Trichoderma asperellum*. Sulle piante di Ottofile del Pavese coltivate nei due siti, sono stati monitorati l'indice di clorofilla SPAD, parametri biometrici, componenti di resa, incidenza di patogeni fungini ed è stata analizzata la diversità genetica della varietà Ottofile del Pavese tramite confronto con altre varietà tradizionali utilizzando marcatori SSR.

I risultati hanno mostrato che nella stagione 2025 a Romagnese, ambiente collinare e campo non irriguo, il trattamento con *Trichoderma* ha determinato un aumento significativo dell'indice SPAD ($p < 0.0001$) e dell'altezza delle piante ($p < 0.0001$) nel 2025, dimostrando quindi il ruolo di *Trichoderma asperellum* come tampone edafico e fisiologico. A Landriano, campo in pianura e irriguo, non sono emerse differenze significative.

Nel 2026, anno caratterizzato da picchi di calore e scarsità idrica, i campioni trattati a Romagnese non hanno mostrato differenze significative nei valori dello SPAD rispetto al controllo, mentre a Landriano l'inoculo con *Trichoderma* è risultato associato a valori più elevati di clorofilla ($p = 0.0720$). Inoltre, nel sito di Romagnese, l'inoculo ha dimezzato l'incidenza di piante infette da *Fusarium verticillioides* (2,14% nei trattati vs 4,17% nel controllo) e *Ustilago maydis* (0,71% vs 1,67%).

Infine, l'analisi PCoA sui marcatori SSR ha confermato la marcata identità e diversità genetica dell'Ottofile del Pavese rispetto ad altre *landraces* lombarde e in particolare rispetto alle altre varietà Ottofile coltivate in Lombardia.

In conclusione, il biopriming con *Trichoderma asperellum* rappresenta un'efficace biotecnologia agronomica per incrementare la resilienza e la difesa biologica del mais Ottofile del Pavese, specialmente in contesti collinari e a basso input.

1. INTRODUZIONE

1.1 Cambiamento climatico ed effetti sull'agricoltura

I cambiamenti climatici sono il risultato di processi naturali e delle attività antropiche che alterano le condizioni atmosferiche. La concretezza di tali mutamenti è documentata ad esempio dal fatto che la temperatura media globale della superficie terrestre ha subito un incremento di 0,74 °C (DS 0,18) negli ultimi 100 anni, mentre il livello del mare globale è aumentato di 1,8 mm all'anno dal 1961 e il ghiaccio marino artico si sta ritirando del 2,7% (DS 0,6) per decennio. A ciò si accompagnano l'aumento della temperatura della superficie del mare, il ritiro dei ghiacciai montani, la progressiva acidificazione degli oceani e l'aumento in frequenza e intensità degli eventi meteorologici estremi tra cui ondate di calore, siccità, incendi boschivi e tempeste (Semenza, and Menne, 2009).

Questi cambiamenti influenzano sia la produttività agricola, sia l'impatto che l'agricoltura stessa esercita sull'ambiente (Yang et al., 2024). In particolar modo la frequenza dei fenomeni siccitosi registra un incremento significativo nelle aree mediterranee e nell'Europa centrale rispetto alle regioni sud-occidentali e delle pianure degli Stati Uniti causando una maggior frequenza dei periodi di magra e un'espansione delle zone aride (Sun et al., 2019). Ciò comporta una riduzione della produttività direttamente riconducibile all'inasprimento dei fenomeni meteorologici. La siccità è una condizione ambientale tipicamente caratterizzata da estesi periodi con ridotte precipitazioni e un'elevata tendenza all'evaporazione (Berg and Sheffield, 2018), a cui si associano un aumento delle temperature e livelli ridotti di umidità dell'aria e del suolo (Mishra and Singh, 2010; Berg and Sheffield, 2018). Tali condizioni, ulteriormente intensificate a livello globale, generano conseguenze drammatiche sulla disponibilità di acqua nei suoli e nei bacini idrografici (Spinoni et al., 2017; Masson-Delmotte et al., 2021).

Nel contesto attuale dei cambiamenti climatici, la stabilità e la funzionalità dei suoli agrari sono sottoposte a pressioni senza precedenti: l'aumento delle temperature globali e l'alterazione dei pattern delle precipitazioni causano un'accelerazione nei processi di degradazione biologica e chimica dei terreni (Lal, 2012). In questo scenario di crescente vulnerabilità, la perdita di nutrienti dal suolo rappresenta uno dei principali fattori di degrado dei sistemi agrari, con ripercussioni su fertilità del suolo e produttività delle colture. Nei sistemi colturali intensivi, l'asportazione di elementi nutritivi attraverso la biomassa raccolta può superare gli apporti derivanti da fertilizzazione e restituzione dei residui colturali, determinando un bilancio negativo degli elementi essenziali come azoto (N), fosforo (P) e potassio (K). Tale fenomeno noto come *nutrient mining*, comporta un progressivo e continuo impoverimento del suolo e una riduzione della capacità produttiva nel lungo periodo (Paramesh et al., 2023).

A scala globale, la deplezione dei nutrienti costituisce una minaccia significativa per la sostenibilità agricola e la sicurezza alimentare, in quanto compromette la qualità del suolo e riduce le rese colturali.

Studi condotti su colture cerealicole hanno dimostrato come la continua asportazione di nutrienti, non compensata da input, porta a una diminuzione delle riserve disponibili nel suolo, con declino della fertilità agronomica (Tan et al., 2005). Questa progressiva carenza di nutrienti riduce drasticamente la resilienza intrinseca delle piante, rendendole significativamente più vulnerabili agli stress abiotici indotti dai cambiamenti climatici, quali le siccità prolungate o le ondate di calore. Di conseguenza, l'impoverimento chimico dei suoli e l'instabilità climatica concorrono a minacciare la stabilità delle produzioni (Lal, 2015).

Tale riduzione della produttività agricola, causata dall'interazione sinergica tra il degrado del suolo e gli eventi meteorologici estremi, cessa così di essere una problematica esclusivamente agronomica per assumere un'importante rilevanza socio-economica di portata planetaria. La ridotta stabilità delle produzioni si riflette in modo immediato sulla vulnerabilità delle catene di approvvigionamento, proiettando gli effetti della crisi climatica direttamente sulla stabilità dei sistemi di stoccaggio e distribuzione del cibo (Wheeler and Von Braun, 2013). Questa situazione di instabilità ecologica e produttiva compromette infine la stabilità delle risorse alimentari nel tempo e quindi la sicurezza alimentare.

1.2 Sicurezza alimentare

La sicurezza alimentare (*food security*) è definita dalla Food and Agriculture Organization (FAO) come la condizione in cui tutte le persone, in ogni momento, hanno accesso fisico, sociale ed economico a quantità sufficienti di alimenti sicuri, nutrienti e di qualità adeguata a soddisfare i propri fabbisogni nutrizionali e le preferenze alimentari, consentendo il mantenimento di una vita attiva e in buona salute (Grainger, 2010; FAO 1996). La sicurezza alimentare è un concetto multidimensionale e comprende aspetti legati alla disponibilità, all'accesso, all'utilizzo e alla stabilità delle risorse alimentari nel tempo. Negli ultimi anni, la sicurezza alimentare è diventata una delle sfide globali, soprattutto in relazione alla continua crescita demografica e alla pressione sulla riduzione sempre maggiore delle risorse naturali (Cole et al., 2018).

La popolazione mondiale è in continua espansione e si stima che possa superare i 9 miliardi di individui entro il 2050. Questa dinamica determinerà un incremento significativo della domanda globale di alimenti a livello globale, esercitando una forte pressione sui sistemi agricoli, chiamati a garantire livelli produttivi adeguati a soddisfarla (Keating et al. 2014) (**FIG. 1**). La limitata disponibilità di risorse naturali fondamentali, quali suolo e acqua dolce, fa emergere una relazione critica tra l'incremento demografico e la capacità produttiva dei sistemi agricoli, evidenziando il rischio che la domanda alimentare possa superare l'offerta in assenza di adeguate innovazioni e strategie di gestione sostenibile (Porkka et al., 2017).

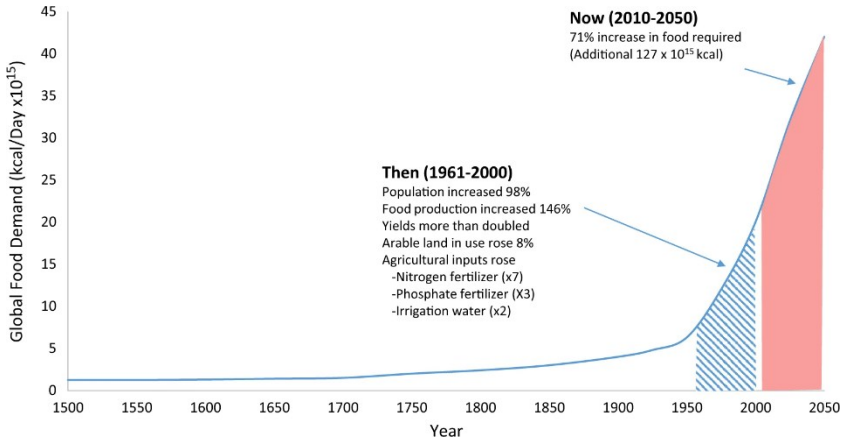


FIGURA 1: *andamento a livello globale della domanda di cibo in relazione all'aumento della popolazione (Keating et al. 2014).*

Le colture cerealicole rivestono un ruolo centrale nella sicurezza alimentare globale, in quanto costituiscono la principale fonte di energia per la popolazione mondiale. Cereali quali frumento, riso e mais rappresentano una quota significativa (circa il 60%) dell'apporto calorico globale e sono alla base delle diete di gran parte della popolazione, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Tuttavia, la forte dipendenza da un numero limitato di colture determina una maggiore vulnerabilità dei sistemi alimentari, poiché eventuali riduzioni della produzione cerealicola possono avere ripercussioni dirette sulla disponibilità di cibo e sulla stabilità dei mercati alimentari (Ripoll et al., 2017).

La sicurezza alimentare è strettamente correlata ai diversi Sustainable Development Goals (SDG) dell'agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile, il quadro globale adottato nel 2015 dai 193 Stati membri delle Nazioni Unite e articolato in 17 obiettivi.

Tra questi, in particolare lo SDG 2 "*Zero Hunger*", mira a eliminare la fame, garantire la sicurezza alimentare, migliorare la nutrizione e promuovere un'agricoltura sostenibile (Bíziková et al. 2020). Nonostante i progressi portati dalla Rivoluzione Verde, il numero di persone colpite dalla fame ha ripreso a crescere, a dimostrazione di come gli odierni sistemi alimentari non sono ancora in grado di garantire la sicurezza alimentare in modo sostenibile (Wijerathna-Yapa and Pathirana 2022).

Oltre al SDG 2, assumono un ruolo fondamentale altri tre obbiettivi. Lo SDG 12 "Responsible Consumption and Production" promuove l'uso efficiente delle risorse, la riduzione degli sprechi e lo sviluppo di sistemi agricoli sostenibili lungo l'intera filiera produttiva (Thwaites et al., 2025). Lo SDG 13 "Climate Action" riguarda invece la mitigazione dei cambiamenti climatici e l'adattamento delle produzioni agricole; infatti il settore agroalimentare è al contempo causa e vittima della crisi climatica poiché le emissioni di gas serra contribuiscono al riscaldamento globale, mentre gli eventi meteorologici estremi, come siccità e le variazioni dei regimi pluviometrici minacciano in maniera drastica la produttività e la stabilità dei sistemi alimentari (Pandey and Pandey, 2023). Infine il SDG 15 "Life on Land", è importante perché comprende la tutela della biodiversità, la conservazione delle

risorse genetiche vegetali e la gestione sostenibile degli ecosistemi terrestri, tutti elementi fondamentali per mantenere i servizi ecosistemici su cui si regge la produzione agricola (Stokes, et al., 2024).

Nel tentativo di trasformare questi obiettivi a livello globale in strategie agronomiche che siano concrete e applicabili e di strutturare dei sistemi alimentari che possano resistere alle avverse perturbazioni climatiche, l'attenzione della comunità scientifica si sofferma in particolar modo sulla gestione delle colture mondiali. La prima linea di difesa contro la malnutrizione e l'instabilità dei mercati è infatti la salvaguardia delle rese delle specie più coltivate che rappresentano la fonte energetica e proteica della maggioranza della popolazione (Ray et al., 2013).

1.3 Le colture cerealicole

Tra le colture maggiormente influenzate dagli effetti dei cambiamenti climatici rientrano le colture cerealicole, che costituiscono la base dell'alimentazione per una larga parte della popolazione mondiale e svolgono un ruolo fondamentale nella sicurezza alimentare globale **(FIG.2)** (FAO, 2024).

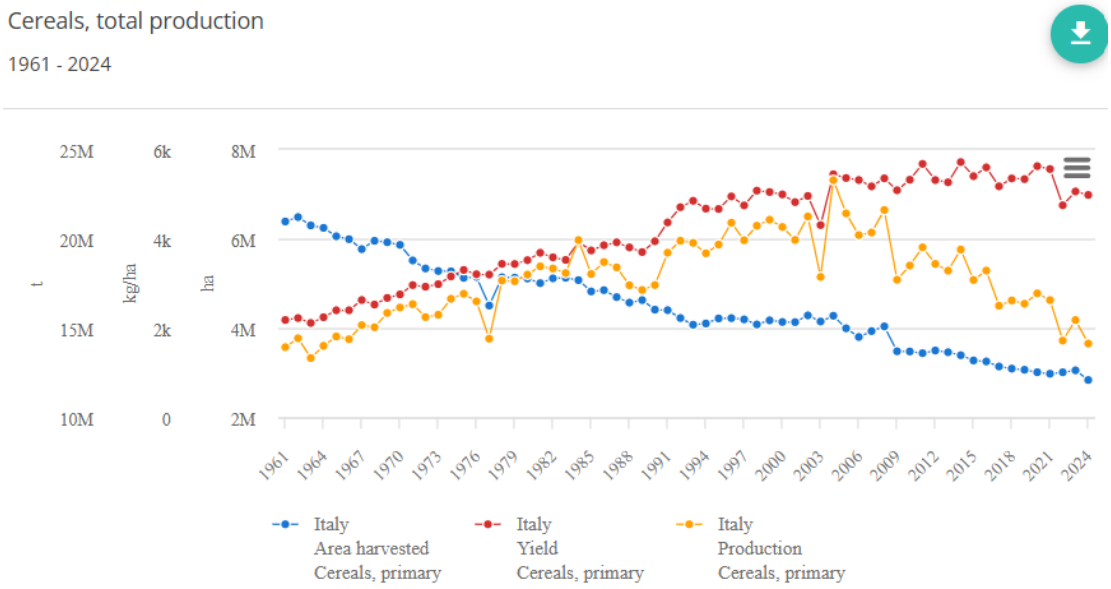


FIGURA 2: *Produzione di cereali in Italia dal 1961 al 2024. Dati FAO (2024).*

I cereali comprendono un insieme di specie appartenenti prevalentemente alla famiglia delle *Poaceae*, coltivate principalmente per la produzione della granella destinata all'alimentazione umana, animale e a diversi impieghi industriali. Oltre a rappresentare una delle principali fonti di carboidrati complessi, essi apportano proteine, vitamine del gruppo B, fibre alimentari e numerosi micronutrienti essenziali (McKevith, 2004).

Nel corso degli ultimi secoli, le colture cerealicole hanno raggiunto un'ampia diffusione a livello mondiale e un ruolo predominante nei sistemi agricoli mondiali, soprattutto grazie alla loro elevata

produttività, alla facilità di conservazione e trasporto della granella, all'ampia adattabilità a differenti condizioni pedoclimatiche e al rilevante valore economico e alimentare che rivestono (Neupane, et al., 2022). I cereali coltivati in minor quantità, detti cereali minori, sono: avena (*Avena sativa)*, orzo (*Hordeum vulgare*), segale (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e miglio (*Panicum miliaceum*) (Kaur et al., 2024). Invece i cereali maggiori, ossia quelli utilizzati e coltivati maggiormente nel mondo, sono: il frumento (*Triticum aestivum*), il riso (*Oryza sativa*) e il mais (*Zea mays*) (Shiferaw et al., 2013). Queste colture sono coltivate in tutte le aree del mondo in cui sono presenti condizioni climatiche favorevoli per la loro crescita (**FIG. 3**) (Farooq et al., 2023).

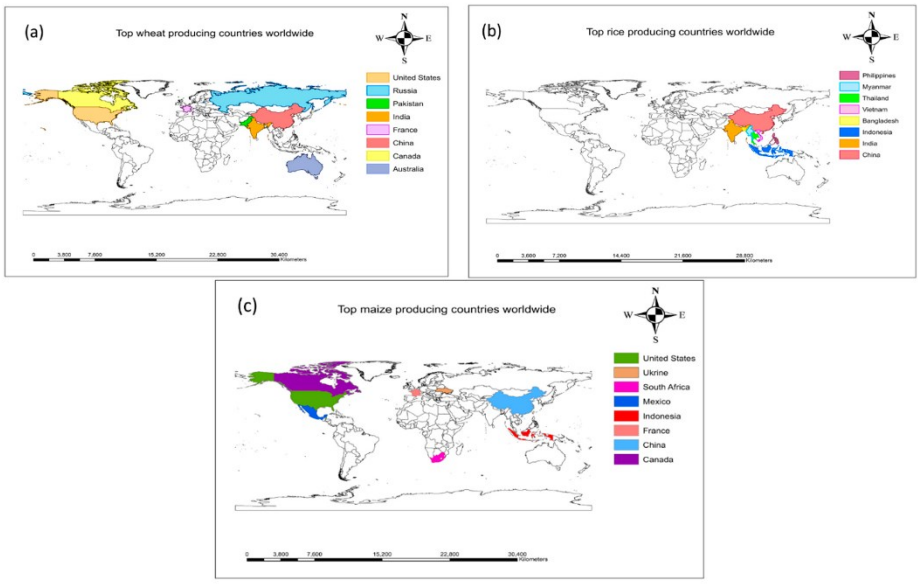


FIGURA 3: *Principali Paesi produttori di: (a) grano, (b) riso e (c) mais.*

1.3.1 *Zea mays* L.

Tra i cereali maggiori, il mais (*Zea mays* L.) è uno dei cereali più importanti a livello globale, grazie all'elevata produttività, all'alto contenuto energetico e alla versatilità che lo rende fondamentale per l'alimentazione umana, animale e per usi industriali. Fondamentale è il suo ruolo nell'ambito della sicurezza alimentare (Shiferaw, 2001). Il mais insieme a grano e riso è una delle colture più usate per l'alimentazione umana e per quella animale. Oltre all'impiego alimentare il mais trova esteso utilizzo nelle applicazioni industriali, tra cui la produzione di amido, bioetanolo e altri derivati (Pratikantam, et al 2024).

Il mais è una pianta erbacea, monocotiledone e annuale con un singolo stelo, la cui altezza varia da poco più di un metro a 4 m. Fa parte della famiglia delle Poaceae e alla specie *Zea mays* L. appartengono diverse sottospecie (*Zea mays* subs. *mays*, *Zea mays* subsp. *Parviglumis*, *Zea mays* subsp. *Mexicana, Zea mays* subsp. *Huehuetenangensis).*

L'apparato radicale è di tipo fascicolato. Si distingue un sistema primario embrionale composto da 5-7 radici primarie di cui una è la principale. Le radici laterali sono definite secondarie, costituiscono

l'apparato fascicolato e sono concentrate nei primi tre centimetri del terreno (Ahmed et al., 2017). Infine allo stadio di nona o decima foglia iniziano a svilupparsi le radici aeree. (Sebastian et al., 2016) dai nodi epigei del culmo. Queste radici svolgono un ruolo di ancoraggio mentre l'apparato primario svolge oltre alla funzione di ancoraggio anche quella di assorbimento dei nutrienti.

Per quanto riguarda il culmo, è costituito da nodi solidi e internodi contenenti un tessuto parenchimatico spugnoso, il midollo. Il numero e la lunghezza degli internodi possono variare in funzione della varietà. Dal punto di vista anatomico il culmo può essere descritto distinguendo tre principali componenti. L'epidermide, che riveste esternamente il culmo e svolge una funzione di protezione nei confronti dei fattori biotici e abiotici; inoltre, attraverso gli stomi, contribuisce alla regolazione degli scambi gassosi. La seconda fascia è la corteccia; questa ha spessore variabile ed è costituita da tessuto parenchimatico con funzione meccanica di sostegno e protezione. Infine la terza fascia è il cilindro centrale che ospita il sistema vascolare con funzione di trasporto nutrienti e sostegno strutturale (Sindhu et al., 2007).

Le foglie sono collocate in posizione alterna sui lati del culmo, ognuna parte da un nodo. Sono distiche, rispetto all'asse verticale. Il numero di foglie dipende dal tipo di cultivar, non è fisso. La guaina della foglia è definita amplessicaule, cioè parte dal nodo e avvolge il culmo fino al nodo successivo. La lamina è lanceolata, larga da 3 a 10 centimetri, le nervature sono parallelinervie, sottili, tranne la mediana che è più sviluppata (Solaimalai et al., 2020). La ligula, una membrana trasparente posta tra guaina e lamina, funge da barriera protettiva per il fusto e le foglie più giovani (Chaffey 2000).

L'infiorescenza è diclina, monoica; cioè sulla stessa pianta convivono le due infiorescenze, maschili e femminili, ma non si trovano nella stessa posizione. Infatti l'infiorescenza maschile detta pennacchio è un panicolo e si trova in posizione apicale del culmo. È composto da spighe e ogni spiga è costituita da file di coppie di spighette disposte a ventaglio. L'infiorescenza femminile è impropriamente chiamata pannocchia, ma è uno spadice costituita da un asse centrale, detto tutolo. Su questo sono inserite file di spighette sessili. Ogni spighetta presenta due fiori; uno fertile e uno che abortisce. Il tutolo alla base è costituito da nodi e internodi corti e da ogni nodo si inseriscono le brattee, che formano il cartoccio a protezione del tutolo. In genere il numero di ranghi va da un minimo di 8 a un massimo di 24.

Il fiore fertile ha un ovario monosperma e presenta lunghi stili che sono morbidi, sottili, filiformi dette barbe o sete. Queste seccano dopo la fecondazione, ma prima proteggono l'infiorescenza e raggiungono l'esterno per riuscire a intercettare il polline. Nel mais è presente sia una fecondazione autogama che allogama basata sulla proterandria cioè lo sviluppo del fiore maschile prima del femminile (Chaudhry et al., 2024).

La cariosside è il frutto, questo ha dimensioni, peso, colore, forma e composizione dell'amido diversa a seconda del tipo di cultivar. È costituito da: rivestimento esterno, embrione, ed endosperma; che contiene amido, grassi, proteine e carboidrati, fonte di energia e nutrienti. L'elevato valore nutrizionale del mais è il motivo per cui questa pianta è così tanto coltivata nel mondo (Wu et al., 2022; Yadesa and Diro., 2023).

1.3.2 Fisiologia

Zea mays è una pianta C4. Questa specializzazione biochimica e anatomica garantisce alla pianta di concentrare l'anidride carbonica in cellule specifiche della foglia, andando ad azzerare le perdite per fotorespirazione e mantenendo un'efficienza ottimale anche ad alte temperature (Gowik and Westhoff, 2011). Di conseguenza, il mais ottimizza l'uso dell'acqua e dell'azoto rispetto ai cereali a fotosintesi C3, come ad esempio il frumento (Sage et al., 2012). Tuttavia, questo meccanismo entra in crisi durante i periodi di siccità prolungati. Infatti per evitare di disidratarsi, la pianta chiude gli stomi, bloccando l'ingresso dell'anidride carbonica e fermando la fotosintesi clorofilliana. L'energia solare che si accumula senza essere utilizzata genererà stress ossidativo nei cloroplasti, andando a danneggiare le membrane cellulari e i tessuti fogliari (Foyer e Shigeoka, 2011).

Parallelamente all'attività della parte aerea della pianta, la nutrizione del mais dipende dalla salute dell'apparato radicale.

Caratteristica della pianta di mais è la crescita veloce e ciò porta a richiedere un importante assorbimento di nutrienti, in particolare dei due elementi principali azoto e fosforo, fin dalle prime fasi vegetative (Bender et al., 2013). Poiché il fosforo ha bassa mobilità nel terreno, le radici devono fare in modo di poter esplorare nuovi strati di suolo per intercettarlo. Nei suoli sfruttati dall'agricoltura intensiva, la degradazione biologica ostacola l'espansione delle radici laterali, rendendo la pianta più sensibile agli stress ambientali (Plénet et al., 2000).

La fase fenologica più delicata del mais è la fioritura. Per garantire una buona produzione, l'emissione del polline deve coincidere con la comparsa e la ricettività delle sete femminili.

L'aumento delle ondate di calore e la riduzione della quantità d'acqua possono causare delle problematiche a questa sincronizzazione, lo stress idrico porta a ritardare la crescita delle sete, mentre le temperature sopra i 35 °C portano a disidratare il polline, causando la sua sterilità. Questa incompatibilità temporale porta al fallimento della fecondazione e l'aborto degli ovuli, dando spighe vuote o con pochi semi (Carcova et al., 2000).

1.3.3 Domesticazione

Dal punto di vista storico ed evolutivo, il mais ha origine nel sud dell'attuale Messico, dove il processo di domesticazione di questa coltura ha avuto inizio circa 9000 anni fa a partire da una specie

selvatica nota come teosinte (Moustafa K., 2024). Questo processo definito come domesticazione del mais è uno degli esempi più significativi di selezione artificiale operata dall'essere umano. Nei secoli successivi, la coltivazione del mais si è diffusa nel continente americano e, dopo la scoperta delle Americhe, è stato introdotto nel resto del mondo, dove si è adattato a una vasta gamma di condizioni climatiche e ambientali (J. Acosta-Bayona et al., 2024).

Il mais si distingue dagli altri cereali comuni per la sua elevata diversità genetica (Whitt et al., 2002). Esistono numerose varietà locali, denominate *landraces*, sviluppatesi e diversificatesi nel corso dei secoli in risposta a differenti condizioni ambientali, climatiche e di coltivazione. Questa elevata diversità genetica a livello delle varietà si riflette in differenze morfologiche, fisiologiche e nutrizionali, rendendo il mais una specie molto versatile e con grandi capacità di adattamento. Le moderne tecniche di miglioramento genetico continuano a sfruttare questa diversità per ottenere varietà più produttive, resistenti agli stress ambientali sempre più presenti e migliorandone al contempo le caratteristiche nutrizionali (Dominguez-Hernàndez, et al., 2022).

Grazie all'elevata produttività, all'ampia diffusione geografica e al considerevole apporto energetico e nutrizionale le colture cerealicole costituiscono la base dell'alimentazione per miliardi di persone e rappresentano il fondamento dei sistemi agroalimentari mondiali. Per questo la ricerca scientifica fa particolare attenzione a queste colture, poiché il mantenimento di produzioni elevate, stabili e sostenibili è considerato uno degli strumenti chiave per rispondere alla crescente domanda alimentare e mitigare gli effetti dei cambiamenti climatici sull'agricoltura (Shiferaw et al., 2013). Qualsiasi riduzione della produttività o della stabilità delle rese cerealicole rischia infatti di compromettere la disponibilità di alimenti su scala globale, legando queste colture al concetto di sicurezza alimentare (Ray et al., 2013). La necessità di garantire una produzione cerealicola massiccia e costante per continuare a soddisfare l'aumento della domanda globale, ha spinto gli odierni sistemi agrari verso una drastica trasformazione tecnologica, orientata al garantire la massimizzazione dei raccolti nel breve periodo.

1.4 Limiti dell'agricoltura industriale

Lo sforzo globale volto a incrementare i volumi produttivi ha trovato la sua massima espressione nel modello intensivo contemporaneo. A partire dalla Rivoluzione Verde degli anni '50 del secolo scorso, l'agricoltura industriale ha garantito un incremento della produttività agricola grazie al miglioramento delle pratiche colturali, grazie all'utilizzo di macchine agricole e all'uso di input chimici. Tuttavia, tali modelli produttivi mostrano svariati limiti dal punto di vista ambientale ed ecologico, con particolare riferimento alla diffusione delle monocolture, alla riduzione della biodiversità e all'aumento della vulnerabilità dei sistemi agricoli (Koman et al., 2021). La monocoltura si intende

come la coltivazione continuativa di una singola specie vegetale su ampie superfici. Questo è infatti uno degli elementi caratterizzanti dell'agricoltura intensiva moderna (Franco et al., 2022).

La semplificazione degli agroecosistemi indotta dalla diffusione delle monocolture determina una evidente diminuzione della biodiversità sia vegetale sia animale. Numerosi studi hanno dimostrato come l'intensificazione agricola favorisce l'omogeneizzazione biologica degli ecosistemi, stimolando l'aumento di poche specie generaliste a favore delle specie specializzate e riducendo di conseguenza la diversità ecologica complessiva (Chisté et al., 2018). Inoltre, l'espansione dell'agricoltura moderna basata su un ridotto numero di colture ad alta resa ed associata a un progressivo declino della biodiversità globale, ha comportato ripercussioni negative per la stabilità degli ecosistemi agricoli e servizi ecosistemici essenziali, quali fertilità del suolo, impollinazione dei fiori grazie a insetti impollinatori e controllo biologico dei patogeni (Lanz et al., 2018).

Un ulteriore limite dei sistemi agricoli intensivi è caratterizzato dall'elevata dipendenza delle cultivar dagli input chimici, come fertilizzanti, erbicidi e pesticidi. Nonostante queste pratiche abbiano permesso un aumento delle rese agronomiche, il loro utilizzo intensivo ha causato effetti negativi sull'ambiente, tra cui la degradazione del suolo, la contaminazione delle acque e, infine, la già citata perdita di biodiversità (Horrigan, et al, 2002). Nello specifico, questi sistemi colturali intensivi portano alla selezione delle comunità biologiche meno diversificate e maggiormente dipendenti dalla gestione antropica, andando a ridurre la resilienza naturale degli agroecosistemi (MacLaren et al., 2018).

L'uniformità genetica delle colture odierne rappresenta un importante fattore di vulnerabilità. La selezione di varietà ad elevate prestazioni produttive, ma caratterizzate da un profilo genetico simile, ha ridotto la variabilità genetica disponibile all'interno delle più importanti specie agrarie, andando ad aumentare la suscettibilità delle colture agli stress biotici e abiotici. Quindi in condizioni di cambiamento climatico, questa uniformità può causare una compromissione della capacità di adattamento dei sistemi agricoli, rendendoli maggiormente esposti agli effetti di siccità, patogeni emergenti ed eventi estremi (Govindaraj et al., 2015). Per tali ragioni, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso approcci agricoli più sostenibili, che si basano sull'aumento della biodiversità agricola e sull'impiego di pratiche in grado di migliorare la resilienza degli agroecosistemi. (Khoury et al., 2014). Di conseguenza, la transizione ecologica porta alla ricerca di diverse soluzioni agronomiche e genetiche innovative che sono capaci di contrastare l'omogeneizzazione biologica e di restituire stabilità ai sistemi colturali senza compromettere la produttività complessiva.

1.5 Valorizzazione delle varietà tradizionali

Per contrastare l'uniformità genetica imposta dal modello intensivo e recuperare i caratteri di rusticità utili per il futuro, la ricerca scientifica sta riscoprendo il valore del germoplasma autoctono. Negli anni recenti, l'interesse e lo studio verso le varietà tradizionali, anche dette *landraces*, sono aumentati esponenzialmente, con l'intento di valutare come tali risorse possano essere utilizzate per far fronte alla necessità di creare nuovi sistemi agricoli più eco-sostenibili e resistenti ai cambiamenti climatici (Bababola et al., 2025). Le *landraces* sono definite come popolazioni di cultivar locali selezionate nel corso dei secoli dagli agricoltori tramite pratiche agricole tradizionali e adattate alle specifiche condizioni ambientali, culturali e pedoclimatiche del territorio in cui sono coltivate (Corrado and Rao, 2017). Si tratta pertanto di popolazioni dinamiche di colture con origine storica, caratterizzate da elevata diversità genetica, adattamento locale e assenza di un miglioramento genetico formale intensivo (Camacho Villa et al., 2005). A differenza delle varietà moderne commerciali e più utilizzate, queste popolazioni presentano una maggiore eterogeneità genetica e fenotipica. Questa caratteristica contribuisce a portare ad aumentare le capacità di tollerare gli stress ambientali e biologici (Bitocchi et al., 2015). Inoltre, le *landraces* possono rappresentare una risorsa fondamentale per garantire la conservazione dell'agrobiodiversità e garantire una sostanziale fonte di caratteri utili per i programmi di miglioramento genetico delle colture agrarie (Dwivedi et al., 2020).

In Italia, le varietà tradizionali di cereali hanno storicamente svolto un ruolo centrale nei sistemi agricoli locali. La selezione naturale e antropica di queste popolazioni ha permesso la creazione di combinazioni geniche che sono in grado di tollerare differenti condizioni ambientali, come limitazioni idriche, variazioni termiche e suoli a fertilità ridotta. Questa enorme variabilità genetica è un elemento di grande interesse nel contesto attuale dei cambiamenti climatici, in quanto può contribuire ad aumentare la resilienza degli agroecosistemi e una maggiore agrobiodiversità (Veteläinen et al., 2009; Dwivedi et al., 2020). La progressiva diffusione delle varietà ibride moderne nel corso del Novecento ha determinato una forte riduzione della coltivazione delle varietà locali, con conseguente erosione del patrimonio agrario tradizionale (Khoury et al., 2014).

Nonostante la forte erosione genetica che ha interessato il territorio italiano, l'Italia settentrionale conserva ancora un patrimonio significativo di risorse genetiche vegetali tradizionali. La particolare eterogeneità degli agroecosistemi e la persistenza di pratiche agricole tradizionali hanno infatti contribuito alla sopravvivenza di numerose varietà locali ed ecotipi, oggi di particolare interesse per la conservazione e la valorizzazione dell'agrobiodiversità. (Brandolini e Brandolini, 2009) (**FIG. 4**).

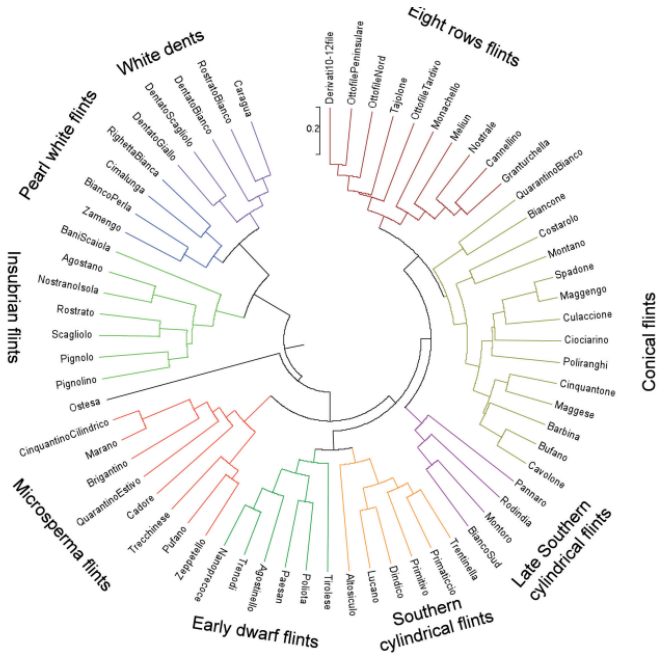


FIGURA 4: *Dendrogramma delle relazioni genetiche tra 65 agroecotipi tradizionali italiani del mais. Sono evidenziati nove cluster principali (Brandolini e Brandolini, 2009).*

Nel Nord Italia, la Lombardia si distingue perché garantisce una spiccata eterogeneità ambientale e di microclimi, per la presenza di zone di pianura, collinari e montane, che hanno favorito la selezione e la parziale conservazione di queste varietà locali (Cannella et al., 2022). Nel gruppo dei mais vitrei Ottofile è presente l'agroecotipo Ottofile Nord, che comprende le varietà Ottofile del Pavese, Ottofile Tortonese, Ottofile del Garda e Ottofile di Codera.

La classificazione botanica del mais si articola in tre sezioni distinte in base alla consistenza dell'endosperma. La prima è la sezione Indurata (mais vitrei), caratterizzata da un endosperma farinoso con pareti cellulari amilifere rinforzate che conferiscono al chicco durezza, lucidità e una forma tondeggiante. Le piante sono caratterizzate da maggiore tolleranza allo stress termico, vigore precoce e fioritura anticipata (Unterseer et al., 2016). Successivamente, la sezione Indentata (mais dentati), presenta un endosperma eterogeneo che crea un'indentazione apicale sul chicco. Le piante hanno elevate rese e una ottima adattabilità meccanica. Infine, la sezione Everta (popcorn), è la terza sezione principale della classificazione botanica del mais (Di Pasquale et al., 2024).

È all'interno della prima di queste sezioni botaniche, che si colloca una la varietà dell'Ottofile del Pavese, che è stato scelto come oggetto di studio di questa tesi.

Questa *landrace* è stata storicamente coltivata nell'area della provincia di Pavia dove ci sono delle zone con particolari condizioni pedoclimatiche come quelle della Lomellina, dell'Oltrepò Pavese e delle aree alluvionali del Po e del Ticino. Il nome di questa varietà è dovuto dalla specifica disposizione delle cariossidi in otto ranghi (file) lungo la spiga. Questa cultivar è utilizzata

prevalentemente per la produzione di farina destinata alla preparazione della polenta. La coltivazione del mais Ottofile si è progressivamente ridotta a partire dalla seconda metà del XX secolo, a causa dell'ingente diffusione degli ibridi commerciali che garantiscono una più alta produttività, andando a sostituire la maggior parte delle popolazioni locali tradizionali (Ardenghi et al., 2018). Tuttavia, negli ultimi anni è aumentato l'interesse per il recupero e la valorizzazione di queste varietà locali, considerate importanti sia dal punto di vista agronomico che culturale.

Il mais Ottofile Pavese presenta una maggiore resistenza alla siccità e una elevata variabilità genetica rispetto agli ibridi moderni, questa variabilità può contribuire una maggiore stabilità produttiva in condizioni di stress ambientale e in sistemi agricoli a basso input (Bitocchi et al., 2015; Dwivedi et al., 2020). Inoltre, le varietà tradizionali di mais vitreo si distinguono per le loro caratteristiche qualitative e nutrizionali differenti rispetto agli attuali ibridi moderni. Proprio questo aspetto ha risvegliato un forte interesse per la loro coltivazione, spinta dal buon contenuto di composti bioattivi e dalle eccellenti proprietà organolettiche delle farine ottenute (Zilic et al., 2012). Il mais Ottofile Pavese possiede inoltre un evidente valore storico e culturale, essendo legato alla tradizione agricola e gastronomica locale (Arca del gusto). La conservazione e valorizzazione di queste varietà si rivela quindi una strategia importante per la tutela dell'agrobiodiversità e per lo sviluppo di sistemi agricoli più resilienti e sostenibili nel contesto dei cambiamenti climatici (Negri, 2005; Ardenghi et al., 2018).

1.6 I biostimolanti vegetali

Nell'attuale scenario del mondo agricolo in cui alla ricerca di sostenibilità, si unisce la necessità di far fronte alle sfide poste dal cambiamento climatico una delle risposte biotecnologiche più promettenti è stata l'introduzione dei biostimolanti nei piani di gestione colturale.

Il Regolamento (UE) 2019/1009 definisce biostimolante un prodotto che è in grado di stimolare i processi nutrizionali della pianta indipendentemente dal proprio contenuto in nutrienti, con l'obiettivo di migliorare l'efficienza d'uso dei nutrienti, la tolleranza agli stress abiotici, le caratteristiche qualitative delle colture e la disponibilità degli elementi nutritivi presenti nel suolo o nella rizosfera **(FIG. 5)**. I biostimolanti sono classificati in due categorie: biostimolanti microbici e biostimolanti non microbici. Tra i biostimolanti non microbici rientrano sostanze umiche e fulviche, idrolizzati proteici, estratti di alghe, amminoacidi e le altre sostanze di origine naturale. I biostimolanti microbici invece, si basano sull'utilizzo di microrganismi benefici, quali funghi micorrizici arbuscolari, batteri promotori della crescita delle piante e funghi del genere *Trichoderma asperellum*, studiati prevalentemente per le proprietà biostimolanti e di biocontrollo (Rouphael and Colla, 2020).

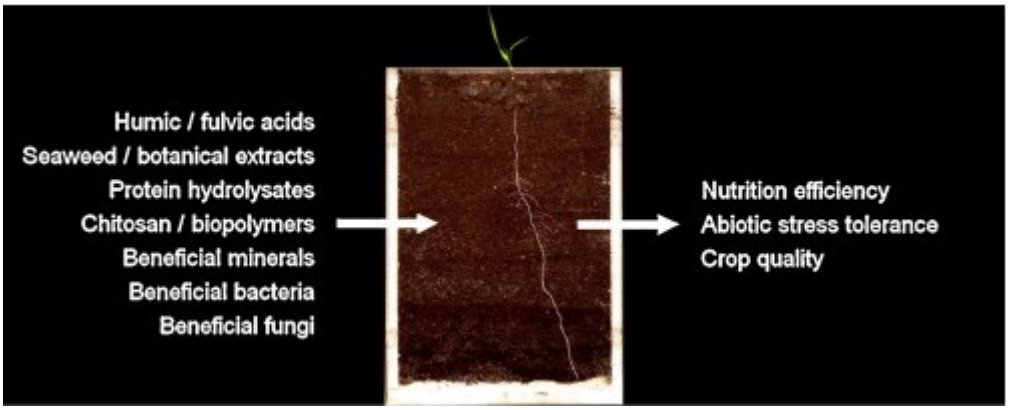


FIGURA 5*: Principali categorie di biostimolanti agricoli e relativi effetti fisiologici sulla pianta e sul sistema suolo-radice (P. du Jardin 2015).*

Ci sono diversi tipi di applicazione dei biostimolanti, i più utilizzati sono: idropriming, (i semi sono immersi in acqua a temperature ottimali), osmopriming (procedura di pre-semina che prevede il trattamento con soluzioni osmotiche a basso potenziale idrico), innesco a matrice solida (sviluppato come alternativa economica all' osmopriming), chemiopriming (si ottiene aggiungendo disinfettanti convenzionali per prevenire contaminazioni microbiche), termopriming (si trattano i semi a diverse temperature per migliorare l'efficienza di germinazione in condizioni avverse), e infine il biopriming (trattamento dei semi grazie all'inoculazione di specifici microrganismi benefici prima che avvenga la semina). Quest'ultima tecnica garantisce una rapida colonizzazione della superficie del seme e dell'apparato radicale fin dalle prime fasi di sviluppo della pianta, migliorando il processo di germinazione, il vigore iniziale e la tolleranza agli stress ambientali (Paparella et al., 2015).

Tra i funghi più utilizzati nel biopriming e nella lotta biologica c'è il genere *Trichoderma*, comprendente molte specie che sono naturalmente presenti nel suolo e nella rizosfera delle piante. Le specie maggiormente oggetto di studio comprendono: *Trichoderma harzianum, T. virens, T. atroviride, T. koningii e T. asperellum*, tutte caratterizzate da una notevole capacità di colonizzare l'apparato radicale e instaurare relazioni benefiche con la pianta ospite, in quanto possono essere sia funghi a vita libera sia simbionti opportunisti.

Il genere *Trichoderma* è costituito da funghi ascomiceti filamentosi ubiquitari, isolati principalmente nei suoli agrari e forestali. Dal punto di vista tassonomico, questo genere appartiene alla divisione degli Ascomycota, cioè quei funghi che producono le spore all'interno dello sporangio detto asco. Fanno parte della classe dei Sordariomycetes, nell'ordine degli Hypocreales (Schuster and Schmoll, 2010). Storicamente nota per la sua forma anamorfica (asessuata) questa classe è caratterizzata da una rapida crescita miceliare e da un'abbondante produzione di conidi di colore verde, disposti su conidiofori molto ramificati. La sua struttura vegetativa include inoltre la formazione di spore dette clamidospore, che sono strutture a parete spessa che permettono la sopravvivenza in condizioni

ambientali avverse. Grazie a questa caratteristica sono funghi noti per la capacità di colonizzare con successo i propri habitat, combattendo i competitori. Una volta insediati, attivano il loro apparato degradativo per la decomposizione del substrato, spesso eterogeneo. Per quanto riguarda la fisiologia, *Trichoderma* è un organismo aerobio facoltativo e un attivo saprofita dotato di un potente corredo enzimatico extracellulare, ricco di cellulasi, chitinasi e glucanasi, che permettono la degradazione di substrati organici eterogenei e complessi (Sood et al., 2020). Questa versatilità metabolica, in cooperazione alla capacità di produrre metaboliti secondari ad azione antibiotica e di instaurare delle interazioni simbiotiche o di micoparassitismo con le radici delle piante e di altri funghi, rende *Trichoderma* uno dei più efficaci e studiati agenti di biocontrollo (BCA) e promotori della crescita vegetale (PGPB), in ambito agricolo e biotecnologico (Guzman-Guzmàn et al., 2023).

Questo genere è in grado di produrre o rilasciare una varietà di composti che inducono risposte di resistenza localizzate o sistemiche, il che spiega la loro mancanza di patogenicità di *Trichoderma* per le piante. Queste associazioni radice-microrganismo causano cambiamenti sostanziali nel proteoma e nel metabolismo della pianta che risulta quindi protetta dall'attacco di numerose classi di patogeni vegetali grazie all'induzione di risposte simili alla resistenza sistemica acquisita e alla resistenza sistemica indotta dai rizobatteri (Harman et al., 2004).

Trichoderma asperellum è una delle specie di maggiore interesse agronomico, grazie alla sua ottima capacità di adattamento, all'alta velocità di colonizzazione della rizosfera e alla produzione di metaboliti bioattivi. Quindi, l'interazione attiva con la pianta porta a un miglioramento della capacità di assorbimento dei nutrienti, un incremento dello sviluppo radicale e vegetativo, una maggiore efficienza fotosintetica e una migliore risposta agli stress ambientali, contribuendo ad aumentare la produttività della coltura (Woo et al., 2014).

Oltre agli effetti biostimolanti, *T. asperellum* ha anche un ruolo nella lotta biologica contro i funghi fitopatogeni. Il suo meccanismo d'azione si basa principalmente sulla competizione per spazio e nutrienti, sul micoparassitismo (le ife di *T. asperellum* si avvolgono attorno a quelle dei funghi tossici causandone la lisi diretta) e sulla produzione di metaboliti secondari ed enzimi litici, quali cellulasi, glucanasi e chitinasi, che hanno la capacita di degradare la parete cellulare dei funghi patogeni (Elshahawy et al., 2023). Fondamentale è la sua attività nei confronti di specie appartenenti al genere *Fusarium*, responsabili di malattie del mais e della produzione di micotossine, tra cui fumonisine, zearalenone e tricoteceni. Pur non degradando direttamente le micotossine, *T. asperellum* limita lo sviluppo dei funghi produttori, contribuendo indirettamente alla riduzione della contaminazione della granella (López-Coria et al., 2023).

1.7 Strategie per migliorare le performance delle varietà tradizionali mediante l'utilizzo di *Trichoderma*

L'adozione delle pratiche agricole intensive ha portato ad un incremento della produttività delle colture, ma, anche evidenti conseguenze ambientali legate all'eccessivo sfruttamento delle risorse naturali. L'agricoltura industriale moderna è caratterizzata da un abbondante uso di input chimici, come fertilizzanti minerali, erbicidi e pesticidi. L'utilizzo di questi composti è spesso associato a fenomeni di alterazione del suolo, con un'elevata perdita di biodiversità, contaminazione delle acque e diminuzione della resilienza degli agroecosistemi (Tilman et al., 2002). La progressiva consapevolezza dell'impatto di tali pratiche intensive sull'ambiente ha portato negli ultimi decenni a una crescita dell'interesse verso modelli agricoli maggiormente sostenibili, capaci di garantire rese produttive adeguate riducendo contemporaneamente l'impatto ambientale delle pratiche agricole (Foley et al., 2011).

L'agricoltura sostenibile ha come obbiettivo soddisfare i fabbisogni alimentari attuali senza però andare a compromettere la capacità delle future generazioni di soddisfare le loro necessità e i loro fabbisogni. Questo approccio punta ad integrare la maggior produttività agricola con una maggiore tutela ambientale e un aumento della sostenibilità economica, andando a promuovere le pratiche colturali che permettono di preservare la fertilità del suolo, la biodiversità e la qualità degli ecosistemi agricoli (Pretty, 2008). Un modello di produzione agricola più sostenibile è l'agricoltura biologica. Questa è basata sulla diminuzione o l'esclusione di fertilizzanti e pesticidi di sintesi e sull'utilizzo prioritario di mezzi e pratiche tecniche naturali, come per esempio le rotazioni colturali e l'utilizzo degli organismi benefici per il controllo dei patogeni e il miglioramento della fertilità del suolo (Reganold and Wachter, 2016). Ogni paese stabilisce i propri standard legali per la coltivazione biologica, con possibilità, in casi eccezionali, di autorizzazioni a deroghe rispetto a questi principi generali.

Nell'ambito di sistemi agricoli sostenibili un ruolo importante è rivestito dalle varietà tradizionali, che garantiscono tendenzialmente una maggiore adattabilità agli ambienti locali a discapito però di rese spesso anche molto inferiori rispetto agli ibridi moderni che sono stati selezionati per garantire rese elevate in sistemi intensivi ad alto input. Per questo motivo, risulta necessario individuare strategie agronomiche in grado di migliorare le performance produttive di queste varietà senza compromettere le loro caratteristiche qualitative. Tra queste strategie, particolare interesse è stato focalizzato sull'utilizzo di biostimolanti e microrganismi benefici, che vengono considerati strumenti promettenti per incrementare la sostenibilità e la resilienza dei sistemi agricoli (Rouphael and Colla, 2020).

L'agricoltura convenzionale moderna può favorire la diffusione di ceppi fungini resistenti, aumentando la vulnerabilità dei sistemi colturali (Lucas et al., 2015). Nel caso del mais, uno dei

problemi più gravi legati alla coltivazione intensiva è lo sviluppo di funghi fitopatogeni in grado di produrre grandi quantità di micotossine. Questo fenomeno è causato da diverse specie, tra cui quelle appartenenti ai generi *Fusarium* e *Aspergillus*. Le micotossine sono una criticità sia dal punto di vista agronomico sia sanitario, perché portano contaminazioni delle cariossidi riducendo la produzione e compromettendo la qualità delle produzioni destinate all'alimentazione umana e animale (Munkvold, 2009). Nel caso delle varietà tradizionali di mais, la gestione sostenibile delle infezioni fungine assume un ruolo particolarmente importante, poiché tali varietà sono coltivate in sistemi agricoli a basso input e destinati a produzioni tipiche e locali (Mazzola and Freilich, 2017).

A differenza dei fertilizzanti tradizionali, i biostimolanti non vanno ad agire come fonte diretta di nutrienti, ma vanno a influenzare positivamente i processi fisiologici e metabolici delle piante determinando l'incremento della resilienza delle colture e la riduzione degli effetti negativi portati, tra gli altri anche da patogeni fungini, responsabili della contaminazione da micotossine (Brown and Saa, 2015).

I microrganismi benefici sono difatti in grado di poter competere con i funghi patogeni nella rizosfera, riducendo l'incidenza delle infezioni e migliorando allo stesso tempo lo stato fisiologico della pianta. Questo ha un'elevata rilevanza per le varietà locali, come per il mais Ottofile del Pavese, valorizzate primariamente per la qualità nutrizionale e tradizionale delle produzioni (Woo et al., 2023).

Svariati studi hanno dimostrato che l'utilizzo di biostimolanti può determinare effetti positivi sulla crescita vegetativa e produttiva delle colture agrarie. Tra i principali effetti osservati ci sono l'aumento della biomassa radicale, il miglioramento dell'assorbimento di macro e microelementi e una maggiore efficienza nell'utilizzo dei nutrienti disponibili nel suolo. L'incremento dello sviluppo radicale quindi permette alle piante di esplorare nuovi volumi di suolo ed estendersi maggiormente, aumentando così la disponibilità di acqua e nutrienti anche in condizioni ambientali limitanti (Halpern et al., 2015).

I biostimolanti influenzano inoltre i meccanismi fisiologici che si attivano nella risposta agli stress abiotici. Dati di letteratura hanno evidenziato come questi prodotti possano essere in grado di modulare la produzione di fitormoni, l'attività antiossidante e l'espressione di geni coinvolti nelle risposte allo stress, andando a contribuire e a migliorare la tolleranza delle colture a condizioni di siccità, stress salino e alte temperature (Rouphael and Colla, 2020). Questi effetti sono importanti nel contesto del cambiamento climatico in atto, con aumento della frequenza degli eventi meteorologici estremi e delle condizioni di stress ambientale (Bulgari et al., 2019).

Il *Trichoderma* presenta un doppio beneficio alla pianta poiché agisce sia da agente di biocontrollo sia da biostimolante. Come biostimolante, *Trichoderma* può influenzare diversi processi fisiologici della pianta. Infatti, diversi studi hanno evidenziato che alcune specie sono in grado di produrre metaboliti secondari simili agli ormoni vegetali, come per esempio le auxine e diversi composti

volatili, capaci di incentivare lo sviluppo radicale e migliorare l'assorbimento dei nutrienti (López-Bucio et al., 2015). Inoltre, la consistente colonizzazione della rizosfera da parte di *Trichoderma* può modificare positivamente il microbioma del suolo, favorendo la disponibilità di nutrienti minerali e aumentando l'efficienza nutrizionale delle colture (Woo et al., 2023). Per quanto riguarda il possibile ruolo di *Trichoderma* nel migliorare le performance di varietà tradizionali di mais è stato dimostrato che l'inoculazione con specie di *Trichoderma* permette di migliorare la resistenza delle colture a condizioni avverse come siccità, elevata salinità e stress termico, attraverso la modulazione dei sistemi antiossidanti e dei meccanismi fisiologici coinvolti nella risposta allo stress come dimostrano studi su mais e *Pinus massoniana* (Guler et al., 2016). Il *Trichoderma* riduce i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e il conseguente danno ossidativo potenziando l'attività degli enzimi antiossidanti come SOD (Superossido Dismutasi), catalasi, APX (Ascorbato Perossidasi) e perossidasi (Mastouri et al., 2012; Abirami et al., 2022).

Nel mais, l'utilizzo di sostanze e di formulati aventi come principio attivo il *Trichoderma* hanno mostrato risultati positivi sia per quanto riguarda il miglioramento della crescita vegetativa sia per quanto riguarda la riduzione dell'incidenza di patogeni fungini responsabili della produzione di micotossine. Alcuni di questi studi hanno successivamente evidenziato anche un aumento della biomassa radicale, dell'assorbimento di nutrienti e della produttività delle piante trattate con *Trichoderma* rispetto ai controlli non inoculati (López-Bucio et al., 2015). Inoltre, la capacità antagonista di *Trichoderma* nei confronti di specie appartenenti al genere *Fusarium* rende questi microrganismi candidati promettenti per strategie di difesa sostenibile nel mais, soprattutto in sistemi agricoli a basso input e nella valorizzazione delle varietà tradizionali (Vinale et al., 2008).

Per inoculare il *Trichoderma* sui semi viene generalmente utilizzato un pellicolante. Questo agevola la concia dei semi perché è un biopolimero adesivo liquido che fissa gli agrofarmaci e/o i nutrienti (in questa tesi *Trichoderma asperellum*) alla superficie dei semi, senza compromettere la vitalità del seme (Kthiri et al., 2019). Viene utilizzato perché le spore del fungo hanno la consistenza di polveri sottili che si staccherebbero facilmente dal seme durante il trasporto, il confezionamento e durante la semina meccanica. Il ruolo del pellicolante è quello di creare una pellicola elastica che incolla le spore al tegumento, che è la parte più esterna, del seme, assicurando quindi che il microorganismo arrivi intatto nel terreno dove svolgerà le sue funzioni (Robani, 1994).

Oltre che garantire l'attaccamento al seme agevola la sopravvivenza del fungo. Perché si comporta da scudo temporaneo andando a proteggere il *Trichoderma* dalla disidratazione, dagli sbalzi termici e dall'azione diretta di altri agenti chimici, come per esempio fungicidi compatibili (Malavathu et al., 2025). Ha funzione di protezione anche per l'operatore perché riesce ad evitare la dispersione di polveri nocive nell'aria durante le pratiche di manipolazione dei sacchi e durante l'uso delle seminatrici.

Il pellicolante agevola la germinazione, perché è idrosolubile o semi-permeabile. Quindi una volta che il seme è interrato la pellicola svolge la funzione di spugna e assorbe l'umidità del suolo, andando a dissolversi o a gonfiarsi e così facendo permette all'acqua di attivare sia la germinazione del seme sia lo sviluppo delle spore di *Trichoderma*, che colonizzeranno immediatamente la rizosfera (Accinelli et al., 2016).

2. SCOPO

La tesi si inserisce nell'ambito del progetto RUSTICO (Resilienza ai cambiamenti climatici con funghi biostimolanti per la coltivazione di piante ortive e piante cerealicole come il mais), finanziato dalla fondazione LGH.

Il presente lavoro si propone di valutare l'effetto dell'inoculo del fungo biostimolante *Trichoderma asperellum* sullo sviluppo vegetativo e produttivo del mais Ottofile Pavese. In particolare, lo studio punta a verificare se il trattamento con *Trichoderma asperellum* possa essere in grado di influenzare positivamente diversi parametri morfologici, fisiologici e agronomici della coltura, come l'altezza della pianta, l'altezza della spiga, la capacità fotosintetica, la percentuale di germinazione e la resa. Inoltre è prevista la valutazione dell'azione antifungina di *Trichoderma asperellum* contro *Fusarium spp.* e *Ustilago maydis* tramite confronto tra mais non trattato e trattato.

L'interesse verso *Trichoderma asperellum* deriva dalla sua riconosciuta capacità di instaurare interazioni benefiche con le piante coltivate. Questo fungo, infatti, è in grado di colonizzare l'apparato radicale, promuovere l'assorbimento dei nutrienti, stimolare la crescita vegetativa della pianta, migliorare la tolleranza della pianta agli stress ambientali e favorire in maniera attiva la protezione nei confronti di diversi agenti patogeni. Queste caratteristiche lo rendono uno dei microrganismi studiati nell'ambito dei biostimolanti microbici e un importante alleato per lo sviluppo di pratiche agricole sostenibili.

Questo studio si propone quindi di valutare l'efficacia di *Trichoderma asperellum* come biostimolante e agente di biocontrollo sulla varietà tradizionale di mais Ottofile del Pavese, con l'obiettivo di migliorarne le performance produttive e qualitative e valorizzarla come prodotto locale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale

La varietà di mais oggetto di questo studio è l'Ottofile del Pavese. Questa *landrace* è stata storicamente coltivata nell'area della provincia di Pavia per la produzione di farina destinata alla preparazione della polenta. Il suo nome è dovuto alla caratteristica disposizione delle cariossidi in otto ranghi (file) lungo la spiga. L'Ottofile del Pavese presenta un ridotto fabbisogno idrico, caratteristica che rende questa varietà adatta alla coltivazione low input (**FIG. 6**).



FIGURA 6: *Spighe della varietà Ottofile del Pavese*.

3.2 Biostimolante

In questo studio, il biopriming è stato utilizzato come tecnica di biostimolazione. Questa pratica consiste nel trattamento dei semi tramite inoculazione di specifici microrganismi benefici prima della semina. Come microrganismo benefico è stato scelto il *Trichoderma asperellum*. Questo fungo ha ottenuto particolare interesse perché grazie alla sua ottima capacità di adattamento, all'alta velocità di colonizzazione della rizosfera e alla produzione di metaboliti bioattivi incrementa le difese della pianta e la produttività della coltura (Who et al., 2014).

Lo sviluppo della coltura di *T. asperellum* è stato condotto in collaborazione e con il supporto del personale del Laboratorio di Micologia del DSTA (Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente).

Il *T. asperellum* è stato coltivato in piastre petri contenenti il terreno DRBC. Questo terreno ha un caratteristico colore rosa ed è molto selettivo. La selettività deriva da più agenti: il Dicloran limita l'espansione delle muffe, il Rose Bengal contribuisce all'inibizione e dà il tipico colore rosa, e il cloramfenicolo inibisce la crescita batterica (King et al., 1979) (**FIG.7**).

La composizione del terreno DRBC (1 litro) è la seguente:

Peptone (digerito enzimatico di tessuti animali e vegetali): 5,0 g;

Fornisce azoto, aminoacidi, vitamine e carbonio essenziali per la crescita microbica.

D-Glucosio (Dextrose): 10,0 g;

Fonte di carboidrati fermentabili ed energia per lieviti e muffe.

Potassio diidrogeno fosfato (KH_2PO_4): 1,0 g;

Agente tampone per mantenere stabile il pH.

Solfato di magnesio ($MgSO_4$ $7H_2O$): 0,5 g;

Fornisce gli ioni di magnesio e oligoelementi necessari al metabolismo.

Rosa Bengala: 0,025 g;

Colorante che inibisce la crescita eccessiva dei batteri e riduce le dimensioni delle colonie fungine per facilitare il conteggio.

Cloramfenicolo: 0,1 g;

Antibiotico termostabile ad ampio spettro che inibisce selettivamente la flora batterica contaminante presente nel campione.

Dicloran (2,6-dicloro-4nitroanilina): 0,002 g (2 mg);

Inibisce la diffusione rapida delle colonie di muffe a crescita filamentosa invasiva e limita le dimensioni delle altre colonie.

Agar: 15,0 g;

Agente solidificante del terreno.

Per coltivare il *Trichoderma asperellum* si possono utilizzare due metodi. Si può utilizzare il micelio del fungo, e in questo caso si ottiene una proliferazione più lenta. Alternativamente si possono utilizzare le spore, dette conidiospore, che si ricavano dal fungo madre o da altre colture in piastre petri, raschiando leggermente le spore in superficie, e in questo caso si ha una proliferazione e dispersione del fungo maggiore (Serna-diaz et al., 2020). Una volta che le spore sono state recuperate dalla madre, vengono diluite. Infatti se si semina una soluzione troppo concentrata le spore cresceranno molto vicine e si avrà una massa indistinta di micelio. Invece diluendo il campione le spore vengono separate più facilmente nel terreno di coltura. Germinando daranno delle colonie isolate e geneticamente pure. Diluire le spore rende la conta delle spore e la quantificazione (UFC) più facile (K. Martini et al., 2024). Dopo la diluizione, si costituisce una nuova coltura su un nuovo terreno, che è stato anticipatamente sterilizzato a 121°C, 1bar di pressione per venti minuti, versando 3ml di soluzione con una pipetta Pasteur da 1ml sulla piastra DRBC, dopodiché la superficie della piastra viene ricoperta perfettamente grazie all'utilizzo di un distributore a L. Il processo viene eseguito sotto una cappa biologica a flusso laminare verticale, per garantire una doppia protezione: salvaguardare l'operatore e proteggere il campione da contaminazioni esterne.

Alla fine della coltura, per la conta delle spore si utilizza una diluizione 1:50 diluendo venti microlitri di spore in 1 ml finale.

Per la conta delle spore si usa la camera conta globuli. La quantificazione delle spore di *T. asperellum* è uno dei passaggi più importanti per valutare la resa della coltura. Parte fondamentale è la preparazione e l'allestimento della camera. Questa è uno speciale vetrino portaoggetti che, in accoppiamento a un vetrino coprioggetti, crea uno spazio con un volume noto e preciso, infatti è importante il processo di regolazione dello spessore. Tra il vetrino portaoggetti e il coprioggetti si crea una fessura. È fondamentale riempire in modo corretto questo spazio e calibrare la quantità di liquido da esaminare. Se lo spazio tra i vetrini non viene allestito correttamente, il volume di liquido analizzato non sarà quello previsto, compromettendo l'esito della conta (Mukherjee and Kenerley, 2010).

Un altro passaggio importante è la messa a fuoco al microscopio, poiché la camera ha profondità tridimensionale e le spore in sospensione liquida non si troveranno tutte sullo stesso piano focale. Pertanto, durante l'osservazione, è fondamentale regolare continuamente il fuoco per riuscire a contare anche le spore che si trovano a profondità diverse all'interno della camera.

Il reticolo di lettura è la parte centrale della camera ed è incisa al laser con una griglia millimetrata quasi invisibile a occhio nudo, ma ben definita al microscopio. La sua struttura è formata da diverse linee incise che si incrociano formando un reticolo geometrico. Questi quadratini hanno uno schema specifico, infatti, ogni incrocio principale delle linee delimita dei settori che contengono al loro interno 20 quadratini più piccoli.

Una volta che è stato ottenuto il numero grezzo delle spore contate al microscopio, si utilizza una formula matematica per estrapolare la concentrazione reale nel campione originale, espressa in spore/µl.

$$\text{Spore}/\mu\text{l} = \frac{n}{\text{n}^\circ \text{ quadrati contati} \times (2,5 \cdot 10^{-3}) \times 0,2} \times \text{Diluizione}$$

Dove: "*n"* È il numero totale delle spore contate. "0,2" è la profondità della camera di conta cioè lo spessore del liquido espressa in millimetri, "Diluizione" è il fattore moltiplicativo essenziale, infatti se il campione originale era troppo denso per essere contato, viene diluito (1:50).

Una volta eseguito il calcolo, è possibile valutare il successo della propria coltura. Un buon prodotto in commercio ha una concentrazione di 10^9 spore/ml.

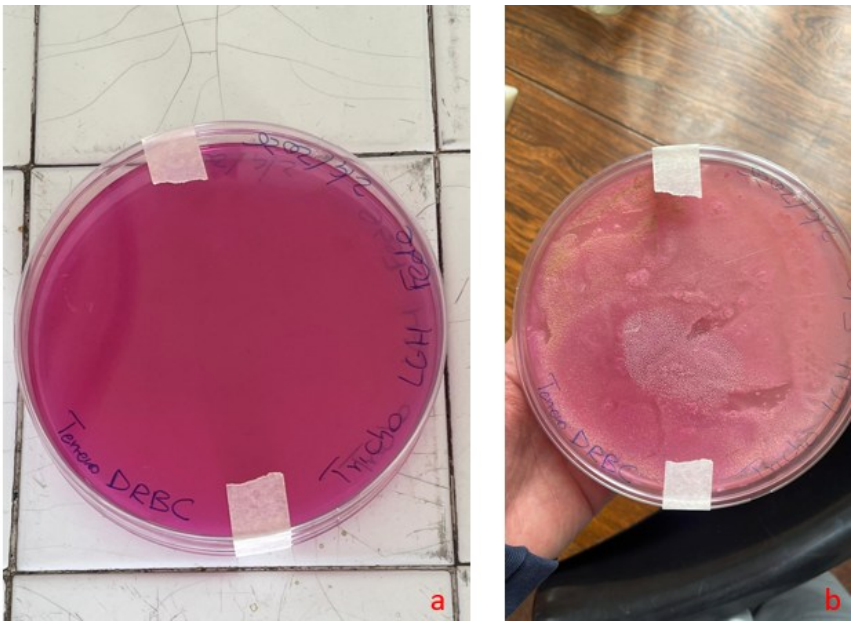


FIGURA 7: *Trichoderma asperellum appena piastrato (a) e dopo circa un mese (b).*

3.3 Campi sperimentali

Questo progetto di ricerca ha previsto la pianificazione degli esperimenti su 2 diversi campi sperimentali.

Il primo campo è situato a Landriano (PV), 88 m slm (45°55'50.66"N, 10°13'48,98"E) ed è il campo sperimentale dell'Università degli Studi di Milano. L'analisi del suolo ha riportato un suolo sabbio-argilloso (**FIG.8**).



FIGURA 8: I *campi di Landriano (a sinistra) e di Romagnese (a destra).*

Il secondo campo sperimentale si trova a Romagnese (PV), più precisamente nella frazione di La Crotta. Fa parte dell'azienda agricola Terre Villane dei fratelli Mori. Il campo si trova a un'altitudine

di circa 850 m slm. Ha perimetro di circa 500 m con un'area di circa 7.000 metri quadrati. Si trova a 44°50'38.63"N 9°18'24.34"E.

3.4 Analisi del suolo

Prima della semina, sono stati prelevati campioni di terreno sia dal campo di Landriano che dal campo di Romagnese in conformità al DM del 13/09/1999 e inviati alla società MAP (Minoprio Analisi e Certificazioni srl), che ha eseguito le analisi chimico-fisiche. I risultati delle analisi del terreno di Landriano sono riportati nella **TAB. 1**, non sono ancora disponibili le analisi del terreno di Romagnese.

Analisi del terreno	Landriano
Sabbia	55.4%
Limo	34.4%%
Argilla	10.3%
pH (H2O)	6.7
pH (HCl)	6.5
Carbonati (CaCO3)	<5 g/kg
C totale	14.4 g/kg
N totale	1.52 g/kg
Materia organica	24.17 g/kg
Carbonio organico Totale (TOC)	14.02 g/kg
Rapporto C/N	9.2
Ca scambiabile	2.95 meq/100g
Mg scambiabile	0.91 meq/100g
K scambiabile	0.75 meq/100g
Na scambiabile	0.03 meq/100g
Capacità di scambio cationico (CSC)	9.6 meq/100g
P disponibile	90 mg/kg

TABELLA 1: Composizione del terreno di Landriano.

3.5 Piano sperimentale

Nei due campi, di Landriano e Romagnese sono stati seminati nella primavera del 2025 e in quella del 2026 semi di Ottofile del Pavese trattati con *Trichoderma asperellum* e il controllo non trattato. Il campo a Landriano è stato seminato alla fine di aprile in entrambi gli anni e circa due settimane prima è stato seminato il campo a Romagnese.

Nel campo sperimentale di Landriano oltre all'Ottofile del Pavese sono state coltivate altre accessioni per altri progetti di ricerca, mentre nel campo di Romagnese è stata coltivata solo la varietà Ottofile del Pavese. Nel campo di Landriano sono stati seminati manualmente 100 semi a una profondità di 3-4 cm, con una distanza di 25 cm tra i semi e di 70 cm tra le file, invece nel campo di Romagnese sia quest'anno che l'anno scorso è stato messo a disposizione un campo di circa dieci pertiche

coltivato completamente a Ottofile del Pavese e seminato mediante semina meccanizzata. Il campo di Landriano viene irrigato al bisogno mentre il campo di Romagnese non viene irrigato.
La raccolta nel 2025 è iniziata a fine settembre in entrambi i campi, mentre quest'anno è stata anticipata a fine agosto a Landriano e a metà settembre a Romagnese.

3.6 Riproduzione di varietà locali tramite impollinazione controllata

Nel campo di Landriano l'Ottofile del Pavese è stato moltiplicato tramite impollinazione controllata *sib-pool* (incrocio tra fratelli), per preservarne la purezza e la diversità genetica. Nel campo di Landriano a differenza del campo di Romagnese ci sono altre varietà di mais che potrebbero impollinare le piante di Ottofile del Pavese che perderebbe così la sua purezza. Quattro- cinque spighe della varietà in esame sono state isolate utilizzando dei sacchetti di carta, al fine di evitare la fecondazione con polline indesiderato. Successivamente, al raggiungimento della maturità (antesi), è stato raccolto il polline da 4-5 piante, ciascuna corrispondente all'ideotipo dell'accessione. La miscela dei pollini ottenuta è stata utilizzata per impollinare le spighe della accessione in studio precedentemente isolate con i sacchetti di carta.
Per fissare la diversità genetica osservata in specifiche piante, si è proceduto alla loro moltiplicazione tramite autofecondazione controllata; in questo caso, ogni pianta è stata impollinata utilizzando il proprio polline anziché la miscela proveniente da diverse piante della stessa accessione.
All'interno di ciascuna accessione, alcune piante sono state lasciate riprodurre mediante impollinazione libera (open pollination) al fine di valutarne la produttività.

3.7 Test di germinazione e analisi del seedling

Dopo la raccolta e l'essicazione delle spighe in stufa a 40°C per 4-6 giorni, sono stati realizzati dei test di germinazione sui semi dell'Ottofile del Pavese.
Il procedimento consiste nel prelevare 20 semi da 3 diverse spighe della stessa accessione (spighe provenienti da piante diverse della stessa varietà, coltivate nella stessa località e nelle medesime condizioni). I semi vengono sterilizzati per 15 minuti in ipoclorito di sodio (candeggina commerciale, NaClO al 5%), quindi lavati con acqua e incubati in provette da 50 ml contenenti acqua, all'interno di un bagno termostatico a 37°C per 3 ore. Dopo tale incubazione, i semi sono stati sottoposti a un secondo ciclo di sterilizzazione: incubazione per 10 minuti in ipoclorito di sodio al 5% e successivo lavaggio con acqua.
Dopo la sterilizzazione, i semi vengono disposti in contenitori di plastica. I semi sono collocati su 3 strati di carta da filtro (inumidita) e coperti con un ulteriore strato di carta per mantenere l'umidità fino all'emissione delle radici (**FIG. 9**).

I contenitori vengono posti all'interno di una camera climatica modello M250-RHL (MPM Instruments s.r.l., Bernareggio, Italia), nella banca del germoplasma. Lo strumento è specifico per la crescita controllata a 25°C e al 60% di umidità relativa, mantenendo l'oscurità per 3 giorni e successivamente esponendo i campioni a 14 ore di luce artificiale per 7 giorni (**FIG. 10**). I semi vengono controllati quotidianamente e viene registrato il numero di semi germinati; i semi ammuffiti o non germinati vengono rimossi.



FIGURA 9: A *sinistra (a) l'allestimento del test di germinazione. A destra (b), vasche del test di germinazione seminate e pronte per essere poste nella camera climatica*.



FIGURA 10: *Camera climatica con fotoperiodo, temperatura e umidità controllati (MPM Instruments, mod. M250-RHL),*

Sono stati considerati germinati i semi che presentavano una protrusione della radichetta primaria di almeno 2 mm.

I seguenti parametri di germinazione sono stati calcolati secondo il metodo utilizzato da Ranal and Santana (Ranal and Santana, 2006): percentuale finale di germinazione o germinabilità (G%), tempo mediano di germinazione (T50), tempo medio di germinazione (MGT), valore di picco (PV) e indice di germinazione (Gi).

Questi parametri sono stati misurati per i semi raccolti nel 2025 mentre per i semi 2026 è ancora in corso il processo di raccolta ed essiccazione delle spighe raccolte.

La scelta dei parametri di germinazione fa riferimento alle metriche pubblicate da Aravind et al. (Aravind et al., 2023) **(FIG. 11**).



FIGURA 11: *L'immagine mostra 3 fasi diverse del test di germinazione. L'immagine a si riferisce al tempo di germinazione zero. L'immagine b si riferisce al terzo giorno di germinazione al buio. L'immagine c invece si riferisce al 10° giorno di germinazione (3 giorni di buio e 7 di luce).*

Al decimo giorno di crescita, sono state raccolte dieci plantule, separate in radici e germogli per valutare la vigoria iniziale delle piantine, asciugate leggermente, e per ciascun organo è stato misurato il peso fresco usando la bilancia tecnica di precisione Kern PNJ 600-3M (portata massima 620 g, risoluzione 0,1 g, precisione ±0.004 g); successivamente i campioni sono stati essiccati nella stufa a ventilazione naturale (modello STF-N 52, FALC) a 60-65°C fino a peso costante per determinare il peso secco, e il contenuto d'acqua è stato calcolato dalla relazione tra peso fresco e peso secco in percentuale (Zhang et al., 2024; Fatima et al., 2020) (**FIG. 12**).



FIGURA 12: P*rocedura di separazione di radici e germogli prima dell'essicazione in stufa*.

3.8 Parametri agronomici

I dati agronomici sono stati rilevati durante lo sviluppo delle piante, in campo, e dopo la raccolta.

In campo, su almeno 15 piante della varietà Ottofile del Pavese, sono stati misurati: l'altezza della pianta (misurata partendo dal terreno fino alla foglia bandiera l'altezza della spiga (misurata dal terreno al nodo in cui si inserisce la spiga principale che è la più alta), l'epoca di fioritura (misurata contando i giorni dalla semina), l'altezza del pennacchio (misurata dalla foglia bandiera alla fine del pennacchio) e il contenuto di clorofilla (misurata con metodo non distruttivo grazie allo strumento SPAD utilizzato sulla foglia più verde) (Williams et al., 2021). Questi dati morfologici sono stati presi nelle stagioni 2025-2026 in tre tempi successivi per monitorare la crescita e le differenze tra le piante trattate con *Trichoderma* e quelle non trattate.

Dopo la raccolta, sono stati determinati la resa della spiga (espressa in grammi di semi/spiga) e il peso di mille semi. Il primo parametro misura la produttività lorda della spiga, pesando la spiga per intero, poi si sgrana e si pesa tutta la granella e il tutolo. La resa della granella indica la resa utile effettiva. Per il peso di mille semi, che stima la dimensione e il riempimento dei chicchi, si preleva un campione rappresentativo della granella, si contano mille semi e si pesano su una bilancia di precisione (Kamran et al., 2018). Entrambi i parametri vengono misurati in triplicato (tre spighe).

Tali parametri rientrano tra quelli richiesti per la compilazione della scheda UPOV (Unione Internazionale per la Protezione delle Nuove Varietà Vegetali), volta a raccogliere i dati morfologici per l'identificazione di una varietà, passaggio fondamentale per l'iscrizione nel catalogo delle "Varietà da conservazione" (UPOV 51 - Mais) (Jamali et al., 2019).

3.9 Analisi genetica

Per l'analisi genetica sono stati usati i marcatori molecolari microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeats). Questi sono costituiti da ripetizioni in tandem di sequenze corte, distribuite largamente nei genomi eucariotici, procariotici e virali, si trovano sia nelle regioni codificanti che non codificanti. Nel genoma umano occupano il 3% e in alcune piante la percentuale è molto più bassa (Lei et al., 2021). La loro elevata variabilità deriva dallo slittamento durante la replicazione, che modifica il numero di unità ripetute e produce tassi mutazionali superiori a quelli delle sostituzioni nucleotidiche ordinarie (Hodel et al., 2016). I microsatelliti sono marcatori molecolari codominanti, multiallelici e altamente informativi, quindi adatti a distinguere individui, popolazioni e taxa strettamente affini. L'elevato polimorfismo è il loro principale vantaggio, ma hanno anche limiti come l'omoplasia, determinata da mutazioni inverse e la necessità di scegliere con cura il numero e il tipo di loci, soprattutto negli studi comparativi tra specie (Wang et al., 2021).

L'analisi genetica è stata effettuata sulle 4 varietà Ottofile coltivate in Lombardia (Ottofile Pavese, Ottofile Tortonese, Ottofile di Codera, Ottofile del Garda) e, come controllo, sono state utilizzate 3 varietà tradizionali di mais da polenta coltivate in Lombardia, e fenotipicamente distinte dalle varietà Ottofile (Mais delle Fiorine, Spinato di Gandino, Rostrato Rosso di Rovetta). Le varietà utilizzate come controllo sono state raccolte e conservate *ex situ* nella banca del germoplasma del CREA-CI (Consiglio per la Ricerca Agricola ed Economica, centro di ricerca sulle colture cerealicole e industriali; BG, Italia) prima dell'avvento degli ibridi commerciali e quindi rappresentano la diversità del mais presente prima dell'erosione genetica associata diffusione su larga scala degli ibridi.

3.9.1 Estrazione del DNA

Per il test sui primer SSR da utilizzare per l'analisi genetica, l'estrazione di DNA è stata effettuata seguendo il protocollo di Vejlupkova e Fowler (Vejlupkova and Fowler, 2003) utilizzando campioni di tessuto fogliare prelevati da plantule di ibrido e della varietà Ottofile del Pavese. Sono stati prelevati 20-40 mg di tessuto fogliare, a cui sono stati aggiunti 300 µl di buffer di estrazione (2 M NaCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 70 mM EDTA, pH 8,0; 20 mM sodio metabilsofito; pH 8,0) e 100 µl di SLS (sodio laurilsolfato) al 5%. I tessuti sono stati macinati con pestello per 40-60 secondi. In seguito, i campioni sono stati incubati in un bagnetto termostatato a 60°C per 30 minuti e poi centrifugati a 13.000 rpm per 15 minuti. Sono stati quindi prelevati 150 µl di surnatante, a cui sono stati aggiunti 150 µl di acetato di ammonio 5 M e 300 µl di isopropanolo; i campioni sono stati mescolati tramite inversione, incubati a temperatura ambiente per 15 minuti e successivamente centrifugati a 13.000 rpm per 15 minuti per consentire la precipitazione del DNA. Il surnatante è stato eliminato, rovesciando la provetta e il pellet è rimasto adeso al fondo del tubo grazie alla precedente

centrifugazione. Il pellet è stato lavato con 150 µl di etanolo al 70% e nuovamente centrifugato per 5 minuti a 13.000 rpm. Dopo aver rimosso il surnatante, il pellet è stato lasciato ad asciugare per 15 minuti a temperatura ambiente. Il DNA è stato, poi, risospeso in 30 µl di acqua ultrapura (molecular biology grade) pronto per poter essere amplificato tramite PCR (reazione a catena della polimerasi).

3.9.2 Amplificazione tramite PCR

Ciascun campione è stato preparato con un volume finale di 25 µl, contenente: 1 µl di DNA genomico precedentemente estratto (1-10 ng/µl), 5 µl di 5X Green GoTaq Reaction Buffer (Promega), 1 µl di primer forward (25 µM), 1 µl di primer reverse (25 µM), 1 µl di dNTPs (10 mM), 0,5 µl di DNA polimerasi GoTaq G2 (Promega) e 15,5 µl di H2O ultrapura per raggiungere il volume finale. I componenti della reazione sono stati aggiunti nel seguente ordine: acqua, 5X Green GoTaq Reaction Buffer (Promega), dNTPs, primers, DNA polimerasi GoTaq G2 (Promega) e DNA genomico.

Il programma PCR utilizzato, tramite il termociclatore Bio-Rad T100, ha previsto le seguenti fasi: 94°C per 2 minuti, (94°C per 1 minuto, 63°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto) per 35 volte e 72°C per 5 minuti.

Le sequenze dei primer SSR utilizzati sono le seguenti (**TAB. 2**):

SSR name	Sequence (5' to 3')	Tm °C
Bnlg1028 F	AGGAAACGAACACAGCAGCT	
Bnlg1028 R	TGCATAGACAAAACCGACGT	57
Bnlg1429 F	CTCCTCGCAAGGATCTTCAC	
Bnlg1429 R	AGCACCGTTTCTCGTGAGAT	63
Nc009 F	CGAAAGTCGATCGAGAGACC	
Nc009 R	CCTCTCTTCACCCCTTCCTT	62
Phi323152 F	TCAGGGAGCTCACCTACTACGG	
Phi323152 R	CACGACTGCACCGATTAGC	65
Umc1185 F	AGTAAAAGAGGCAAGGACTACGGC	
Umc1185 R	GCGGCGATATATACGAGGTTGT	63
Umc1356 F	ATACATTTTTACGTCCACGCCG	
Umc1356 R	CTAGGATAGTAGGAGTGCAGGGCA	63
Umc1506 F	AAAAGAAACATGTTCAGTCGAGCG	
Umc1506 R	ATAAAGGTTGGCAAAACGTAGCCT	63
Zag105 F	GACCGCCCGGGACTGTAAGT	
Zag105 R	AGAAAGAAGGTGACGCGCTTTTC	67

TABELLA 2: *Marcatori molecolari SSR utilizzati per la caratterizzazione genetica delle 7 varietà tradizionali.*

3.9.3 Elettroforesi su gel

Per ogni campione sono stati caricati 10 µl di prodotto di amplificazione tramite PCR su gel di agarosio al 3%.

Il gel è stato realizzato sciogliendo in forno a microonde 3 g di agarosio in 100 ml di TAE (Tris

Acetate EDTA buffer) ed aggiungendo 3 µl di etidio bromuro (10 mg/ml). La soluzione di agarosio è stata colata in una vaschetta per gel e lasciata solidificare a temperatura ambiente. Il gel è stato poi trasferito nella cella per la corsa elettroforetica, completamente sommerso con buffer TAE e, in seguito, sono stati rimossi i pettini che hanno lasciato i pozzetti con un volume di 20 µl ciascuno, in cui sono state successivamente caricati i prodotti di amplificazione.
Per confrontare le dimensioni dei prodotti di amplificazione è stato impiegato il marker 100 bp DNA Ladder (Solis Biodyne). Come controllo negativo è stato caricato anche un campione realizzato con una mix di amplificazione priva di DNA. La corsa elettroforetica è stata condotta a 70 V per circa 3 ore. A fine corsa il gel è stato osservato utilizzando il sistema GelDoc XR (Bio-Rad).

3.9.4 Analisi SSR eseguita da BMR.

Gli 8 primer forward sono stati marcati con fluorofori FAM o HEX. Sulla base degli intervalli di dimensione degli alleli previsti e delle combinazioni di coloranti, è stata elaborata una strategia di multiplexing conservativa al fine di ottimizzare l'efficienza di amplificazione e le procedure di analisi dei frammenti.
Le amplificazioni PCR sono state eseguite utilizzando la Platinum™ Multiplex PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) o il Multiplex PCR Kit (QIAGEN), seguendo le raccomandazioni dei produttori. Le amplificazioni multiplex consistevano in 40 cicli da 30 s a 94 °C, 90 s a 55 °C e 60 s a 72 °C, preceduti da una fase iniziale di denaturazione e completati da un'estensione finale di 30 min a 72 °C in un Eppendorf Mastercycler.
Dopo un'adeguata diluizione, l'analisi dei frammenti di DNA è stata eseguita mediante elettroforesi capillare utilizzando un analizzatore genetico Applied Biosystems® 3130xl (Thermo Fisher Scientific) con lo standard di dimensione GeneScan™ 500 LIZ™ (Thermo Fisher Scientific). I dati grezzi sono stati analizzati utilizzando il software Peak Scanner™ v1.0.
I dati di genotipizzazione SSR ottenuti sono stati successivamente utilizzati per la valutazione della diversità genetica, la valutazione delle relazioni genetiche tra le accessioni.

3.9.5 Genetic Diversity Analysis

Le relazioni genetiche tra le accessioni sono state valutate mediante un'analisi multivariata condotta con il software GenAlEx. È stata eseguita un'analisi delle coordinate principali (PCoA) basata sulla matrice delle distanze genetiche ricavata dai dati SSR, al fine di visualizzare le relazioni tra le accessioni in uno spazio multidimensionale ridotto.

3.10 Analisi statistiche

Il programma Microsoft Excel® è stato utilizzato per collezionare i dati.

L'analisi statistica è stata fatta con il software scientifico GraphPad Prism (versione 8.4.3, GraphPad Software LLC, San Diego, California, USA, 2020). Per confrontare le medie tra i gruppi sperimentali, sono stati usati due test. L' ANOVA a una via (One-way ANOVA) è stata utilizzata per valutare l'effetto di una singola variabile indipendente su una variabile dipendente quantitativa. L'ANOVA a due vie (Two-way ANOVA) è stata usata per esaminare l'effetto contemporaneo di due variabili indipendenti e identificare le eventuali variazioni derivanti dall'interazione tra i fattori sperimentali. L'omogeneità delle varianze è stata verificata con i test di Barlett (1937) e Brown-Forsythe (1974). Dopo i test ANOVA per capire quali gruppi differiscono significativamente tra loro sono usati test post-hoc (Sidak) per i confronti multipli tra i gruppi.

4. RISULTATI

L'obbiettivo di questo studio è valutare il ruolo e l'efficacia del fungo *Trichoderma asperellum* come biostimolante per massimizzare la resa in mais, e contribuire alla riduzione dell'impiego di composti chimici.

Nello specifico, questo studio si è focalizzato sugli effetti di *T. asperellum* sulla varietà tradizionale di mais Ottofile del Pavese.

Il piano sperimentale ha previsto la semina di questa coltura in due diversi campi posti a diverse altitudini e sottoposti a diverse pratiche agricole. Il primo campo sperimentale si trova a Landriano ad 88m slm, è soggetto alle lavorazioni agricole convenzionali, mentre il secondo campo si trova a Romagnese a 630 m slm, è stato coltivati in condizioni di *minimum tillage* (un sistema agricolo che interferisce il meno possibile con il terreno, evitando o riducendo le lavorazioni per prepararlo alla semina).

L'efficacia del *T. asperellum* come biostimolante è stata testata tramite la tecnica del *biopriming*. Per verificare l'effetto stimolante è stato valutato il vigore della pianta analizzando diversi parametri, quali: l'altezza della pianta, l'altezza della spiga, il contenuto di clorofilla (SPAD), la percentuale di germinazione e la resa. È stata inoltre valutata la capacità del *T. asperellum* di agire come antagonista nei confronti di funghi patogeni. A tal fine, è stata analizzata l'incidenza di *Ustilago maydis* e di *Fusarium spp*. responsabili di importanti patologie del mais, confrontando piante trattate e non trattate con *T. asperellum*.

È opportuno sottolineare che le condizioni climatiche avverse registrate da circa metà aprile fino a fine luglio 2026 hanno condizionato significativamente lo sviluppo delle piante, determinando risultati che potrebbero non essere pienamente rappresentativi delle normali condizioni di coltivazione. Infatti, la siccità, le elevate temperature e i valori anomali di umidità relativa registrati in questo arco temporale (**Fig. 13**) hanno sottoposto le piante a condizioni di forte stress ambientale, compromettendone la crescita e potenzialmente influenzando gli effetti biologici del trattamento applicato.

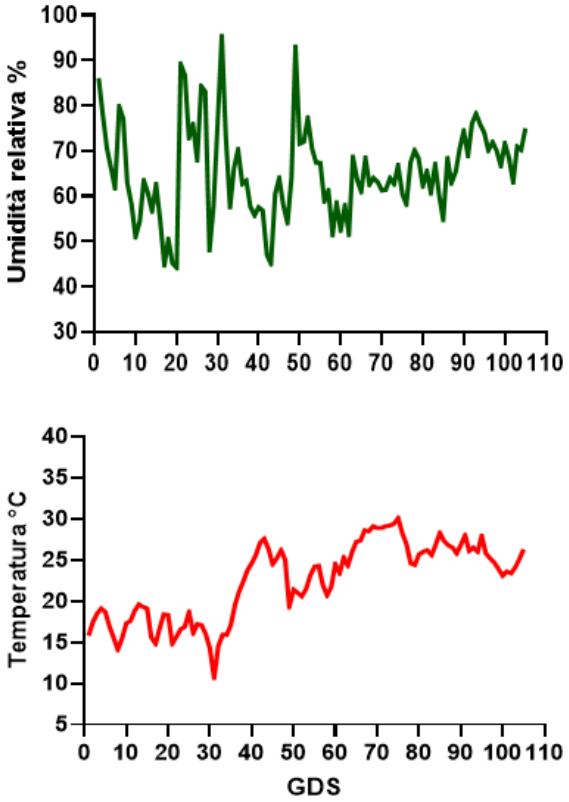


FIGURA 13: *Temperatura e umidità relativa registrate dalla centralina ARPA Lombardia di Landriano (PV) nel periodo compreso tra la semina e la raccolta (GDS: giorni dalla semina).*

4.1 Clorofilla nelle foglie

La clorofilla nelle foglie è stata misurata con lo SPAD (Soil Plant Analysis Development), lo strumento portatile più diffuso per misurare questo parametro. In particolare è stato usato uno strumento prodotto da Konica Minolta, modello SPAD-502 e SPAD-502Plus (Dong et al., 2019). È un dispositivo non troppo ingombrante, a batterie, leggero e che consente una misurazione conservativa della clorofilla. Infatti la clorofilla viene misurata grazie a una piccola pressione dello strumento sulla foglia che non viene danneggiata e può essere quindi oggetto di misurazioni successive durante lo sviluppo (Süß et al., 2015). Questa procedura consente di monitorare lo stato di salute e la crescita delle colture.

I valori di SPAD sono generalmente misurati sulla prima foglia distesa dall'alto a circa metà lunghezza della foglia. Vengono prese tre misurazioni per foglia e viene calcolata la media. Sono state misurate le prime 20 piante della fila, dove possibile, le stesse di cui è stata misurata l'altezza.

L'analisi dei dati ottenuti con lo SPAD, nel 2025 (**FIG. 14a**) nel sito di Romagnese, sottoposto a regime di minima lavorazione (*minimum tillage*), mostrano un incremento dell'indice SPAD a seguito del trattamento con *Trichoderma asperellum*. Il dato è statisticamente significativo ($p < 0.0001$). Il gruppo trattato (RT) presenta una mediana di 41,5, mentre il controllo non trattato (RNT) ha una mediana di 32,7, differenza statisticamente significativa ($p < 0.0001$).

Per quanto riguarda il sito di Landriano, sottoposto a regime di coltivazione convenzionale, i valori di SPAD non presentano differenze significative confrontando le piante trattate con le piante non trattate con *T. asperellum*. I valori di SPAD per il gruppo trattato e per il non trattato con *T. asperellum* mostrano infatti mediane simili (49,5–48,6 rispettivamente).

Le piante non trattate con *T. asperellum* nel sito di Landriano hanno valori SPAD più alti rispetto ai controlli di Romagnese. Questo può essere dato dall' "effetto soffitto" (Ceiling Effect), che è un limite massimo naturale oltre il quale la pianta non può più migliorare il suo valore SPAD, perché ha già raggiunto il suo massimo biologico (Lopes et al., 2020). Infatti a Romagnese, dove si ha un ambiente collinare/appenninico più sfidante, soggetto a situazioni di stress idrico, termico o nutrizionale, le piante hanno valori basali di contenuto di clorofilla più bassi, il trattamento con *T. asperellum* riesce a compensare parzialmente la situazione di stress, portando il valore di SPAD nelle piante trattate con *T. asperellum* quasi agli stessi livelli del sito di pianura (Padilla et al., 2018). Nel sito di Landriano, invece l'ambiente di pianura, con condizioni nutrizionali/pedoclimatiche favorevoli, consente alle piante di esprimere il loro massimo potenziale. Possiamo quindi ipotizzare che il trattamento con *T. asperellum* non produca chiari benefici aggiuntivi perché la pianta ha già raggiunto il massimo potenziale fisiologico.

Un altro fattore che può aver influenzato l'efficacia del trattamento è la differenza nelle condizioni di lavorazione del suolo. Infatti mentre a Romagnese si adotta la tecnica della minima lavorazione, a Landriano il terreno viene lavorato in modo convenzionale

Questa differenza di condizioni può aver reso le differenze tra trattato e controllo più evidenti nel sito di Romagnese.

Per quanto riguarda la stagione 2026 (**FIG. 14b**) a Romagnese le piante trattate con *T. asperellum* hanno valori di contenuto di clorofilla leggermente più alti rispetto al controllo non trattato (mediana 41,8 per RT contro 39,6 per RNT), tuttavia la differenza non è statisticamente significativa.

Per il campo di Landriano nel 2026 i valori di SPAD delle piante trattate con *T. asperellum* e del controllo sono inferiori rispetto alla stagione 2025 e non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i campioni trattati e non trattati.

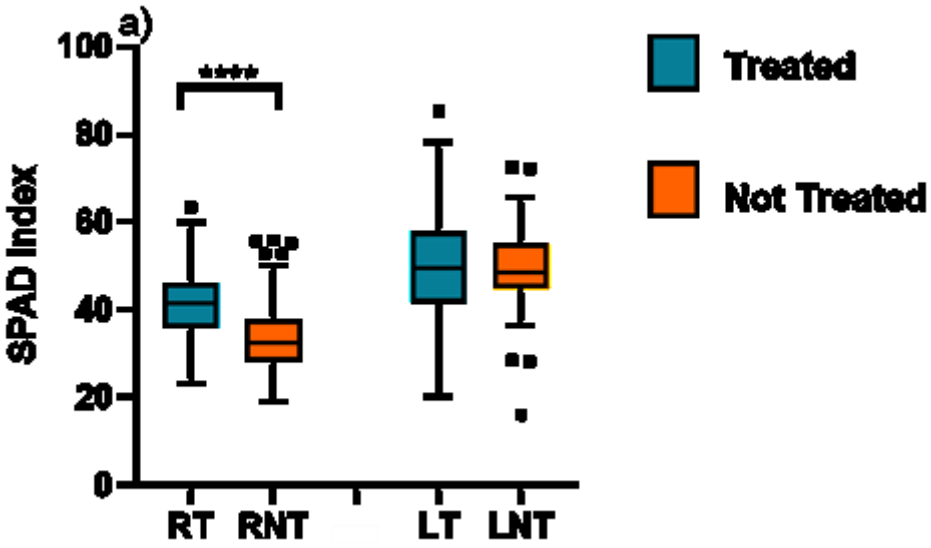


FIGURA 14a: *Analisi dei valori di SPAD nella stagione 2025 nei campi di Romagnese (R)di Landriano (L). Il colore azzurro identifica i dati relativi alle piante trattate (T) mentre il colore arancione identifica i dati relativi alle piante non trattate (NT) con Trichoderma asperellum. I boxplot mostrano la mediana, i quartili e l'intervallo dei dati (min-max). Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa (p < 0,0001.)*

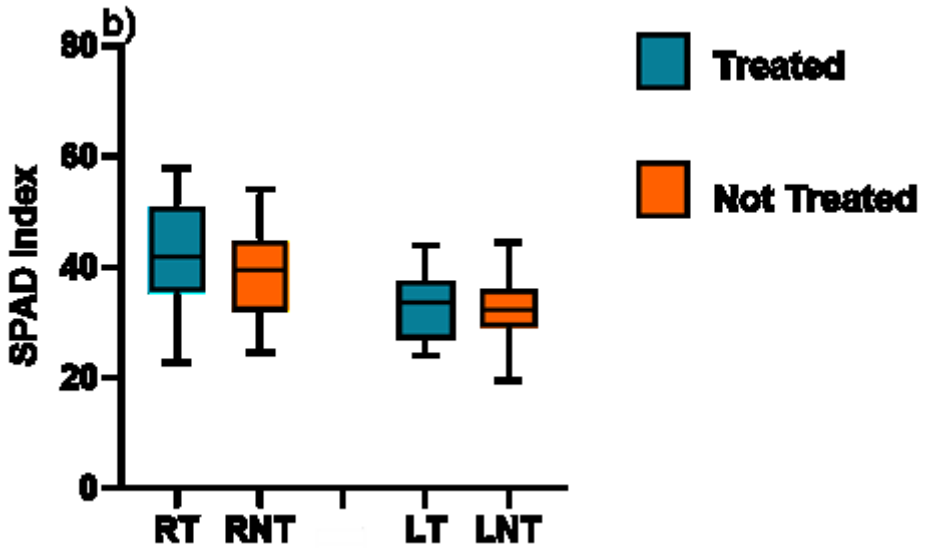


FIGURA 14b: *Analisi dei valori di SPAD della stagione 2026 nei campi di Romagnese (R) e di Landriano (L). Il colore azzurro indica i dati relativi alle piante trattate con Trichoderma asperellum (T), il colore arancione indica i dati relativi alle piante non trattate (NT). I boxplot mostrano la mediana, i quartili e l'intervallo dei dati (min-max).*

Per valutare la consistenza e la stabilità temporale dell'effetto del trattamento biostimolante sulla fisiologia delle piante di mais (Zea mays L.), i dati dell'indice SPAD rilevati al termine della stagione vegetativa 2026 sono stati posti a confronto con i risultati ottenuti nel corso del 2025 nelle stesse due località di prova (Romagnese e Landriano). L'analisi della varianza a due vie (Two-Way ANOVA) (Kitsche and Schaarschmidt, 2015) (**FIG. 15**) condotta sull'indice SPAD ha mostrato un'interazione significativa tra il fattore anno e il fattore trattamento, oltre a un effetto significativo di entrambe le variabili considerate singolarmente.

Per esaminare i confronti multipli è stato usato l'esame di Sidak (Sidak, 1967) che ha evidenziato dinamiche differenziate in base alla modalità di trattamento e alla stagione agronomica.

L'analisi della varianza ha evidenziato un'interazione significativa tra i fattori anno e trattamento ($p < 0.0001$), indicando che il contenuto di clorofilla non dipende solo dall'applicazione del biostimolante, ma è anche fortemente modulato dalle condizioni pedoclimatiche stagionali specifiche di ogni località.

Nel sito collinare/montano di Romagnese, la risposta al trattamento con *T. asperellum* ha evidenziato una differente significatività tra le due annate: infatti per la stagione 2025, il trattamento ha determinato un incremento significativo dell'indice SPAD nei replicati trattati rispetto al controllo ($p < 0.0001$). Per la stagione 2026, pur mantenendo il valore di SPAD un valore medio superiore nel trattato rispetto al controllo, il confronto non ha raggiunto la significatività statistica ($p = 0.3095$).

Questo risultato potrebbe essere legato a un elevato contenuto di clorofilla del controllo nella seconda annata che ha reso non significativo l'eventuale incremento dovuto al trattamento.

Nel sito di Romagnese si nota una stabilità interannuale, i campioni trattati hanno mostrato valori medi di SPAD pressoché identici nelle due stagioni 2025 e il 2026 (41.70 vs 42.05; $p > 0.9999$), pur partendo da valori diversi di SPAD nei campioni non trattati.

Nel sito di pianura di Landriano, invece, c'è una elevata dipendenza dal fattore ambientale, definibile come effetto annata sui valori di SPAD indipendentemente dal trattamento.

Nella stagione 2025 i due gruppi, trattato e non trattato, hanno registrato i valori di SPAD più elevati confrontando i due anni di studio, senza differenze significative tra i due gruppi ($p > 0.9999$). Le condizioni ambientali ottimali potrebbero aver garantito livelli fotosintetici elevati a prescindere dal biostimolante. Per quanto riguarda la stagione 2026, invece, si è verificata una riduzione significativa dei valori di SPAD registrati rispetto all'anno precedente ($p = 0.0014$ per LT; $p < 0.0001$ per LNT). Tuttavia, l'applicazione di *T. asperellum* ha generato un leggero incremento del valore di SPAD nelle condizioni di trattato (41.35 ± 4.87), rispetto al controllo (37.09 ± 5.36), sfiorando la soglia di significatività ($p = 0.0720$).

I risultati suggeriscono che *T. asperellum* possa attivare un meccanismo di fito-regolazione di risposta agli stress ambientali. A Romagnese la stabilità interannuale osservata suggerisce come l'inoculo

fungino aiuti la pianta a tamponare le variazioni microclimatiche stagionali, mantenendo stabile l'efficienza fotosintetica della pianta. In condizioni di maggiore stress nutrizionale o idrico, il trattamento con *T. asperellum* sembra prevenire la perdita di clorofilla (Andrzejak et al., 2022) come riportato in letteratura. Al contrario, quando il controllo esprime già un potenziale fisiologico elevato (non trattato 2026), il margine di miglioramento statistico legato all'input esterno si riduce.

A Landriano, l'assenza di differenze tra i valori di SPAD nel 2025 e il calo nel 2026 mostrano come il sito sia influenzato dall'andamento meteo-climatico. Tuttavia, il trend positivo, anche se non statisticamente significativo ($p = 0.0720$), osservato nel 2026 nella particella trattata suggerisce che, con una stagione meno favorevole, la biostimolazione riesca ad attenuare il degrado della clorofilla e a sostenere l'apparato fotosintetico.

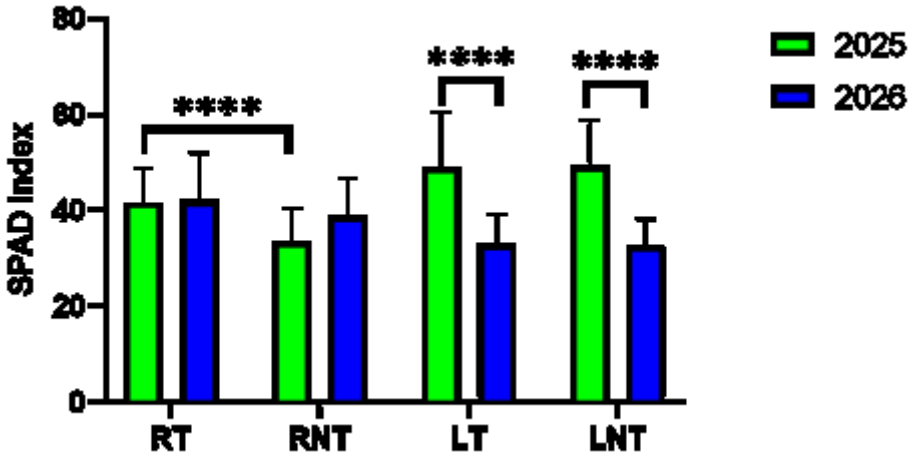


FIGURA 15: *Il grafico a barre mostra i valori dell'indice SPAD rilevati nei due siti di studio (Romagnese, R, e Landriano, L), mettendo a confronto i campioni trattati (T) e non trattati (NT) nelle annate 2025 (verde) e 2026 (blu).*

4.2 Altezza pianta

Il parametro altezza della pianta viene studiato per verificare se l'inoculo con il *Trichoderma asperellum* può favorire un maggior vigore vegetativo (Dutta et al., 2024). In letteratura è riportata la capacità di *T. asperellum* di produrre auxine, fitormoni in grado di promuovere la distensione cellulare e la divisione cellulare (Intana et al., 2024). Inoltre *T. asperellum* colonizzando la rizosfera stimola la crescita delle radici, risultando in una maggiore estensione dell'apparato radicale, un maggiore assorbimento dei nutrienti e quindi in un maggior vigore della pianta (Bharti et al., 2024).

In **FIG. 16a** è mostrata l'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) sull'effetto del trattamento con *T. asperellum* nella stagione 2025 nei siti di Landriano e Romagnese. L'analisi ha mostrato un effetto complessivo significativo dei trattamenti sull'altezza delle piante ($p< 0.0001$).

Dai confronti multipli post-hoc con test di Sidak, emerge che nel sito di Romagnese, le piante trattate (RT) presentano un'altezza statisticamente maggiore rispetto al controllo non trattato (RNT) ($p < 0.0001$). Al contrario, nel sito di Landriano non osserviamo scostamenti significativi tra il gruppo trattato (LT) e il controllo (LNT).

La **FIG. 16b** mostra i valori dell'annata 2026, l'ANOVA si conferma significativa ($p = 0.0091$) ma in entrambi i siti (Landriano e Romagnese), le piante trattate (LT e RT) non differiscono in modo significativo dalle non trattate (LNT e RNT). Da questo si può supporre che ci sia un effetto sito, dove la significatività del modello è da attribuire al divario di accrescimento tra il sito di Romagnese e quello di Landriano.

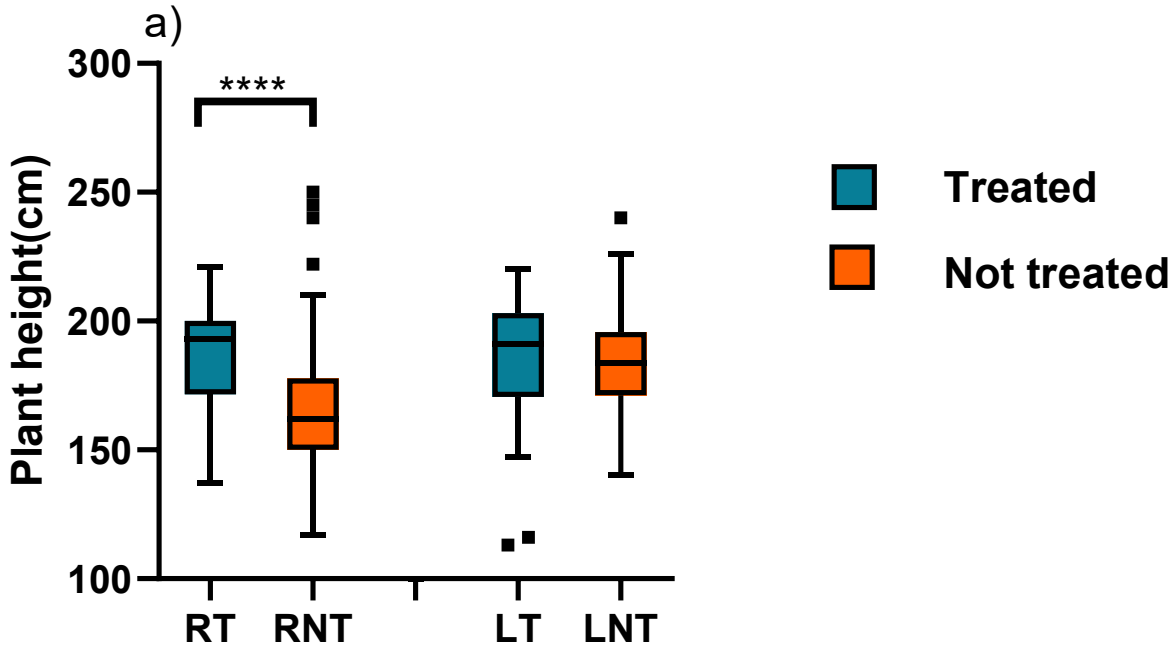


FIGURA 16a: *Grafico a boxplot dell'altezza delle piante (cm) per i quattro gruppi sperimentali Romagnese trattato (RT) e non trattato (RNT), Landriano trattato (LT) e non trattato (LNT), stagione 2025. Le barre indicano la mediana e il range interquartile; le linee verticali ed i punti isolati mostrano la dispersione e i valori anomali. Gli asterischi indicano le differenze significative ($p < 0,0001$).*

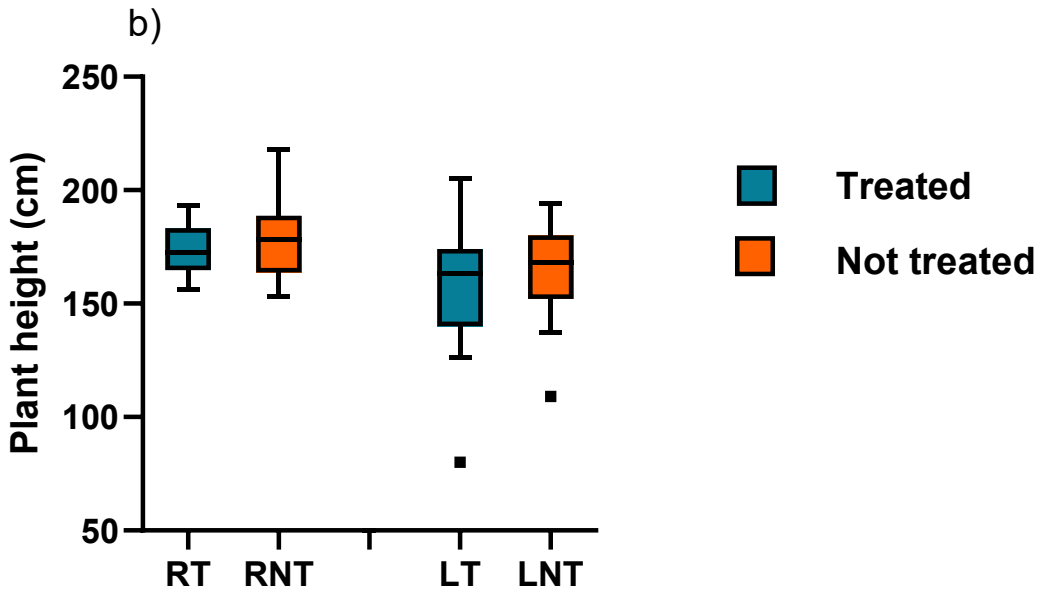


FIGURA 16b: *Grafico a boxplot dell'altezza delle piante (cm), suddiviso per le medesime tesi sperimentali, Romagnese trattato (RT) e non trattato (RNT), Landriano trattato (LT) e non trattato (LNT), solo per l'anno 2026. I punti al di fuori dei baffi identificano i singoli valori anomali.*

Dall'analisi della varianza a due vie (**FIG. 17)**, si ipotizza che l'effetto dell'interazione dell'anno con il trattamento costituisce la maggiore fonte di variazione spiegata dal modello, risultando altamente significativa ($P < 0.0001$).

Particolarmente rilevante è l'effetto del fattore anno ($p < 0.0001$), che indica come l'impatto delle differenti condizioni meteo-climatiche tra le due annate agrarie ha influenzato lo sviluppo vegetativo e ha causato delle differenze nei risultati. Per il fattore trattamento, invece, non è raggiunta una significatività statistica.

Dall'analisi dei confronti multipli (test di Sidak) relativi all'efficacia del trattamento nel 2025, si nota che a Romagnese (RT vs RNT) l'inoculo con il *T. asperellum* ha portato a un incremento d'altezza statisticamente significativo rispetto al relativo controllo ($P < 0.0001$), mentre per il campo di Landriano il trattamento con *T. asperellum* non ha prodotto differenze statisticamente rilevanti rispetto al controllo.

Esaminando l'efficacia del trattamento nel 2026, nessun confronto intra-annuale è risultato significativo.

Si osserva una contrazione generalizzata dell'altezza nel 2026. Tale flessione è significativa sia per il trattato di Landriano (LT) sia per il relativo controllo (LNT). Al contrario, il trattato a Romagnese (RT) non ha subito riduzioni inter-annuali statisticamente rilevanti, rispetto al controllo (RNT).

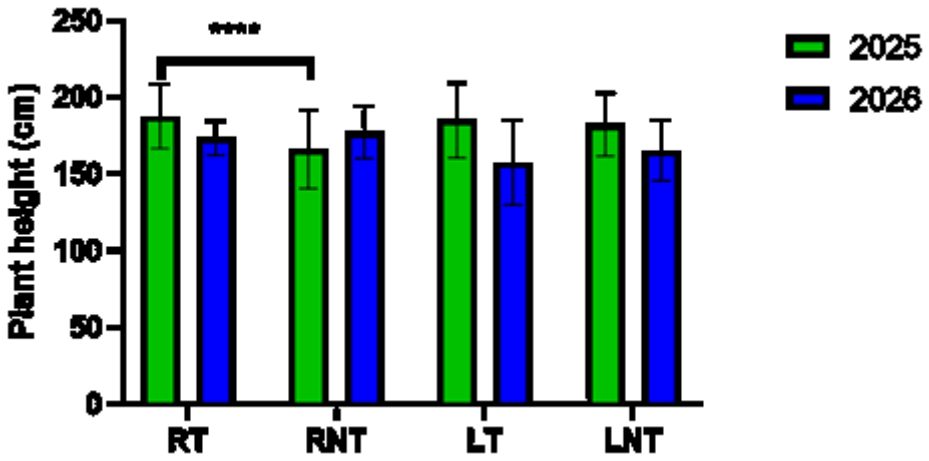


FIGURA 17: *Confronto dell'altezza media delle piante tra gli anni 2025 e 2026 nelle diverse condizioni sperimentali. Il grafico a barre riporta l'altezza vegetativa (cm) per i quattro trattamenti sperimentali, Romagnese trattato (RT), Romagnese non trattato (RNT), Landriano trattato (LT) e Landriano non trattato (LNT). Le barre mostrano l'errore standard. Gli asterischi indicano le differenze significative ($p < 0,0001$).*

4.3 Analisi del peso di mille semi (TSW)

Il Peso dei mille semi, rappresenta la massa espressa in grammi di 1000 cariossidi (Mirić et al., 2007). Questo parametro descrive la dimensione, la pienezza e il grado di riempimento della granella. Questa è una fase critica che avviene durante gli stadi di maturazione e definisce un parametro essenziale anche per il calcolo della dose di semina in campo, infatti indica l'efficienza con cui la pianta accumula sostanza secca nei semi (Baillot et al., 2018).

L'analisi del peso dei mille semi (TSW) nell'annata del 2025 ha mostrato dei comportamenti differenti in base alla località considerata (**FIG. 18a**).

A Romagnese, si nota una ottima omogeneità dei dati unita ad un incremento del peso nei campioni trattati (RT): dove la media si attesta a circa 312,5 g per i replicati che sono stati trattati (RT), contro i 300,1 g rilevati nei controlli non trattati (RNT), differenza tuttavia non statisticamente significativa.

Nel sito di Landriano, invece, sia le piante trattate (LT) che quelle non trattate (LNT) mostrano un'elevata variabilità interna (con valori che vanno da 268 g a 345 g circa) e mediane simili tra di loro (rispettivamente 309,4 g per LT e 301,5 g per LNT).

Nel 2026 a Romagnese si è riproposta la stessa situazione del 2025 (**FIG. 18b**). I risultati hanno mostrato un valore medio di TSW delle piante trattate superiore rispetto al controllo non trattato ma la differenza non è statisticamente significativa.

Nel campo di Landriano, le avversità metereologiche unite ai danni causati dalle nutrie (*Myocastor coypus*), che si nutrono di mais, hanno compromesso la coltura portando a una produzione scarsa rendendo impossibile le analisi di resa e TSW (**FIG. 21**).

Per valutare la stabilità dell'efficacia del trattamento nel tempo e l'influenza delle condizioni meteorologiche inter-annuali, i dati del peso dei mille semi (**FIG. 19**) del sito di Romagnese relativi alle stagioni 2025 e 2026 sono stati sottoposti ad analisi Two-way ANOVA. L'analisi ha evidenziato un effetto del trattamento significativo (p = 0,0017), il quale spiega la quota principale della variabilità totale.

Indipendentemente dall'annata agronomica, le piante trattate ha registrato un incremento medio complessivo a favore del trattato.

È risultato significativo l'effetto principale dell'anno (p = 0,0362), responsabile della varianza. Nel complesso, la stagione 2026 ha mostrato pesi unitari delle cariossidi superiori rispetto al 2025, con una media generale stimata di 317,0 nel 2026 contro 306,3 nel 2025. L'interazione tra anno e trattamento non ha raggiunto la significatività statistica confermando come l'effetto positivo dell'applicazione di *Trichoderma asperellum* sul peso del seme si sia mantenuto coerente ed omogeneo nei due anni d'indagine. Il test per i confronti multipli di Šídák condotto all'interno dei singoli trattamenti ha rivelato che per il trattamento l'aumento del TSW tra il 2025 e il 2026 è risultato statisticamente significativo (p = 0,0477). Diversamente, per la tesi non trattata RNT, la variazione tra le due annate non ha evidenziato differenze.

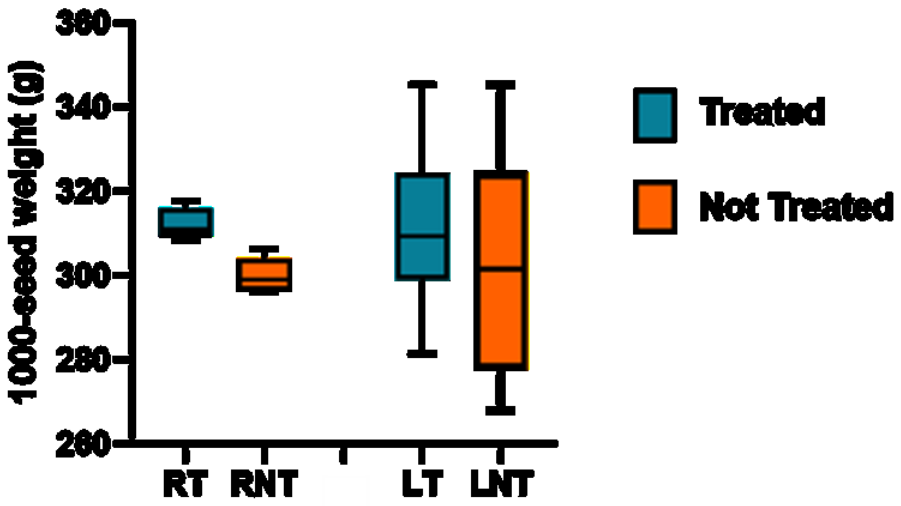


FIGURA 18a: *Peso dei mille semi (g) misurato nei due siti sperimentali (Romagnese e Landriano) per le tesi trattate (Trattato - blu) e non trattate (Non Trattato- arancione). I boxplot mostrano la mediana, i quartili e l'intervallo dei dati (min-max), anno 2025.*

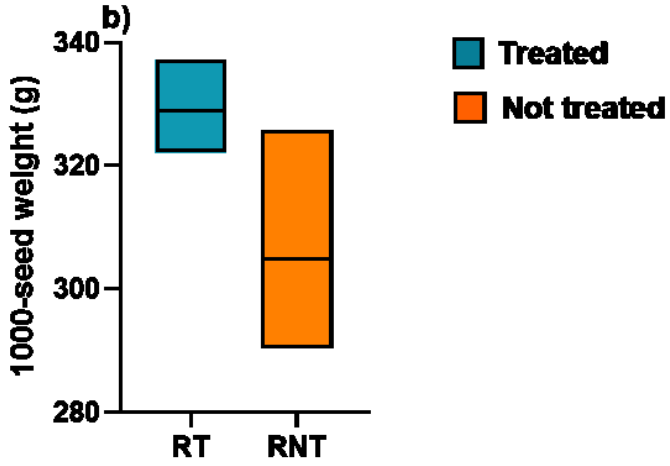


FIGURA 18b: *Peso dei mille semi (TSW) registrato nel sito sperimentale di Romagnese durante la stagione agronomica 2026. I grafici a box rappresentano i valori minimi e massimi con la linea mediana interna per la il gruppo delle piante trattate (RT) e quello delle piante non trattate (RNT) (n = 3). L'analisi statistica condotta mediante t-test di Student a campioni indipendenti non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i due gruppi.*

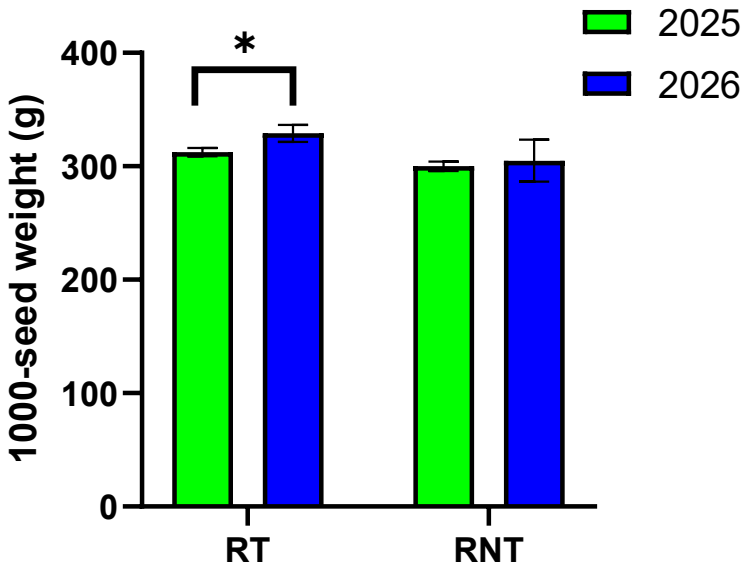


FIGURA 19: *Confronto del peso dei mille semi (TSW) nel sito sperimentale di Romagnese tra le stagioni agronomiche 2025 e 2026. I valori rappresentano le medie calcolate. L'analisi Two-way ANOVA ha mostrato un effetto significativo del trattamento (p = 0,0017) e dell'anno (p = 0,0362), in assenza di un'interazione significativa Anno\Trattamento (p = 0,2214). L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa tra le annate all'interno dello stesso trattamento secondo il test post-hoc di Šídák (p < 0,05).*

4.4 Peso dei semi per spiga

Per peso della spiga intera si intende la struttura completa (rachide, glume e cariossidi) ed è un parametro morfologico utile per stimare le biomasse e la produttività (Eltaher et al., 2022). Invece il peso della granella per spiga (Grain Weight per Spike) rappresenta la massa delle sole cariossidi dopo la sgranatura ed è la vera e propria componente di resa (Desheva 2016).

Il legame tra il peso dei mille semi e il peso della granella per spiga è diretto e spiega come a parità di numero di cariossidi formate, un peso dei mille semi maggiore causa una spiga più pesante e quindi una resa maggiore (Mangini et al., 2018).

Il peso della granella per spiga mostra una correlazione genetica e fenotipica positiva con il peso dei mille semi risultando uno dei fattori a più alto effetto diretto sulla produttività finale della pianta (Zecevic et al., 2004).

Dall'analisi della varianza sul peso dei semi per spiga, relativa all'annata del 2025, emerge un effetto principale significativo del sito di prova ($p<0.05$) indipendentemente dal trattamento applicato (**FIG. 20a**). Le analisi evidenziano come la resa della singola spiga a maturità fisiologica (Guo et al., 2018), sia stata guidata dalle condizioni pedoclimatiche di Landriano e Romagnese, piuttosto che dall'inoculo con *Trichoderma asperellum*. In particolare, i campioni provenienti da Romagnese hanno registrato valori medi superiori rispetto a quelli del sito di Landriano. Al contrario, non sono emerse differenze statisticamente significative in risposta al trattamento né all'interno delle singole località né come interazione tra i fattori.

Come per il TSW, nel 2026 la determinazione del peso dei semi per spiga è stata effettuata solo al campo di Romagnese (**FIG. 20b**). Come l'anno scorso non sono state rilevate differenze significative ($p = 0,7189$).

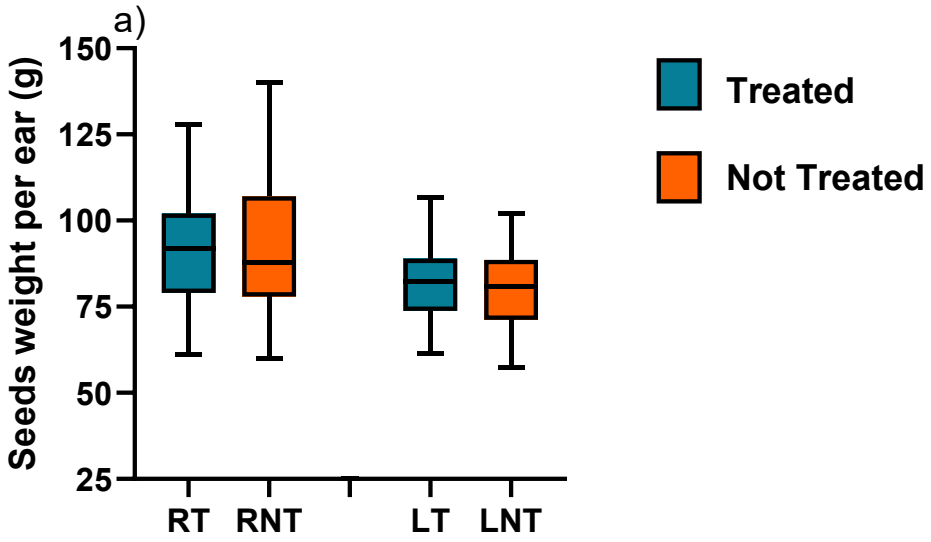


FIGURA 20a: *Peso dei semi per spiga nei siti di Romagnese (RT, n = 15; RNT, n = 15) e Landriano (LT, n = 36; LNT, n = 39). I boxplot mostrano la mediana, i quartili e i valori minimo e massimo.*

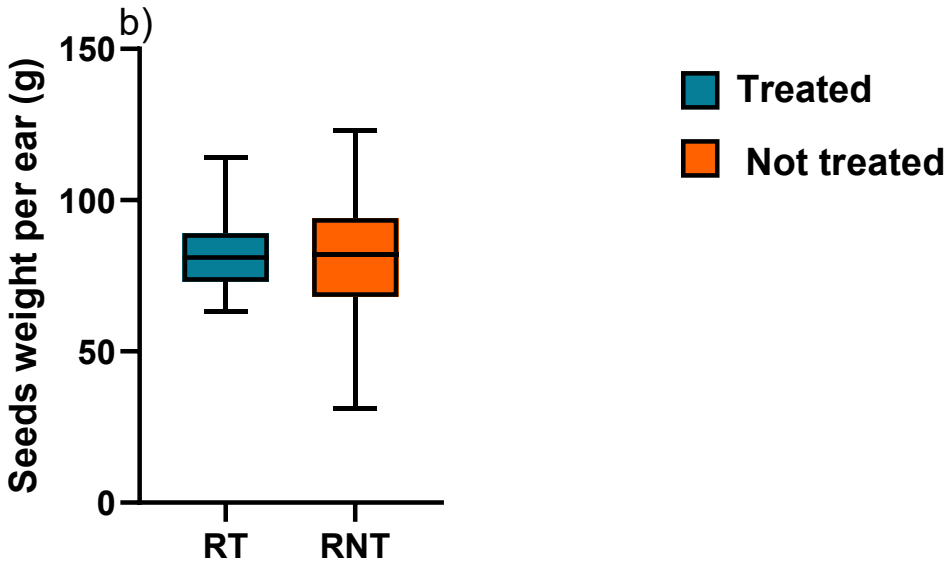


FIGURA 20b: *Peso dei semi per spiga nel sito di Romagnese. Le barre rappresentano l'errore standard. La differenza tra i due gruppi (RT e RNT) non è risultata statisticamente significativa (p = 0,72).*

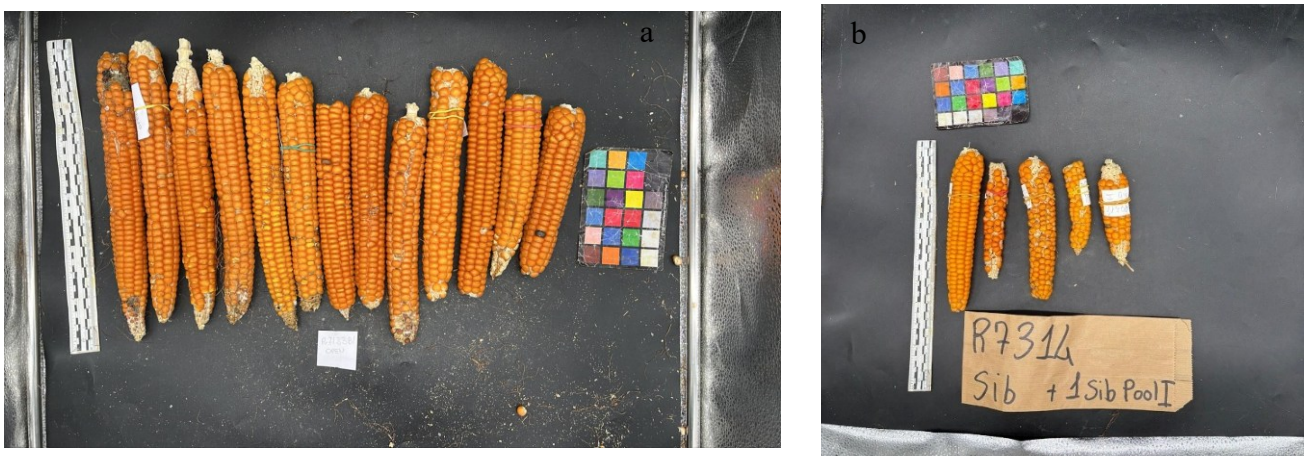


FIGURA 21: *Spighe della varietà Ottofile del Pavese coltivate nel campo di Landriano nella stagione 2026 (b), confrontate a quelle della stagione 2025 (a). La fotografia (b) mostra una produzione scarsa e un ridotto numero di spighe, dovuto alle avversità meteorologiche e ai danni causati dalle nutrie (Myocastor coypus. La scarsità di semi ha reso impossibile l'effettuazione delle analisi di resa.*

Per valutare la stabilità produttiva e l'efficacia del trattamento nel tempo, i dati del peso dei semi per spiga rilevati nel sito di Romagnese durante le stagioni 2025 e 2026 sono stati sottoposti ad analisi della varianza a due vie (Two-way ANOVA) (**FIG. 22**). Questa analisi ha dimostrato che c'è un effetto significativo legato al fattore Annata ($p = 0,0290$).

La resa media stimata è superiore nel 2025 (93,43g) rispetto al 2026 (81,91g), indipendentemente dal trattamento applicato.

Non è emerso alcun effetto significativo dato dal trattamento con *T. asperellum* in quanto i dati relativi al gruppo (RT) trattato e al gruppo non trattato (RNT) sono pressoché sovrapponibili.

Anche l'interazione tra l'annata e il trattamento è risultata non significativa dimostrando che l'effetto del trattamento si è mantenuto coerente in entrambe le annate di prova. Il test di confronto multiplo post-hoc di Šídák condotto intra-trattamento non ha mostrato differenze statisticamente rilevanti tra il 2025 e il 2026, sia per quanti riguarda i trattati 2025-2026 sia per quanto riguarda i non trattati 025-2026.

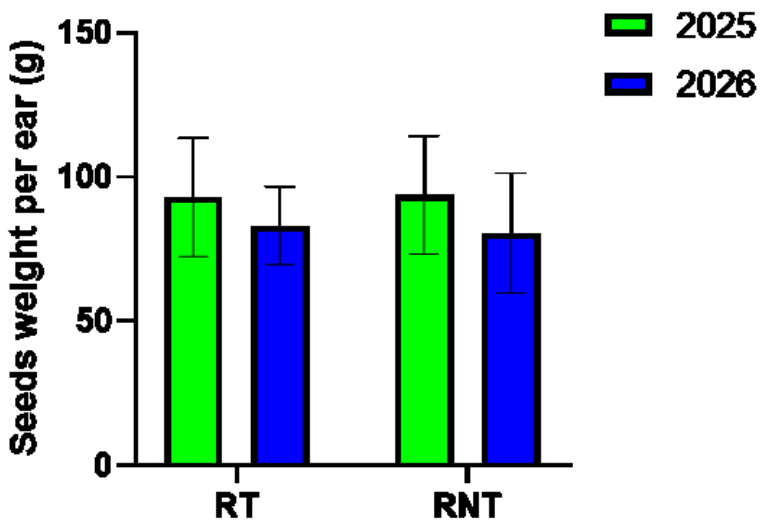


FIGURA 22: *Peso dei semi per spiga (g) registrato nel sito sperimentale di Romagnese nei due anni di prova (2025 vs 2026). Le barre rappresentano la deviazione standard. L'analisi della varianza a due vie (Two-way ANOVA) e il successivo post-hoc test di Šídák non hanno evidenziato interazioni significative né differenze statisticamente rilevanti tra le tesi (RT e RNT) o tra le due annate per i singoli trattamenti (P > 0,05).*

4.5 Percentuale delle piante infettate

Un altro parametro che è stato esaminato è la percentuale delle piante infette, nel sito sperimentale di Romagnese per l'annata agraria del 2025.

È stato preso in considerazione questo fattore perché uno dei principali ruoli svolti da *Trichoderma asperellum*, oltre quello di biostimolante, è la competizione con fitopatogeni, garantendo alle piante un'ulteriore protezione contro eventuali antagonisti.

Nel sito di Romagnese si è testata questa possibile funzione di *T. asperellum*, andando a valutare l'eventuale presenza di infezioni da *Ustilago maydis* e da *Fusarium verticillioides* sulle piante in campo. Il *F. verticillioides* è un fitopatogeno fungino ed è l'agente della fusariosi della spiga. Questo patogeno fa parte del Phylum degli *Ascomycota*. Il micelio è settato, e si riproduce in forma asessuata per mezzo di conidi, prodotti da conidiofori posti alle estremità delle ife fungine (Yu et al., 2021).

La riproduzione di questo fungo è favorita in un range termico tra 4 e 37 °C, con un optimum di 25 °C, e con umidità relativa superiore all'87% (Liu et al., 2022). Quindi lo sviluppo del fungo è favorito nelle campagne della Pianura Padana, dove queste condizioni si hanno prevalentemente per tutto l'anno (Venturini et al., 2011).

Il secondo patogeno considerato, *U. maydis*, è l'agente causale del carbone del mais ed è affermato come organismo modello per i basidiomiceti fitopatogeni e per lo studio dei modelli di interazioni biotrofiche che si mantengono attive durante lo sviluppo fungino all'interno della pianta ospite. Questo patogeno si riproduce tramite sporidi che quando raggiungono la superficie della pianta

formano un'ifa tramite la quale entrano nella pianta di mais. Una volta all'interno il fungo determina, in meno di una settimana, sintomi di malattia evidenti (tumori) sulle parti aeree del mais, questa posizione favorevole può permettergli, tramite condizioni climatiche avverse, di espandersi (Djamei and Kahmann, 2012). *U. maydis*, pur non essendo economicamente minaccioso, costituisce un problema perché può determinare il deprezzamento del raccolto (Brefort et al., 2009).

Per quanto riguarda il sito sperimentale di Romagnese dell'anno 2025, l'analisi fitopatologica ha evidenziato una riduzione dell'incidenza infettiva nelle piante che sono state sottoposte a trattamento rispetto al controllo non trattato, sia per l'agente patogeno *Fusarium verticillioides* sia per *Ustilago maydis* (**FIG. 23).**

Per quanto riguarda il *Fusarium verticillioides* l'analisi dei campioni ha mostrato che le piante trattate hanno registrato un'incidenza d'infezione circa del 2,14%, contro un'incidenza del 4,17% riscontrata nel controllo non trattato. La stima dell'effetto mostra un rischio relativo pari a 0,5143 e un Odds Ratio pari a 0,5036, indicando che il trattamento può dimezzare circa il rischio di infezione da *Fusarium*.

Per *Ustilago maydis* si ha un trend analogo su un totale di 380 piante analizzate. Nei campioni trattati l'incidenza di infezione si attesta allo 0,71%, a fronte dell'1,67% rilevato nel non trattato. L'Odds Ratio calcolato è pari a 0,4245 confermando la riduzione della frequenza d'infezione nelle tesi trattate. Tali evidenze suggeriscono un'efficacia protettiva del trattamento nel contenere la diffusione dei patogeni fungini presi in esame nel contesto ambientale di Romagnese.

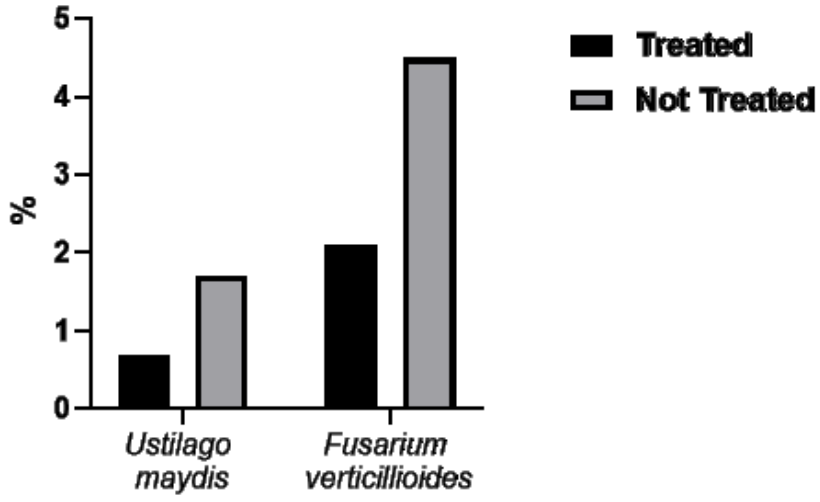


FIGURA 23: *Incidenza dell'infezione (%) da Ustilago maydis e Fusarium verticillioides nei campioni di mais trattati (Treated) e non trattati (Not Treated) presso il sito sperimentale di Romagnese. Gli istogrammi rappresentano la percentuale di piante infette riscontrate per ciascun patogeno fungino. Per entrambi i patogeni testati si ha una evidente riduzione delle percentuali di infezione nelle piante trattate con Trichoderma asperellum (T) rispetto al loro controllo non trattato (NT).*

4.7 Analisi genetica tramite marcatori SSR

4.7.1 Controllo dell'efficienza dei marcatori SSR scelti

Gli ampliconi ottenuti dall'amplificazione dei campioni di DNA dell'ibrido commerciale (SY Lavaredo) e della varietà Ottofile del Pavese con i marcatori bnlg1429, ZAG105, nc009 sono stati sottoposti ad analisi mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3% come si può osservare nelle **FIG. 24a e 24b**.

La dimensione dei prodotti di amplificazione, evidenziata grazie all'analisi elettroforetica in presenza del marcatore di peso molecolare 100 bp, ha confermato la specificità e informatività dei marcatori SSR utilizzati che hanno prodotto bande corrispondenti alle dimensioni attese e polimorfiche nella varietà Ottofile del Pavese.

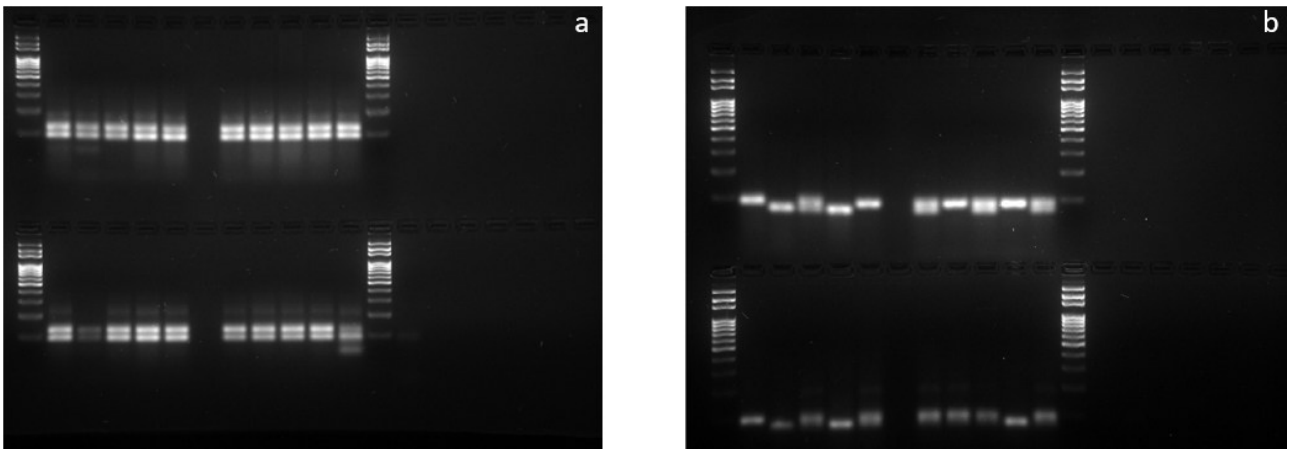


FIGURA 24: *Analisi elettroforetica su gel di agarosio al 3% degli ampliconi SSR (fila superiore marcatore ZAG105, fila inferiore marcatore nc009) ottenuti dai campioni di DNA di mais ibrido (SY Lavaredo) (a) e della varietà tradizionale Ottofile del Pavese (b). Nel primo e nell'ultimo pozzetto di ogni fila di campioni è presente il marcatore di peso molecolare da 100 bp.*

4.7.2 Analisi genetica sulle 4 varietà: Ottofile del Pavese, Ottofile tortonese, Ottofile di Codera, Ottofile del Garda (effettuata da BMR)

L'analisi PCoA eseguita sui dati ottenuti utilizzando gli 8 marcatori molecolari SSR scelti su sulle 4 varietà Ottofile del Pavese, Ottofile tortonese, Ottofile di Codera, Ottofile del Garda, (**FIG. 25**), ha evidenziato una differenziazione genetica tra queste 4 varietà coltivate in Lombardia e quindi una identità univoca e distinta della varietà Ottofile del Pavese. Pertanto, quando si fa riferimento all'Ottofile Pavese, si identifica uno specifico profilo genetico distinguibile rispetto agli altri materiali Ottofile analizzati.

Inoltre l'analisi PCoA ha evidenziato come le varietà storiche utilizzate come controllo (mais delle Fiorine, Rostrato Rosso di Rovetta, Spinato di Gandino) pur mantenendo ciascuna un'identità chiaramente distinta dalle altre, costituiscono un gruppo a parte rispetto al gruppo delle 4 varietà Ottofile.

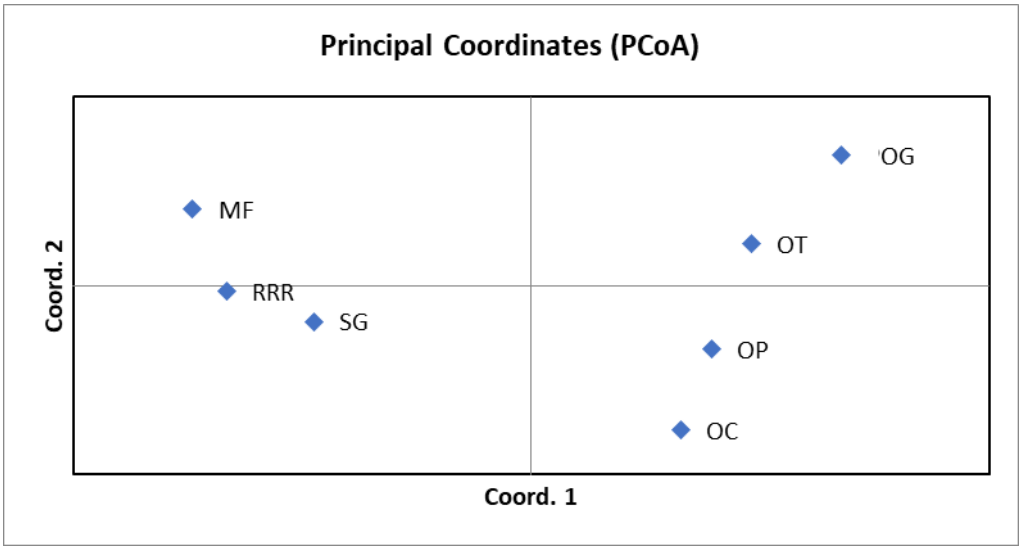


FIGURA 25: *Analisi delle coordinate principali (PCoA) delle 4 varietà Ottofile coltivate in Lombardia (Ottofile pavese, Ottofile tortonese, Ottofile del Garda e Ottofile di Codera) e dei 3 genotipi "storici" di riferimento (mais delle Fiorine, Rostrato Rosso di Rovetta, Spinato di Gandino), basata su otto marcatori SSR. La percentuale di variazione spiegata dai primi due assi è rispettivamente del 33,71% e del 22,08%.*

5 DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo lavoro è stato valutare l'efficacia del trattamento di biopriming con *Trichoderma asperellum* (fungo biostimolante e agente di biocontrollo) su una varietà tradizionale di mais, l'Ottofile del Pavese. Le attività di sperimentazione, condotte nel biennio 2025–2026, hanno messo a confronto due agroecosistemi con differenze altimetriche, gestionali e di terreno: il sito di pianura a Landriano (PV), (88 m s.l.m., terreno irriguo gestito con pratiche di agricoltura convenzionale) e il sito collinare/appenninico a Romagnese (PV), (850 m s.l.m., gestione in *minimum tillage*, assenza di irrigazione).

Dai dati raccolti emerge come l'efficacia del trattamento sia molto condizionata dalle condizioni pedoclimatiche del sito e dai livelli di stress della pianta. Nel campo a Romagnese, sito in una zona pedoclimatica più stressante per il mais, il trattamento ha mostrato un significativo impatto fisiologico e biometrico.

Nella stagione 2025, l'indice SPAD (stato nutrizionale e contenuto di clorofilla) e l'altezza delle piante hanno registrato un incremento significativo ($p < 0.0001$) nei campioni trattati rispetto al controllo. Questo risultato può essere giustificato dall'effetto del trattamento nel miglioramento dell'esplorazione radicale e dell'assorbimento di azoto. Inoltre, si è osservata una maggiore stabilità tra gli anni dell'indice SPAD tra il 2025 e il 2026 nei campioni trattati a Romagnese rispetto a quelli in pianura, evidenziando quindi una capacità di mitigazione nei confronti delle fluttuazioni microclimatiche.

Possiamo ipotizzare che nel sito di pianura, in condizioni ottimali di allevamento, il campione di controllo (non trattato) esprimeva già il massimo potenziale biologico. Quindi nella stagione 2025 si è ottenuto un "effetto soffitto", per cui l'inoculo non ha determinato differenze significative nei parametri di accrescimento. Però, nella stagione 2026, caratterizzata da condizioni climatiche avverse l'applicazione di *T. asperellum* nel campo di Landriano ha mostrato una tendenza positiva a mitigare il degrado clorofilliano rispetto al controllo sofferente per stress termico, pur senza raggiungere la piena significatività statistica ($p = 0.0720$).

Per quanto riguarda invece l'attività di antagonismo ai fitopatogeni *T. asperellum* ha confermato la sua capacità di azione antagonistico-preventiva. Nel sito di Romagnese, la frequenza di piante colpite da *Fusarium verticillioides* e *Ustilago maydis* è stata ridotta della metà rispetto al controllo non inoculato. L'azione di nicchia e di micoparassitismo alla rizosfera impedisce la colonizzazione sistemica del patogeno e limita il rischio di accumulo di micotossine (fumonisine) nella granella, fattore cruciale per le filiere sia agroalimentari che zootecniche.

I parametri produttivi sono stati influenzati dalla variabilità microclimatica e geografica (differenza pianura-collina) più che dall'applicazione del biostimolante. La risposta della resa risente fortemente

della finestra temporale e sinergica di fioritura e riempimento della cariosside, fasi in cui lo stress termico del 2026 ha parzialmente mascherato i benefici cumulativi dell'inoculo radicale.

6 CONCLUSIONE

I risultati preliminari dello studio condotto nel biennio 2025–2026 dimostrano che l'uso di *Trichoderma asperellum* come agente di biopriming è efficace sulla varietà tradizionale di mais Ottofile Pavese e può essere considerata come strategia di valorizzazione di un patrimonio tradizionale locale.

L'inoculo con *T. asperellum* esprime il suo massimo valore applicativo in ambienti di coltivazione caratterizzati da stress, non irrigati, a basso input nutrizionale e gestiti con pratiche di agricoltura conservativa (minimum tillage). In tali contesti, il microrganismo agisce, come ipotizzato, da catalizzatore fisiologico, aumentando lo sviluppo vegetativo, la stabilità dell'efficienza fotosintetica e la tolleranza agli stress abiotici.

Durante questo studio è stato osservato che *T. asperellum* ha agito come agente di biocontrollo in grado di ridurre l'incidenza di patogeni fungini come *Fusarium spp*. e *Ustilago maydis*, confermando essere una possibile alternativa ecologica ai trattamenti sintetici di concia e tutelando la qualità sanitaria dei prodotti.

In conclusione, *T. asperellum* può essere considerato come uno strumento biotecnologico chiave per coniugare la tutela dell'agrobiodiversità locale con gli obiettivi di sostenibilità ed ecocompatibilità previsti dall'Agenda 2030 (SDG 2, 12, 13 e 15).

7 BIBLIOGRAFIA

Abirami, S., Gayathri, S. S., & Usha, C. (2022). Trichoderma as biostimulant-a plausible approach to alleviate abiotic stress for intensive production practices. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering (pp. 57-84). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85577-8.00004-4

Andrzejak R, Janowska B. Trichoderma spp. Improves Flowering, Quality, and Nutritional Status of Ornamental Plants. Int J Mol Sci. 2022 Dec 10;23(24):15662. doi: 10.3390/ijms232415662. PMID: 36555304; PMCID: PMC9779132

Accinelli, C., Abbas, H., Little, N., Kotowicz, J., Mencarelli, M., & Shier, W. (2016). A liquid bioplastic formulation for film coating of agronomic seeds. Crop Protection, 89, 123-128. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.010

Acosta-Bayona, J., León-Martínez, G., & Vielle-Calzada, J. P. (2024). Origin and diversification of maize: Two teosintes but different contributions. *Molecular Plant*, *17*(2), 233-235. https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.12.024

Anoop Sindhu, Tiffany Langewisch, Anna Olek, Dilbag S. Multani, Maureen C. McCann, Wilfred Vermerris, Nicholas C. Carpita, Gurmukh Johal, Maize Brittle stalk2 Encodes a COBRA-Like Protein Expressed in Early Organ Development But Required for Tissue Flexibility at Maturity, Plant Physiology, Volume 145, Issue 4, December 2007, Pages 1444–1459, https://doi.org/10.1104/pp.107.102582

Aravind, J., Vimala Devi, S., Radhamani, J., Jacob, S. R., and Kalyani Srinivasan (2026). Germinationmetrics: Seed Germination Indices and Curve Fitting. R package version 0.1.10, https://github.com/aravind-j/ https://cran.r-project.org/package=germinationmetrics.

Arca del gusto: https://www.fondazioneslowfood.com/it/arca-del-gusto-slow-food/mais-ottofile-del-pavese/

Ardenghi NMG, Rossi G, Guzzon F. 2018. Back to beaked: *Zea mays* subsp. mays Rostrata Group in northern Italy, refugia and revival of open-pollinated maize *landraces* in an intensive cropping system. PeerJ 6:e5123 https://doi.org/10.7717/peerj.5123

Azmach, G., Worku, M., & Kalsa, K. K. Variety Maintenance and Breeder Seed Production in Highly Cross-Pollinated Cereals: The case of Maize (Technical Guideline).

Babalola, K. O., Monacelli, N., Gozzi, M., Ceccarelli, S., Folloni, S., & Galaverna, G. (2025). Genetic diversity and climate change adaptation in wheat: a systematic review of *landraces*, composite cross

populations, and evolutionary populations. Frontiers in Sustainable Food Systems. https://doi.org/10.3389/fsufs.2025.1504922

Baillot, N., Girousse, C., Allard, V., Piquet-Pissaloux, A., & Le Gouis, J. (2018). Different grain-filling rates explain grain-weight differences along the wheat ear. PLoS One, 13(12), e0209597. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209597

Bender, R. R., Haegele, J. W., Ruffo, M. L., & Below, F. E. (2013). Nutrient uptake, partitioning, and remobilization in modern, transgenic insect-protected maize hybrids. Agronomy journal, 105(1), 161-170. https://doi.org/10.2134/agronj2012.0352

Berg A, Sheffield J (2018) Climate change and drought: the soil moisture perspective. Curr. Climate Change Rep. 4: 180-191. https://doi.org/10.1007/s40641-018-0095-0

Bharti, L., Yadav, K., & Kumar Chaubey, A. (2024). Trichoderma spp.: Approach for Bio-Control Agent. In Challenges in Plant Disease Detection and Recent Advancements. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.1003697

Bitocchi E, Bellucci E, Rau D, Albertini E, Rodriguez M, Veronesi F, et al. (2015) European Flint Landraces Grown In Situ Reveal Adaptive Introgression from Modern Maize. PLoS ONE 10(4): e0121381. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121381

Bizikova, L., Jungcurt, S., McDougal, K., & Tyler, S. (2020). How can agricultural interventions enhance contribution to food security and SDG 2.1?. Global Food Security, 26, 100450. https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100450

BMR genomics: https://www.bmr-genomics.it/

Brandolini, A., & Brandolini, A. (2009). MAIZE INTRODUCTION, EVOLUTION AND DIFFUSION IN ITALY.

Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., & Kahmann, R. (2009). Ustilago maydis as a pathogen. Annual review of phytopathology, 47(1), 423-445. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081923

Brown P and Saa S (2015) Biostimulants in agriculture. Front. Plant Sci. 6:671. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00671

Brown, M. B., & Forsythe, A. B. (1974). Robust Tests for the Equality of Variances. Journal of the American Statistical Association, 69(346), 364–367. https://doi.org/10.1080/01621459.1974.10482955

Bulgari, R., Trivellini, A., & Ferrante, A. (2019). Effects of two doses of organic extract-based biostimulant on greenhouse lettuce grown under increasing NaCl concentrations. Frontiers in plant science, 9, 1870. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01870

C.K. Khoury, A.D. Bjorkman, H. Dempewolf, J. Ramirez-Villegas, L. Guarino, A. Jarvis, L.H. Rieseberg, & P.C. Struik, Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111 (11) 4001-4006, https://doi.org/10.1073/pnas.1313490111

Calvo, P., Nelson, L. & Kloepper, J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. Plant Soil 383, 3–41 (2014). https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8

Canella, M., Ardenghi, N. M., Müller, J., Rossi, G., & Guzzon, F. (2022). An updated checklist of plant agrobiodiversity of northern Italy. Genetic Resources and Crop Evolution, 69, 2159 - 2178. https://doi.org/10.1007/s10722-022-01365-y

Cárcova, J., Uribelarrea, M., Borrás, L., Otegui, M. E., & Westgate, M. E. (2000). Synchronous pollination within and between ears improves kernel set in maize. Crop Science, 40(4), 1056-1061. https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4041056x

Chaffey, N. (2000). Physiological anatomy and function of the membranous grass ligule. The New Phytologist, 146(1), 5-21. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00618.x

Chaudhry, A., Chen, Z. & Gallavotti, A. Hormonal influence on maize inflorescence development and reproduction. Plant Reprod 37, 393–407 (2024). https://doi.org/10.1007/s00497-024-00510-0

Chisté, M.N., Mody, K., Kunz, G. et al. Intensive land use drives small-scale homogenization of plant- and leafhopper communities and promotes generalists. Oecologia 186, 529–540 (2018). https://doi.org/10.1007/s00442-017-4031-0

Christine H. Foyer, Shigeru Shigeoka, Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis, Plant Physiology, Volume 155, Issue 1, January 2011, Pages 93–100, https://doi.org/10.1104/pp.110.166181

Cole, M.B., Augustin, M.A., Robertson, M.J. *et al.* The science of food security. *npj Sci Food* **2**, 14 (2018). https://doi.org/10.1038/s41538-018-0021-9

Corrado, G., & Rao, R. (2017). Towards the Genomic Basis of Local Adaptation in Landraces. *Diversity*, *9*(4), 51. https://doi.org/10.3390/d9040051

Desheva, G. (2016). Correlation and path-coefficient analysis of quantitative characters in winter bread wheat varieties. Trakia Journal of Sciences, 14(1), 14–19. https://doi.org/10.15547/tjs.2016.01.003

Di Pasquale, G. M., Stagnati, L., Lezzi, A., Lanubile, A., Marocco, A., Rossi, G., & Busconi, M. (2024). Morphological and Genetic Characterization of Maize Landraces Adapted to Marginal Hills in North-West Italy. Plants, 13(7), 1030. https://doi.org/10.3390/plants13071030

Djamei, A., & Kahmann, R. (2012). Ustilago maydis: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. PLoS pathogens, 8(11), e1002955. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002955

Dong, T., Shang, J., Chen, J. M., Liu, J., Qian, B., Ma, B., Morrison, M. J., Zhang, C., Liu, Y., Shi, Y., Pan, H., & Zhou, G. (2019). Assessment of Portable Chlorophyll Meters for Measuring Crop Leaf Chlorophyll Concentration. Remote Sensing, 11(22), 2706. https://doi.org/10.3390/rs11222706

Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. Scientia horticulturae, 196, 3-14. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021

Dutta R, Kumar S, Jayalakshmi K, Radhakrishna A, Bhagat K, Manjunatha Gowda DC, Karuppaiah V, Bhandari HR, Bomble R, Gurav V, Mahajan V and Singh M (2024) Potential of Trichoderma strains to positively modulate plant growth processes and bulb yield in Rabi onion. Front. Sustain. Food Syst. 8:1427303. https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1427303

Elisa, D. H., Marcela, G. M., Alejandra, G. U. J., & Elena, D. H. M. (2022). The nutraceutical value of maize (Zea mays L.) landraces and the determinants of its variability: A review. *Journal of Cereal Science*, *103*, 103399. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103399

Elshahawy, I. E., & Marrez, D. A. (2024). Antagonistic activity of Trichoderma asperellum against Fusarium species, chemical profile and their efficacy for management of Fusarium-root rot disease in dry bean. Pest Management Science, 80(3), 1153-1167. https://doi.org/10.1002/ps.7846

Eltaher, S., Sallam, A., Emara, H. A., Nower, A. A., Salem, K. F. M., Börner, A., Baenziger, P. S., & Mourad, A. M. I. (2022). Genome-Wide Association Mapping Revealed SNP Alleles Associated with Spike Traits in Wheat. Agronomy, 12(6), 1469. https://doi.org/10.3390/agronomy12061469

FAO (1996). *Rome Declaration on World Food Security and World Food Summit Plan of Action*. World Food Summit, 13–17 November 1996, Rome, Italy. https://www.fao.org/3/w3613e/w3613e00.htm

FAO (2002). *World agriculture: towards 2015/2030. Summary report*. Rome: Food and Agriculture Organization. Disponibile su: https://www.fao.org/3/a-y3557e.pdf

FAO (2024). FAOSTAT. Crops and livestock products.

Disponibile su: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL

Farooq, A., Farooq, N., Akbar, H., Hassan, Z. U., & Gheewala, S. H. (2023). A critical review of climate change impact at a global scale on cereal crop production. *Agronomy*, *13*(1), 162. https://doi.org/10.3390/agronomy13010162

Fatima, I., Gao, Y., Xu, X., Jin, J., Duan, S., Zhen, W., Xie, C., & J. (2021). Genome-Wide Association Mapping of Seedling Biomass and Root Traits Under Different Water Conditions in Wheat. Frontiers in Genetics, 12. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.663557

Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., ... & Zaks, D. P. (2011). Solutions for a cultivated planet. Nature, 478(7369), 337-342. https://doi.org/10.1038/nature10452

Franco, S., Pancino, B., Martella, A., & De Gregorio, T. (2022). Assessing the presence of a monoculture: from definition to quantification. *Agriculture*, *12*(9), 1506. https://doi.org/10.3390/agriculture12091506

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Srinivasan, M., Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives, Genetics Research International, 2015, 431487, 14 pages, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/431487

Grainger, M. (2010). World Summit on Food Security (UN FAO, Rome, 16–18 November 2009). Development in Practice, 20(6), 740–742. https://doi.org/10.1080/09614524.2010.491540

Guler, N. S., Pehlivan, N., Karaoglu, S., Guzel, S., & Bozdeveci, A. (2016). Trichoderma atroviride ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings. Acta Physiologiae Plantarum, 38, 1-9. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2153-3

Guo, Z., Zhao, Y., Röder, M.S. et al. Manipulation and prediction of spike morphology traits for the improvement of grain yield in wheat. Sci Rep 8, 14435 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-31977-3

Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. d. C., Fadiji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., & Santoyo, G. (2023). Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. Plants, 12(3), 432. https://doi.org/10.3390/plants12030432

Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. *Advances in agronomy*, *130*, 141-174. https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001

Harman, G., Howell, C., Viterbo, A. et al. Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2, 43–56 (2004). https://doi.org/10.1038/nrmicro797

Hodel, R. G. J., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J., Crowl, A., Sun, M.-M., Liu, X.-X., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S.-C., Soltis, D., & Soltis, P. (2016). The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. Applications in Plant Sciences, 4. https://doi.org/10.3732/apps.1600025

Horrigan, L., Lawrence, R. S., & Walker, P. (2002). How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. Environmental health perspectives, 110(5), 445–456. https://doi.org/10.1289/ehp.02110445

https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/fusarium-verticillioides/

Intana, W., Suwannarach, N., Kumla, J., Wonglom, P., & Sunpapao, A. (2024). Plant growth promotion and biological control against Rhizoctonia solani in Thai local rice variety "Chor Khing" using Trichoderma breve Z2-03. Journal of Fungi, 10(6), 417. https://doi.org/10.3390/jof10060417

J. Sebastian,M. Yee,W. Goudinho Viana,R. Rellán-Álvarez,M. Feldman,H.D. Priest,C. Trontin,T. Lee,H. Jiang,I. Baxter,T.C. Mockler,F. Hochholdinger,T.P. Brutnell, & J.R. Dinneny, Grasses suppress shoot-borne roots to conserve water during drought, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113 (31) 8861-8866, https://doi.org/10.1073/pnas.1604021113

Jamali, S. H., Cockram, J., & Hickey, L. (2019). Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. Theoretical and Applied Genetics, 132, 1911 - 1929. https://doi.org/10.1007/s00122-019-03348-7

Jules Pretty; Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 12 February 2008; 363 (1491): 447–465. https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2163

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M. et al. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. Nature 444, 97–101 (2006). https://doi.org/10.1038/nature05248

Kamran, M., Su, W., Ahmad, I., Meng, X., Cui, W., Zhang, X., Siwei, M., Khan, A., Han, Q., & Liu, T.-N. (2018). Application of paclobutrazol affect maize grain yield by regulating root morphological and physiological characteristics under a semi-arid region. Scientific Reports, 8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23166-z

Kaur, S., Kumari, A., Seem, K. *et al.* Finger millet (*Eleusine coracana* L.): from staple to superfood—a comprehensive review on nutritional, bioactive, industrial, and climate resilience potential. *Planta* **260**, 75 (2024). https://doi.org/10.1007/s00425-024-04502-2

Keating, B. A., Herrero, M., Carberry, P. S., Gardner, J., & Cole, M. B. (2014). Food wedges: framing the global food demand and supply challenge towards 2050. *Global Food Security*, *3*(3-4), 125-132. https://doi.org/10.1016/j.gfs.2014.08.004

King, A., Hocking, A., & Pitt, J. (1979). Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Applied and Environmental Microbiology, 37, 959 - 964. https://doi.org/10.1128/aem.37.5.959-964.1979

Kitsche, A. and Schaarschmidt, F. (2015), Analysis of Statistical Interactions in Factorial Experiments. J Agro Crop Sci, 201: 69-79. https://doi.org/10.1111/jac.12076

Koman, E., Laurilliard, E., Moore, A., & Ruiz-Uribe, N. (2021). Restoration through regeneration: a scientific and political lens into regenerative agriculture in the United States. Journal of Science Policy & Governance, 19, 1-28. https://doi.org/10.38126/JSPG190106

Kthiri, Z., Jabeur, M. B., Machraoui, M., Gargouri, S., Hiba, K., & Hamada, W. (2020). Coating seeds with Trichoderma strains promotes plant growth and enhance the systemic resistance against Fusarium crown rot in durum wheat. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30, 1-10. https://doi.org/10.1186/s41938-020-00338-6

Lal R. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. Sustainability. 2015; 7(5):5875-5895. https://doi.org/10.3390/su7055875

Lal, R. Climate Change and Soil Degradation Mitigation by Sustainable Management of Soils and Other Natural Resources. *Agric Res* **1**, 199–212 (2012). https://doi.org/10.1007/s40003-012-0031-9

Lanz, B., Dietz, S., & Swanson, T. (2018). The expansion of modern agriculture and global biodiversity decline: an integrated assessment. *Ecological Economics*, *144*, 260-277. https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.07.018

Lei, Y., Zhou, Y., Price, M., & Song, Z. (2021). Genome-wide characterization of microsatellite DNA in fishes: survey and analysis of their abundance and frequency in genome-specific regions. BMC Genomics, 22. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07752-6

Liu N, Chen Y, Liu J, Su Q, Zhao B, Sun M, Jia H, Cao Z and Dong J (2022) Transcriptional differences between major Fusarium pathogens of maize, Fusarium verticillioides and Fusarium

graminearum with different optimum growth temperatures. Front. Microbiol. 13:1030523. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1030523

Lopes, M. N., Cândido, M. J. D., Pompeu, R. C. F. F., Silva, R. G. da, Lacerda, C. F. de, Bezerra, M. A., & Carneiro, M. S. de S. (2020). Gas exchange in massai grass fertilized with nitrogen and grazed by sheep. Bioscience Journal, 36(1), 168–176. https://doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-42411

López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015). Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. Scientia horticulturae, 196, 109-123. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043

López-Coria, M., Guzmán-Chávez, F., Carvente-García, R., Muñoz-Chapul, D., Sánchez-Sánchez, T., Arciniega-Ruíz, J. M., King-Díaz, B., & Sánchez-Nieto, S. (2023). Maize plant expresses SWEET transporters differently when interacting with Trichoderma asperellum and Fusarium verticillioides, two fungi with different lifestyles. Frontiers in Plant Science, 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1253741

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. Advances in applied microbiology, 90, 29–92. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001

MacLaren C, Cicogna J. Strauss J. Swanepoel P. Dehnen-Schmutz K. L'allevamento in diversi sistemi colturali migliora la gestione delle infestanti e mantiene le rese riducendo al contempo gli input. J Appl Ecol. 2019;56:144–156. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13239

Malavathu, K., Godbole, V. Y., Singh, A., Chandrika, K., & Prasad, D. (2025). Porous Biopolymer Matrices: Advanced Seed Delivery Platforms for Beneficial Microbes to Combat Soilborne Diseases. ACS Omega, 10, 20723 - 20731. https://doi.org/10.1021/acsomega.5c01710

Mangini, G., Gadaleta, A., Colasuonno, P., Marcotuli, I., Signorile, A. M., Simeone, R., ... & Blanco, A. (2018). Genetic dissection of the relationships between grain yield components by genome-wide association mapping in a collection of tetraploid wheats. PloS one, 13(1), e0190162. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190162

Martini, K., Boddu, S. S., Nemenman, I., & Vega, N. (2024). Maximum likelihood estimators for colony-forming units. Microbiology Spectrum, 12. https://doi.org/10.1128/spectrum.03946-23

Masson-Delmotte V, Zhai P, Pirani A, Connors SL, Péan C, Berger S et al. (2021). Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781009157896

Mastouri, F., Björkman, T., & Harman, G. E. (2012). Trichoderma harzianum enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. Molecular plant-microbe interactions, 25(9), 1264-1271. https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0240

Maurice Stevenson Bartlett; Properties of sufficiency and statistical tests. Proc. R. Soc. A 1 May 1937; 160 (901): 268–282. https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109

Mazzola, M., & Freilich, S. (2017). Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. Phytopathology, 107(3), 256-263. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW

McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. Nutrition Bulletin, 29(2), 111-142. https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x

Mirić, M., Selaković, D., Jovin, P., Hojka, Z., & Filipović, M. (2007). Il peso dei mille semi nella teoria e nella pratica. Selekcija i semenarstvo , 13 (3-4), 49-58. https://hdl.handle.net/21.15107/rcub_rik_185

Mishra AK, Singh VP (2010) A review of drought concepts. J. Hydr. 391: 202-216. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.07.012

Moustafa, K. (2024). Maize's origin to be revisited. Plant Signaling & Behavior, 19(1), 2332017. https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2332017

Mukherjee PK, Kenerley CM2010.Regulation of Morphogenesis and Biocontrol Properties in Trichoderma virens by a VELVET Protein, Vel1. Appl Environ Microbiol76. https://doi.org/10.1128/AEM.02391-09

Munkvold, G. P. (2009). Seed pathology progress in academia and industry. Annual review of phytopathology, 47(1), 285-311. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081916

Mutez Ali Ahmed, Mohsen Zarebanadkouki, Félicien Meunier, Mathieu Javaux, Anders Kaestner, Andrea Carminati, Root type matters: measurement of water uptake by seminal, crown, and lateral roots in maize, Journal of Experimental Botany, Volume 69, Issue 5, 20 February 2018, Pages 1199–1206, https://doi.org/10.1093/jxb/erx439

Negri, V. Agro-Biodiversity Conservation in Europe: Ethical Issues. J Agric Environ Ethics 18, 3–25 (2005). https://doi.org/10.1007/s10806-004-3084-3

Neupane D, Adhikari P, Bhattarai D, Rana B, Ahmed Z, Sharma U, Adhikari D. Does Climate Change Affect the Yield of the Top Three Cereals and Food Security in the World? *Earth*. 2022; 3(1):45-71. https://doi.org/10.3390/earth3010004

Padilla FM, de Souza R, Peña-Fleitas MT, Gallardo M, Giménez C and Thompson RB (2018) Different Responses of Various Chlorophyll Meters to Increasing Nitrogen Supply in Sweet Pepper. Front. Plant Sci. 9:1752. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01752

Pandey, P. C., & Pandey, M. (2023). Highlighting the role of agriculture and geospatial technology in food security and sustainable development goals. Sustainable Development, 31(5), 3175–3195. https://doi.org/10.1002/sd.2600

Paparella, S., Araújo, S.S., Rossi, G. et al. Seed priming: state of the art and new perspectives. Plant Cell Rep 34, 1281–1293 (2015). https://doi.org/10.1007/s00299-015-1784-y

Paramesh V, Mohan Kumar R, Rajanna GA, Gowda S, Nath AJ, Madival Y, Jinger D, Bhat S and Toraskar S (2023) Integrated nutrient management for improving crop yields, soil properties, and reducing greenhouse gas emissions. Front. Sustain. Food Syst. 7:1173258. https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1173258

Plénet, D., Mollier, A. & Pellerin, S. Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. II. Radiation-use efficiency, biomass accumulation and yield components. Plant and Soil 224, 259–272 (2000). https://doi.org/10.1023/A:1004835621371

Porkka, M., Guillaume, J.H.A., Siebert, S., Schaphoff, S. and Kummu, M. (2017), The use of food imports to overcome local limits to growth. Earth's Future, 5: 393-407. https://doi.org/10.1002/2016EF000477

Ranal, M. A., & Santana, D. G. D. (2006). How and why to measure the germination process?. Brazilian Journal of Botany, 29, 1-11. https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002

Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PloS one*, *8*(6), e66428. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428

Reganold, J., Wachter, J. Organic agriculture in the twenty-first century. Nature Plants 2, 15221 (2016). https://doi.org/10.1038/nplants.2015.221

Regione Toscana. (s.d.). Descrittori specie erbacee: 51 Mais [Scheda tecnica]. Banca del Germoplasma della Regione Toscana. http://germoplasma.regione.toscana.it/Download/Descrittori%20specie%20erbacee/51%20Mais.pdf

Ripoll, S., Andersson, J., Badstue, L., Büttner, M., Chamberlin, J., Erenstein, O., & Sumberg, J. (2017). Rural transformation, cereals and youth in Africa: What role for international agricultural research?. Outlook on Agriculture, 46(3), 168-177. https://doi.org/10.1177/0030727017724669

Robani, H. (1994). Film-coating of horticultural seed.. Horttechnology, 4, 104-105. https://doi.org/10.21273/horttech.4.2.104b

Rouphael Y and Colla G (2020) Editorial: Biostimulants in Agriculture. Front. Plant Sci. 11:40. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040

Rowan F. Sage, Tammy L. Sage, Ferit Kocacinar. 2012. Photorespiration and the Evolution of C_4 Photosynthesis. *Annual Review Plant Biology*. 63:19-47. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105511

S.R. Whitt, L.M. Wilson, M.I. Tenaillon, B.S. Gaut, & E.S. Buckler, Genetic diversity and selection in the maize starch pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (20) 12959-12962, https://doi.org/10.1073/pnas.202476999

Schuster, A., Schmoll, M. Biology and biotechnology of Trichoderma . Appl Microbiol Biotechnol 87, 787–799 (2010). https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1

Semenza, J. C., & Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet infectious diseases*, *9*(6), 365-375. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70104-5

Serna-Díaz, M. G., Mercado-Flores, Y., Jiménez-González, A., Anducho-Reyes, M. A., Medina-Marín, J., Tuoh-Mora, J. S., & Téllez-Jurado, A. (2020). Use of barley straw as a support for the production of conidiospores of Trichoderma harzianum. Biotechnology Reports, 26, e00445. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00445

Shiferaw, B., Prasanna, B.M., Hellin, J. et al. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. Food Sec. 3, 307–327 (2011). https://doi.org/10.1007/s12571-011-0140-5

Shiferaw, B., Smale, M., Braun, HJ. *et al.* Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Sec.* **5**, 291–317 (2013). https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y

Šidák, Z. (1967). Rectangular Confidence Regions for the Means of Multivariate Normal Distributions. *Journal of the American Statistical Association*, *62*(318), 626–633. https://doi.org/10.1080/01621459.1967.10482935

Solaimalai, A., Anantharaju, P., Irulandi, S., & Theradimani, M. (2020). Maize crop: Improvement, production, protection and post harvest technology. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781003090182

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). Trichoderma: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. Plants, 9(6), 762. https://doi.org/10.3390/plants9060762

Spinoni J, Naumann G, Vogt JV (2017) Pan-European seasonal trends and recent changes of drought frequency and severity. Global Planet. Change, 148: 113-130. https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.11.013

Stokes, G.L., Lynch, A.J., Smidt, S.J., Steel, E.A., Dowd, S., Britton, R., Bai, X., Cerquera, T.B., Guerrero, G., Cheramy, J., Koning, A., Maghsood, F.F., Piccillo, A.M., and Schuppie, G., 2024, Life on land needs fresh water (SDG 15), chap. 24 of Water matters: Achieving the sustainable development goals, p. 295-309, https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15537-6.00024-0.

Sun, Q., Miao, C., Hanel, M., Borthwick, A. G. L., Duan, Q., Ji, D., & Li, H. (2019). Global heat stress on health, wildfires, and agricultural crops under different levels of climate warming. Environment International, 128, 125–136. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.025

Süß, A., Danner, M., Obster, C., Locherer, M., Hank, T., Richter, K. (2015): Measuring Leaf Chlorophyll Content with the Konica Minolta SPAD-502Plus – Theory, Measurement, Problems, Interpretation. EnMAP Field Guides Technical Report, GFZ Data Services. DOI: http://doi.org/10.2312/enmap.2015.010

Swati, P., Rasane, P., Kaur, J., Kaur, S., Ercisli, S., Assouguem, A., Ullah, R., Alqahtani, A. & Singh, J. (2024). The nutritional, phytochemical composition, and utilisation of different parts of maize: A comparative analysis. Open Agriculture, 9(1), 20220358. https://doi.org/10.1515/opag-2022-0358

Tan, Z. X., Lal, R., & Wiebe, K. D. (2005). Global soil nutrient depletion and yield reduction. *Journal of sustainable agriculture*, *26*(1), 123-146. https://doi.org/10.1300/J064v26n01_10

Thwaites, H. J., Hume, I. V., & Cavagnaro, T. R. (2025). The case for urban agriculture: Opportunities for sustainable development. Urban Forestry & Urban Greening, 110, 128861. https://doi.org/10.1016/j.ufug.2025.128861

Tilman, D., Cassman, K., Matson, P. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature 418, 671–677 (2002). https://doi.org/10.1038/nature01014

Tiwari, M., Singh, R., Jha, R., & Singh, P. (2022). Heritable priming by Trichoderma: A sustainable approach for wheat protection against Bipolaris sorokiniana. Frontiers in Plant Science, 13, Article 1050765. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1050765

Udo Gowik, Peter Westhoff, The Path from C3 to C4 Photosynthesis, Plant Physiology, Volume 155, Issue 1, January 2011, Pages 56–63, https://doi.org/10.1104/pp.110.165308

Unterseer, S., Pophaly, S.D., Peis, R. et al. A comprehensive study of the genomic differentiation between temperate Dent and Flint maize. Genome Biol 17, 137 (2016). https://doi.org/10.1186/s13059-016-1009-x

UPOV 51- Mais.pdf. (s.d.). Recuperato 7 giugno 2024, http://germoplasma.regione.toscana.it/Download/Descrittori%20specie%20erbacee/51%20Mais.pdf

Vejlupkova, Z., & Fowler, J. (2003). Maize DNA Preps for Undergraduate Students: A Robust Method for PCR Genotyping. MNL, 77, 24-25.

Venturini, G., Assante, G., & Vercesi, A. (2011). Fusarium verticillioides contamination patterns in Northern Italian maize during the growing season. Phytopathologia mediterranea, 50(1), 110-120. https://www.jstor.org/stable/26458683

Veteläinen, M., Negri, V., & Maxted, N. (Eds.). (2009). European landraces: On-farm conservation, management and use (Bioversity Technical Bulletin No. 15). Bioversity International

Villa, T. C. C., Maxted, N., Scholten, M., & Ford-Lloyd, B. (2005). Defining and identifying crop landraces. Plant Genetic Resources, 3(3), 373–384. https://doi.org/10.1079/PGR200591

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. Soil biology and Biochemistry, 40(1), 1-10. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002

Wang, H.-Y., Yang, B., Wang, H., & Xiao, H.-X. (2021). Impact of different numbers of microsatellite markers on population genetic results using SLAF-seq data for Rhododendron species. Scientific Reports, 11. https://doi.org/10.1038/s41598-021-87945-x

Wheeler, T., & von Braun, J. (2013). Climate change impacts on global food security. Science (New York, N.Y.), 341(6145), 508–513. https://doi.org/10.1126/science.1239402

Wijerathna-Yapa, A., & Pathirana, R. (2022). Sustainable Agro-Food Systems for Addressing Climate Change and Food Security. Agriculture, 12(10), 1554. https://doi.org/10.3390/agriculture12101554

Williams, J., Dodds, D., Buehring, N., Dhillon, J., & Henry, B. (2021). Corn (Zea mays L.) response to row spacing and plant population in the Mid-South U.S. Agronomy Journal. https://doi.org/10.1002/agj2.20817

Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture. The Open Mycology Journal, 8(1), 71–126. https://doi.org/10.2174/1874437001408010071

Woo, S.L., Hermosa, R., Lorito, M. et al. Trichoderma: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. Nat Rev Microbiol 21, 312–326 (2023). https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5

Wu H, Becraft PW and Dannenhoffer JM (2022) Maize Endosperm Development: Tissues, Cells, Molecular Regulation and Grain Quality Improvement. Front. Plant Sci. 13:852082. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.852082

Xiong X-P, Sun S-C, Zhang X-Y, Li Y-J, Liu F, Zhu Q-H, Xue F and Sun J (2020) Corrigendum: GhWRKY70D13 Regulates Resistance to Verticilliumdahliae in Cotton Through the Ethylene and Jasmonic Acid Signaling Pathways. Front. Plant Sci. 11:1045. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01045

Yadesa, L., & Diro, D. (2023). Nutritional and specialty maize production, consumption, and promising impact on Ethiopia's food and nutrition security: A review. EAS Journal of Nutrition and Food Sciences, 5(5), 142–157. https://doi.org/10.36349/easjnfs.2023.v05i05.003

Yakhin, O. I., Lubyanov, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. Frontiers in plant science, 7, 2049. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049

Yang, Y., Tilman, D., Jin, Z., Smith, P., Barrett, C. B., Zhu, Y.-G., Burney, J., D'Odorico, P., Fantke, P., Fargione, J., Finlay, J. C., Rulli, M. C., Sloat, L., van Groenigen, K. J., West, P. C., Ziska, L., Michalak, A. M., Lobell, D. B., & Zhuang, M. (2024). Climate change exacerbates the environmental impacts of agriculture. Science, 385(6713), Article eadn3747. https://doi.org/10.1126/science.adn3747

Yu, C.; Liu, X.; Zhang, X.; Zhang, M.; Gu, Y.; Ali, Q.; Mohamed, M.S.R.; Xu, J.; Shi, J.; Gao, X.; et al. Mycosubtilin Produced by Bacillus subtilis ATCC6633 Inhibits Growth and Mycotoxin Biosynthesis of Fusarium graminearum and Fusarium verticillioides. Toxins 2021, 13, 791. https://doi.org/10.3390/toxins13110791

Zecevic, V., Knežević, D., & Mićanović, D. (2004). Genetic correlations and path coefficient analysis of yield and quality components in wheat. Genetika, 36(1), 13-21. https://doi.org/10.2298/GENSR0401013Z

Zhang, K., Khan, M. N., Khan, Z., Luo, T., Zhang, B., Bi, J., Hu, L., & Luo, L. (2024). Seed priming with ascorbic acid and spermidine regulated auxin biosynthesis to promote root growth of rice under drought stress. Frontiers in Plant Science, 15. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1482930

Zhang, X., Davidson, E., Mauzerall, D. et al. Managing nitrogen for sustainable development. Nature 528, 51–59 (2015). https://doi.org/10.1038/nature15743

Žilić, S., Serpen, A., Akıllıoğlu, G., Janković, M., & Gökmen, V. (2012). Distributions of phenolic compounds, yellow pigments and oxidative enzymes in wheat grains and their relation to antioxidant capacity of bran and debranned flour. Journal of cereal science, 56(3), 652-658. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.07.014

RINGRAZIAMENTI

…