

GIOVANNI VANNACCI<sup>1</sup>, SABRINA SARROCCO<sup>1</sup>

## La risposta della ricerca all'Agenda 2030: impiego di *Trichoderma gamsii* T6085 per una difesa sostenibile dalla fusariosi del frumento

<sup>1</sup> Università di Pisa

COME CAMBIERÀ L'AGRICOLTURA NEL PROSSIMO FUTURO: DALL'AGENDA 2030 AL «FARM FOR FORK»

Entro il 2050, quando la popolazione mondiale passerà da 7 a 9 miliardi, ci troveremo ad affrontare la sfida di sviluppare strategie sostenibili per nutrire una popolazione in forte aumento, il che comporterà una crescente domanda di cibo che andrà a esasperare la richiesta di produzione di alimenti, già compromessa dal fatto che attualmente il consumo è pari a 1,5 volte la capacità di rifornimento del pianeta. Ovviamente, il problema di avere cibo sano e in abbondanza per tutta la popolazione mondiale non si risolve solamente aumentando la qualità e la quantità delle produzioni, ma deve essere affrontato in una ottica complessa, che coinvolge aspetti sociali e politici, oltre che agronomici. Questi ultimi sono ulteriormente complicati dal non trascurabile problema del cambiamento climatico in atto, che comporterà ulteriori rischi per la produzione globale di alimenti.

Nel settembre 2015, 193 Paesi membri dell'ONU hanno sottoscritto l'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile – un programma d'azione per le persone, il pianeta e la prosperità – che include 17 Obiettivi inseriti all'interno di un grande programma che prevede il raggiungimento di 169 traguardi entro il 2030 (United Nations, 2015). In particolare, l'Obiettivo 2 si prefigge di porre fine alla fame, raggiungere la sicurezza alimentare, migliorare la nutrizione e promuovere un'agricoltura sostenibile che aumenti la produttività (nel rispetto degli ecosistemi), rafforzando la capacità di adattamento ai cambiamenti climatici e a condizioni meteorologiche estreme quali siccità, inondazioni e altri disastri, e che migliori progressivamente la qualità del suolo.

Per rafforzare gli obiettivi previsti nell'Agenda 2030, nel maggio 2020 la Commissione Europea ha adottato la strategia *Farm for Fork* (nell'ambito del *Green Deal*) che prevede un piano decennale finalizzato a rendere l'Europa il primo continente *climate-neutral* entro il 2050 e che porterà verso un sistema alimentare equo, sano e rispettoso dell'ambiente. In particolare, questa strategia consentirà di progettare una politica alimentare che coinvolgerà l'intera filiera, dalla produzione al consumo, passando per la distribuzione, e che renderà così i sistemi alimentari europei più sostenibili di quanto lo siano oggi, con una conseguente riduzione del loro impatto sui Paesi terzi.

In linea con gli obiettivi di sviluppo sostenibile, la strategia *Farm to Fork* nasce con l'intento di innescare un miglioramento degli standard a livello globale, attraverso la cooperazione internazionale e politiche commerciali che vedranno coinvolti i Paesi terzi, garantendo una transizione ecologica ed evitando che nel resto del mondo vengano messe in atto pratiche non sostenibili (European Commission, 2020). Oltre a garantire una produzione alimentare sostenibile, una maggiore sicurezza alimentare e una riduzione degli sprechi, investendo in ricerca e innovazione, tra gli obiettivi fondamentali da raggiungere entro il 2030 c'è la riduzione del 50% dell'uso di agrofarmaci chimici e di almeno il 20% dell'uso di fertilizzanti, la riduzione del 50% delle vendite totali di antimicrobici per gli animali d'allevamento e di antibiotici per l'acquacoltura e la trasformazione del 25% dei terreni agricoli in aree destinate all'agricoltura biologica.

Alcuni di questi obiettivi rafforzano la posizione che la Commissione Europea aveva già assunto attraverso la Direttiva UE 2009/128/CE, incentrata su un uso sostenibile dei prodotti per la protezione delle colture. In accordo con questa direttiva, ogni Stato membro è stato chiamato a sviluppare e adottare un proprio piano d'azione nazionale volto a ridurre i rischi e l'impatto che l'uso dei prodotti fitosanitari hanno sulla salute umana e sull'ambiente, a incoraggiare lo sviluppo di strategie di lotta integrata contro i parassiti così come l'introduzione di approcci o tecniche alternative finalizzate alla riduzione della dipendenza dall'uso di prodotti chimici per la difesa delle piante.

Tra le cause alle quali attribuire la diminuzione della produttività delle colture, le malattie delle piante sono direttamente responsabili della riduzione tra il 20 e il 40% della resa delle colture, percentuali che sottostimano i costi reali sopportati dalla società (Savary et al., 2012). Nello scenario della gestione delle malattie delle piante, nel contesto che ci accompagnerà nel prossimo decennio, la difesa biologica, basata sull'utilizzo di microrganismi benefici quali funghi filamentosi, batteri e lieviti, rappresenta una valida ed eco-compatibile alternativa all'impiego di prodotti fitosanitari a base chimica (Sarrocco e Vannacci, 2018) e risponde appieno alle richieste della Comunità Europea,

fornendo, al contempo, un mezzo per raggiungere l'obiettivo della sostenibilità dell'Agenda 2030. Inoltre, le strategie di lotta biologica possono essere utilizzate da sole o come parte di un approccio integrato, in combinazione con prodotti a base chimica e/o cultivar resistenti/tolleranti risultanti da strategie di miglioramento genetico, contribuendo così al rispetto degli ecosistemi. Da qui, molte grandi aziende, così come le piccole e medie imprese le cui attività sono state storicamente incentrate sullo sviluppo, registrazione e commercializzazione di prodotti chimici per la difesa, stanno sempre più indirizzando le proprie risorse verso lo sviluppo di nuovi prodotti contenenti microrganismi benefici come principi attivi (Jensen et al., 2016).

#### IMPIEGO DI FUNGHI FILAMENTOSI BENEFICI PER UNA PROTEZIONE SOSTENIBILE DELLE COLTURE

Da oltre 30 anni si sta assistendo a un'intensificazione della ricerca applicata alla difesa biologica, come dimostrato dal sempre più diffuso impiego di questa strategia nella protezione delle colture e da un numero crescente di prodotti, attualmente disponibili sul mercato, contenenti principi attivi a base di uno o più microrganismi. In aggiunta, le nuove metodologie di ricerca, note come approcci "omici", stanno portando a una maggiore e più dettagliata conoscenza dei meccanismi d'azione degli agenti di biocontrollo e delle loro interazioni con i patogeni, le piante e l'ambiente (Fravel, 2005; Vicente et al., 2019; Sarrocco et al., 2020b).

I microrganismi benefici, tra cui i funghi filamentosi occupano un posto di rilievo, possono interagire con i patogeni delle piante attraverso meccanismi diretti e indiretti che, comunemente, agiscono in sinergia. Indipendentemente dai meccanismi utilizzati, questi organismi benefici portano a una riduzione dei sintomi delle malattie delle piante, nonché a un miglioramento della quantità e della qualità della produzione (Lorito et al., 2010). Per quanto riguarda i funghi filamentosi benefici, meccanismi diretti quali micoparassitismo, antibiosi e competizione sono i responsabili di una diminuzione dello sviluppo e dell'attività dei patogeni, mentre il meccanismo indiretto dell'induzione di resistenza, ovvero la stimolazione della risposta di difesa delle piante attraverso un cross-talk tra l'agente di biocontrollo e l'ospite vegetale, porta a una riduzione della malattia anche in assenza del contatto fisico diretto tra l'organismo benefico e il patogeno (Viterbo et al., 2007; Kubicek et al., 2019).

Tra i funghi filamentosi utilizzabili in strategie di difesa biologica, senza dubbio quelli appartenenti al genere *Trichoderma* sono tra i più studiati e, al momento, tra i più frequentemente utilizzati come principio attivo dei

prodotti per la difesa a base di microrganismi (Sarrocco e Vannacci, 2018; Abbey et al., 2019). Isolati per la prima volta nel 1794 da terreno e materiale organico in decomposizione, questi funghi sono in grado di colonizzare rapidamente i substrati e si comportano come simbionti opportunistici e avirulenti che instaurano relazioni con le piante. In terreni colonizzati dai patogeni, sono in grado non solo di stimolare la crescita delle piante, ma inibiscono lo sviluppo dei patogeni attraverso diversi meccanismi d'azione che includono il micoparassitismo, l'antibiosi e la competizione per siti di sviluppo e nutrienti. Quando interagiscono con la pianta, in alcuni casi avvalendosi di uno stile di vita endofitico, sono in grado di aumentarne la tolleranza nei confronti di stress biotici e abiotici e di aumentare la capacità dell'ospite vegetale di assimilare i nutrienti presenti nel terreno (Lopez-Bucio et al., 2015). Inoltre, rappresentano un vero e proprio serbatoio di metaboliti secondari, alcuni dei quali di estremo interesse ai fini dell'azione benefica nei confronti delle piante e verso i patogeni (Vicente et al., 2020). Infine, molti isolati di *Trichoderma* mostrano una resistenza verso i prodotti di sintesi utilizzati come principi attivi di fitofarmaci, il che apre la possibilità di impiegare questi funghi in una strategia di difesa integrata volta a ridurre l'impiego di fitofarmaci senza diminuire l'azione di contenimento dei patogeni (Jensen et al., 2016).

#### PASSATO, PRESENTE E FUTURO DI «TRICHODERMA GAMSII» T6085 NEL CONTROLLO DELLA FUSARIOSI DEL FRUMENTO

##### *La fusariosi della spiga di frumento*

Secondo una recente stima della FAO, tra i principali obiettivi della produzione agraria mondiale ci sono quelli che in inglese vengono definiti *staple food*, cioè quegli alimenti che costituiscono la parte principale della dieta e forniscono il maggior apporto in termini di energia e fattori nutrizionali. I cereali quali riso, frumento e mais rappresentano un terzo della fonte energetica della popolazione mondiale e sono considerati gli alimenti principali, pari al 46% della dieta in Africa e il 26% in Europa in termini di apporto energetico, per oltre 4 miliardi di persone. Con una produzione annua di più di 700 milioni di tonnellate dal 2013 al 2017 (FAOStat <http://www.fao.org/faostat/en/#home>), il frumento è considerato il terzo cereale, per importanza, nel mondo. Come tutte le colture, anche questa è soggetta all'attacco di numerosi patogeni che ne possono comportare una riduzione, anche drammatica, in termini qualitativi e quantitativi, della resa.

Differenti patogeni, tra cui gli agenti causali delle ruggini (*Puccinia graminis f. tritici*, *P. striiformis*, *Puccinia recondita*), *Zymoseptoria tritici*, *Parastagonospora nodorum* e *Pyrenophora tritici-repentis*, possono comprometterne la produzione. Oltre a questi, anche la fusariosi della spiga (o *Fusarium Head Blight*, FHB) è riconosciuta come uno dei problemi più seri che possono insorgere in tutte le regioni coltivate a frumento. La fusariosi della spiga è una malattia complessa causata da un gruppo di funghi patogeni, circa 20 specie riconducibili al genere *Fusarium*, tra le quali il complesso di specie di *F. graminearum* (*Fusarium graminearum* Species Complex - FGSC), *F. avenaceum*, *F. culmorum*, e *F. poae* sono le più frequenti. Altre specie come *F. acuminatum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*, *F. cerealis* e *F. tricinctum* possono essere considerati meno importanti in termini d'incidenza globale della malattia (Figueroa et al., 2018).

Questa malattia rappresenta un rischio serio sia per la produzione (*food security*) sia per la qualità (*food safety*) degli alimenti: non solo la malattia può causare fino al 30% di perdita delle produzioni, ma la qualità della granello può essere compromessa oltre che per una riduzione della dimensione delle cariossidi e del loro contenuto proteico, anche per il rischio di contaminazione da micotossine prodotte dalle diverse specie di *Fusarium*. Queste micotossine sono metaboliti secondari altamente pericolosi, se ingeriti, per l'uomo e gli animali al punto da indurre molti Paesi del mondo a regolarne il contenuto massimo consentito negli alimenti (Logrieco, 2018). I tricoteceni, tra cui il Deossinivalenolo (DON) e i suoi derivati acetilati e le tossine T-2/HT-2, potenti inibitori della sintesi delle proteine negli eucarioti, insieme allo Zearalenone (ZEN), responsabile di sindromi estrogeniche negli animali, sono tra le principali micotossine associate al FHB nel frumento (Desjardins et al., 2007; Sarrocco et al., 2019a).

Da un punto di vista epidemiologico, i patogeni svernano sui residui colturali tra due cicli di coltivazione successivi sotto forma di micelio o di periteci (strutture di riproduzione sessuate) all'interno dei quali si differenziano le ascospore. In primavera conidi, prodotti dal micelio, e ascospore raggiungono le spighe in antesi, momento di massima suscettibilità, per dare inizio all'infezione dell'ospite (Parry et al., 1995). Attualmente, diverse sono le strategie utilizzate per controllare la fusariosi della spiga. Tra queste ricordiamo l'impiego di fungicidi, l'utilizzo di cultivar resistenti, diverse pratiche agronomiche e l'impiego di microrganismi in una strategia di difesa biologica. Tuttavia, sia l'utilizzo di fungicidi che la coltivazione di cultivar resistenti (ma una totale resistenza alla malattia non è ancora stata trovata), così come le pratiche agronomiche – ad esempio la lavorazione del terreno o le rotazioni colturali – non assicurano un controllo completo della malattia. Alla luce della mancanza di

un efficace metodo di controllo e considerando il ciclo vitale dei patogeni, l'impiego di una strategia di difesa biologica mediante l'utilizzo di microrganismi benefici, quali i funghi, rappresenta una valida alternativa, nel rispetto della sostenibilità, per la gestione della fusariosi del frumento (Vannacci e Sarrocco, 2018).

### *Trichoderma gamsii* T6085

In questo contesto, dal 2010, il gruppo di ricerca della Patologia Vegetale dell'Università di Pisa è attivamente impegnato nello studio di un isolato fungino benefico, *Trichoderma gamsii* T6085, quale possibile principio attivo per un prodotto da utilizzare nella lotta al FHB.

*T. gamsii* T6085 è stato selezionato, a partire da un'ampia collezione di isolati di *Trichoderma*, per la sua capacità di crescere in presenza di elevate concentrazioni della micotossina DON (50 ppm), conosciuta non solo come fattore di virulenza che favorisce l'infezione dell'ospite da parte dei principali agenti causali della malattia (*F. graminearum* e *F. culmorum*), ma anche per il suo ruolo ecologico nel controllo di eventuali competitori dei patogeni stessi (Matarese et al., 2012; Sarrocco et al., 2012). Già dai primi studi, *T. gamsii* T6085 si è dimostrato essere un isolato con interessanti caratteristiche antagonistiche, capace di micoparassitizzare *F. graminearum* e *F. culmorum*, intorno al cui micelio è in grado di sviluppare avvolgimenti ifali che portano alla morte dei patogeni, e, da esperimenti preliminari condotti nel 2012, si è documentata la sua capacità di ridurre significativamente sia la crescita dei patogeni che la produzione di DON da parte di *F. graminearum* (Matarese et al., 2012).

Dalle prime prove in campo, condotte per due anni consecutivi, applicato sia nel terreno come inoculante dei residui colturali che sulle spighe in fioritura, *T. gamsii* T6085 ha determinato una riduzione significativa della severità del FHB e ha mostrato la capacità di colonizzare in modo endofitico fino al 30% dei tessuti delle spighe, caratteristica fino ad allora non descritta per altri agenti di lotta biologica applicati alla spiga (Sarrocco et al., 2013).

Di particolare interesse è apparsa la grande capacità competitiva dimostrata da questo isolato benefico. Quando inoculato in presenza di *F. graminearum* su granella di frumento e di riso, ha ridotto significativamente sia la crescita del patogeno che la quantità di tricoteceni (tra cui il DON e le sue forme acetilate) dopo 21 giorni di incubazione, dimostrando non solo una forte attività antagonistica ma anche un'effettiva capacità competitiva per i due substrati naturali (Sarrocco et al., 2019b). Ulteriori indagini hanno portato, nell'anno successivo, a confermare questa capacità saprofitica competitiva nei confronti

dei residui colturali che, come accennato precedentemente, svolgono un ruolo fondamentale per il patogeno in assenza della pianta ospite assicurando la sopravvivenza dell'inoculo che andrà a infettare la pianta. Quando applicato su paglia, insieme a *F. graminearum* e a un isolato di *F. oxysporum*, noto competitore naturale per i residui colturali nei confronti dei *Fusaria* coinvolti nel FHB, *T. gamsii* T6085 è stato in grado di ridurre significativamente, dopo nove settimane di incubazione, sia la biomassa del patogeno che il numero di periteci (strutture di sopravvivenza di *F. graminearum*) differenziati sugli stessi residui. Questa riduzione significativa è stata osservata applicando il patogeno e l'antagonista contemporaneamente, ma anche inoculando *T. gamsii* T6085 48 ore dopo il patogeno, al fine di riprodurre una condizione più vicina a quella che si verifica in campo, dove l'applicazione dell'isolato benefico dovrebbe avvenire in una fase in cui il patogeno ha già colonizzato i residui colturali (Sarrocchio et al., 2020a).

Al fine di definire i meccanismi d'azione alla base degli effetti osservati, sono state, quindi, caratterizzate le esigenze nutrizionali del nostro isolato benefico a confronto con quelle dei patogeni *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides* e del competitore naturale *F. oxysporum*. Allo scopo, questo gruppo di funghi è stato sottoposto all'analisi mediante Biolog®, un sistema che consente di studiare, contemporaneamente, la capacità di crescita e assimilazione di 96 fonti di carbonio. L'analisi dei dati ottenuti, elaborati con un nuovo approccio statistico (in collaborazione con l'Università di Roma e l'Università di Bari) che permette di considerare contemporaneamente i diversi parametri della crescita fungina (latenza, fase esponenziale, fase stazionaria e area sottostante la curva), suggerisce che la competizione per i nutrienti non sia alla base dell'efficacia osservata aprendo, di fatto, la via per nuove ipotesi di lavoro. Al contempo, ha messo in evidenza la capacità di *T. gamsii* T6085 di utilizzare in maniera esclusiva alcuni substrati, informazione che potrebbe risultare molto utile nel momento in cui, dovendo passare alla fase di formulazione di un agrofarmaco, si volesse porre *T. gamsii* in una condizione di vantaggio (Jona Lasinio et al., 2021).

Visto che la competizione per i nutrienti non sembrava giocare un ruolo preminente, è stata indagata l'induzione di resistenza. A tal fine, in collaborazione con l'Università di Parigi-Saclay, è stata dimostrata, mediante osservazioni al microscopio confocale, la capacità di questo isolato di colonizzare in modo endofitico le radici di giovani piante di frumento. Questa attiva colonizzazione delle radici ha indotto delle risposte di difesa nella pianta, come dimostrato dall'aumento significativo dell'espressione di geni connessi con la resistenza, quali PAL e PR1, permettendo così di aggiungere anche l'induzione di resistenza ai meccanismi d'azione già dimostrati per questo isolato

(Sarrocco et al., 2021). Al momento l'attività di ricerca si sta indirizzando ad approfondire la risposta della pianta, in termini di attivazione delle risposte di difesa, a seguito dell'applicazione di *T. gamsii* T6085 sia sulle radici di giovani piante che su spighe in fioritura di diverse cultivar di frumento.

Poiché l'applicazione di un agrofarmaco a base biologica prevede l'applicazione del microrganismo benefico nella stessa nicchia ecologica dove prospera il patogeno, al fine di meglio comprendere la complessa interazione che si instaura tra questi due organismi in questa fase, è stata condotta un'analisi trascrittomiche volta a individuare i geni differenzialmente espressi da *T. gamsii* T6085 e da *F. graminearum* quando in colture duali (interazione *non-self*) rispetto a quando in presenza di se stessi (interazione *self*), concentrandoci sull'interazione a distanza, vale a dire quando gli apici ifali dei due organismi non erano ancora entrati in contatto. Per poter portare a termine le analisi bioinformatiche risultanti dall'analisi trascrittomiche è stato necessario sequenziare e annotare il genoma sia dell'antagonista (Baroncelli et al., 2016) che del patogeno (Zapparata et al., 2017). L'analisi trascrittomiche ha permesso di delineare due comportamenti opposti del patogeno e dell'antagonista nella condizione *non-self*: mentre il patogeno in presenza dell'antagonista sovra-esprime significativamente oltre 600 geni e ne sotto-esprime meno di 80, *T. gamsii* T6085 mantiene uno stato più "silenzioso" in cui solo circa 20 geni sono sovra-espressi e più di 370 sono sotto-espressi, rispetto alla condizione *self*. Ma la trascrittomiche, si sa, più che risposte certe, fornisce indicazioni sulle strade da seguire per meglio comprendere i fenomeni in atto. Nel nostro caso, *F. graminearum*, quando in presenza dell'antagonista, sovra-esprime geni codificanti per proteine killer, il cui ruolo in altri patogeni, quali ad esempio *Ustilago maydis*, è già stato dimostrato durante l'infezione dell'ospite ma di cui poco si sa nell'interazione fungo-fungo. Sono attualmente in corso studi di espressione volti a valutare il ruolo di queste proteine killer nell'interazione tra *F. graminearum* e *T. gamsii* T6085 in pianta. Sul fronte opposto, *T. gamsii* T6085 risulta sotto-esprimere alcuni geni codificanti per delle chitinasi, quasi a voler evitare il rilascio di molecole segnale a seguito della degradazione della parete del patogeno, molecole che potrebbero far percepire la propria presenza da parte di *F. graminearum*. Infine, in questo *cross-talk*, il ferro sembrerebbe giocare un ruolo importante, essendo sotto-espressi geni del patogeno in cui questo elemento ha un ruolo fondamentale (quali, ad esempio, quelli codificanti per il citocromo P-450), ed essendo, invece, sovra-espressa una ferro-reduttasi da parte di *T. gamsii* T6085.

Ma metaboliti diffusibili non servono solo come mediatori chimici per elicitare risposte in uno o nell'altro dei due microfunghi interagenti, ma possono anche essere direttamente alla base degli effetti benefici che molti isolati

di *Trichoderma* sono in grado di produrre sulle piante. Poiché i terpeni sono metaboliti fortemente coinvolti in tutti questi effetti e i geni che portano alla loro sintesi sono ben poco conosciuti in *Trichoderma*, le più recenti attività di ricerca sono state indirizzate allo studio, mediante un'analisi comparata condotta sui genomi di 21 isolati appartenenti a 17 specie diverse di *Trichoderma*, dei geni coinvolti nella sintesi delle terpene sintasi (TS) e, utilizzando l'isolato *T. gamsii* T6085 come modello, della loro espressione in diverse condizioni di crescita, incluse l'eccesso di salinità, la mancanza di azoto, in presenza di stress ossidativo e quando applicato su frumento (Vicente et al., 2020). Questa indagine sulle TS ha permesso di individuare una tricodiene sintasi, codificata dal gene *tri5*, la cui espressione è significativamente aumentata quando *T. gamsii* T6085 colonizza l'apparato radicale di frumento. Questo gene è molto interessante perché putativamente associato a un cluster che ricorda quello già noto in *Trichoderma brevicompactum* e *T. arundinaceum*, responsabile della sintesi di tricoteceni in queste due specie di *Trichoderma* (ma non prodotto da *T. gamsii*). Le ricerche attualmente in corso sono indirizzate a indagare nel dettaglio le condizioni di espressione del putativo cluster e a isolare l'eventuale prodotto del gene *tri5* che, come altre TS, sembrerebbe svolgere un ruolo nell'interazione tra *T. gamsii* T6085 e le radici di frumento.

Infine, spostandoci nuovamente dalla dimensione del laboratorio a quella del campo, *T. gamsii* T6085 è stato utilizzato come inoculante dei residui colturali e/o della spiga in una prova condotta presso i campi sperimentali del "Centro Enrico Avanzi" dell'Università di Pisa. La sperimentazione, condotta su piante di frumento seminate su sodo, ha confermato una significativa diminuzione dell'incidenza e della severità della malattia e ha consentito di collezionare campioni di paglia e di spighe che sono state sottoposte, in collaborazione con l'Università di Manitoba (Canada), a un'analisi metagenomica volta a valutare l'eventuale impatto di *T. gamsii* T6085 sulle popolazioni batteriche e fungine naturalmente presenti sui campioni prelevati. Le analisi, ancora in corso, forniranno indicazioni importanti circa l'effetto di questo isolato benefico sulle comunità microbiche a seguito di una sua applicazione in campo, informazione molto utile in vista di un potenziale sviluppo di questo isolato come ingrediente di prodotti commerciali per la difesa dalla fusariosi del frumento.

## CONCLUSIONI

Di acqua ne è passata molta sotto i ponti da quando uno dei due Autori andò alla New York State Agricultural Experiment Station di Geneva (USA), oggi

Cornell CALS, per lavorare con Gary Harman sull'impiego di funghi benefici per il controllo di patogeni trasmessi per seme in crucifere (Vannacci e Harman, 1987). Agrofarmaci a base biologica se ne trovano diversi, oggi, sul mercato, ma possiamo ritenere che il loro sviluppo e il loro impiego sia ancora in uno stadio infantile. Le ricerche sul tema, allora considerate poco più che una curiosità, comportano effetti collaterali affascinanti, in quanto consentono di indagare le complesse interazioni, usualmente tritrofiche, tra gli organismi coinvolti, ma da patologi vegetali non possiamo dimenticare che il fine ultimo di queste ricerche è la difesa (sostenibile, finalmente) delle piante. Le ricerche sin qui condotte sul sistema frumento – fusariosi della spiga – *Trichoderma* lasciano molto ben sperare, ma non dobbiamo dimenticare che trasformare un fungo con spiccate attività benefiche in un prodotto che possa essere utilizzato nella pratica agricola è cosa ben complicata che richiede successive fasi di sviluppo, che vanno dalla formulazione alla commercializzazione, e che dovrebbero vedere coinvolte competenze che, normalmente, non sono presenti in istituzioni di ricerca pubbliche. Ma il forte impulso dato dall'Unione Europea allo sviluppo di forme di difesa alternative a quella chimica spinge molti ricercatori, e molte industrie, ad affrontare questa sfida e già si intravedono nuovi obiettivi, che adesso appaiono lontani e complicati, quali quello di definire e impiegare consorzi anziché singoli microrganismi o di sviluppare piante geneticamente adattate a un impiego combinato con microrganismi benefici. Ma una cosa sembra essere certa, indietro non si torna e il ricorso ad agricolture esoteriche potrà soddisfare il desiderio (di pochi) di avere accesso a cibi di nicchia, ma fallirà nel soddisfare la necessità (di molti) di avere semplicemente cibo. Ad oggi, siamo quasi 8 miliardi di persone (ma le persone in sovrappeso sono più di quelle malnutrite) e quest'anno sono stati persi quasi 4 milioni di ettari di terreno, tra desertificazione ed erosione (<https://www.worldometers.info/>) e tutto questo ci deve far pensare. L'agricoltura è, intrinsecamente, in disequilibrio con la natura e sta a noi, con un buon uso della conoscenza, far sì che questo disequilibrio non sia foriero di futuri drammi.

#### RIASSUNTO

La fusariosi della spiga (FHB) è un serio rischio per la sicurezza alimentare a causa delle micotossine che si possono ritrovare nella granella malata. Ad oggi, la difesa del frumento nei confronti di FHB si basa su diverse strategie, nessuna pienamente efficace.

Da più di 10 anni, sono in corso nel nostro laboratorio ricerche sull'isolato *Trichoderma gamsii* T6085 per la difesa dalla fusariosi. T6085 è in grado di ridurre la crescita delle principali specie di *Fusarium* associate al FHB, la loro capacità di produrre micotossine e, applicato sulla spiga, l'incidenza e la severità della malattia in campo. T6085 parassitizza

le ife di *F. graminearum*, compete con il patogeno per molti substrati naturali e induce nel frumento l'espressione di geni per la resistenza.

Indagini trascrittomiche dell'interazione a distanza tra T6085 e *F. graminearum* hanno mostrato che T6085 compete per il ferro, attiva trasportatori di membrana, sotto-esprime alcuni geni codificanti chitinasi e induce l'espressione di geni del patogeno codificanti per proteine killer. T6085 produce una plethora di metaboliti secondari; tra questi, stiamo valutando il ruolo dei terpenoidi nel controllo della fusariosi. In corso è anche un'analisi metagenomica sugli effetti del trattamento di spighe o di residui colturali in campo sulla popolazione naturale di batteri e funghi.

*T. gamsii* T6085 è un valido candidato come principio attivo di agrofarmaci a base biologica rispettosi dell'ambiente e della salute dell'uomo e degli animali.

#### ABSTRACT

*Research response to the 2030 Agenda: use of «Trichoderma gamsii» T6085 for sustainable wheat protection against Fusarium Head Blight.* Fusarium Head Blight (FHB) represents a serious threat to wheat production worldwide, due to mycotoxins accumulation in diseased kernels. Different strategies are to date deployed to control of FHB, anyway none of them are fully effective to protect wheat. For more than 10 years, research has been underway in our lab to develop an isolate of *Trichoderma*, *T. gamsii* T6085, as an active ingredient of a biopesticide to control FHB. T6085 interferes with FHB pathogens growth, significantly reduces their ability to produce mycotoxins and, when applied to spikes in the field, significantly reduces incidence and severity of the disease. T6085 parasitize *F. graminearum* hyphae, successfully competes with the pathogen for many natural substrates and induces the expression of host resistance genes. A transcriptomic analysis of at distance interaction between T6085 and *F. graminearum* suggests that T6085 competes for iron, induces a stronger expression of genes coding for killer protein in the pathogen, activate membrane transporters and downregulates chitinase coding genes. T6085 produces a plethora of secondary metabolites; among these, the role of terpenoids in the control of FHB is being evaluated. A metagenomic analysis on the effects of the treatment of spikes or of crop residues in the field on the natural bacterial and fungal population is also underway.

*T. gamsii* T6085 is a valid candidate as an active ingredient in bio-based crop protection products as a sustainable alternative to the use of chemicals.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ABBAY J.A., PERCIVAL D., ABBEY L., ASIEDU S.K., PRITHIVIRAJ B., SCHILDER A. (2019): *Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (Botrytis cinerea) – prospects and challenges*, «Biocontrol. Sci. Technol.», 29, pp. 207-228.
- BARONCELLI R., ZAPPARATA A., PIAGGESCHI G., SARROCCO S., VANNACCI G. (2016): *Draft whole-genome sequence of Trichoderma gamsii T6085, a promising biocontrol agent of Fusarium head blight on wheat*, «Genome Announcements», 4 (1):e01747-15.
- DESJARDINS A.E., PROCTOR R.H. (2007): *Molecular biology of Fusarium mycotoxins*, «Int. J. Food Microbiol.», 119, pp. 47-50.

- EUROPEAN COMMISSION (2020): *Farm to Fork Strategy – for a fair, healthy and environmentally-friendly food system*, <[https://ec.europa.eu/food/farm2fork\\_en](https://ec.europa.eu/food/farm2fork_en)>.
- FIGUEROA M., HAMMOND-KOSACK K.E., SOLOMON P.S. (2018): *A review of wheat diseases-a field perspective*, «Mol. Plant Pathol.», 19, pp. 1523-1536.
- FRAVEL D.R. (2005): *Commercialization and implementation of biocontrol*, «Ann. Rev. Phytopath.», 43, pp. 337-359.
- JENSEN D.F., KARLSSON M., SARROCCO S., VANNACCI G. (2016): *Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance*, in *Biotechnology for Plant Disease Control*, a cura di Collinge, D.B., Wiley, New York and London, pp. 341-363.
- JONA LASINIO G., POLLICE A., PAPPALLETTERE L., VANNACCI G., SARROCCO S. (2021): *A new statistical protocol to describe differences among nutrient utilization patterns of Fusarium spp. and Trichoderma gamsii*, «Plant Pathology», <<https://doi.org/10.1111/ppa.13362>>.
- KUBICEK C.P., STEINDORFF A.S., CHENTHAMARA K., MANGANIELLO G., HENRISSAT B., ZHANG J., CAI F., KOPCHINSKIY A.G., KUBICEK E.M., KUO A., BARONCELLI R., SARROCCO S., FERREIRA NORONHA E., VANNACCI G., SHEN Q., GRIGORIEV I.V., DRUZHININA I.S. (2019): *Evolution and comparative genomics of the most common Trichoderma species*, «BMC Gen.», 20, p. 485.
- LOGRIECO A.F., MILLER J.D., ESKOLA M., KRKA R., AYALEW A., BANDYOPADHYAY R., BATTILANI P., BHATNAGAR D., CHULZE S., DE SAEGER S., LI P., PERRONE G., POAPOLATHEP A., RAHAYU E.S., SHEPHARD G.S., STEPMAN F., ZHANG H., LESLIE J.F. (2018): *The Mycotox Charter: Increasing the Awareness for Research and Harmonized Regulations to Control and Reduce Mycotoxins Worldwide*, «Toxins», 10, p. 149.
- LÓPEZ-BUCIO J., PELAGIO-FLORES R., HERRERA-ESTRELLA A. (2015): *Trichoderma as bio-stimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus*, «Sci. Hortic.», 196, pp. 109-123.
- LORITO M., WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E. (2010): *Translational research on Trichoderma: from 'omics' to the field*, «Ann. Rev. Phytopath.», 48, pp. 395-417.
- MATARESE F., SARROCCO S., GRUBER S., SEIDL-SEIBOTH V., VANNACCI G. (2012): *Bio-control of Fusarium Head Blight: interactions between Trichoderma and mycotoxigenic Fusarium*, «Microbiology», 158, pp. 98-106.
- PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L. (1995): *Fusarium ear blight (scab) in small grains – a review*, «Plant Path.», 44, pp. 207-238.
- SARROCCO S., ESTEBAN P., VICENTE I., BERNARDI R., PLAINCHAMP T., DOMENICHINI S., VICENTE MUNOZ I., PUNTONI G., BARONCELLI R., VANNACCI G., DUFRESNE M. (2020a): *Straw competition and wheat root endophytism of Trichoderma gamsii T6085 as useful traits in the biocontrol of Fusarium Head Blight*, «Phytopathology», <<https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0441-R>>.
- SARROCCO S., HERRERA-ESTRELLA A. AND COLLINGE D.B. (2020b): *Editorial: Plant Disease Management in the Post-genomic Era: From Functional Genomics to Genome Editing*, «Frontiers in Microbiology», 11, pp. 107.
- SARROCCO S., MATARESE F., MONCINI L., PACHETTI G., RITIENI A., MORETTI A., VANNACCI G. (2013): *Biocontrol of Fusarium head blight by spike application of Trichoderma gamsii*, «J. Plant Pathology», 51, pp. 19-27.
- SARROCCO S., MATARESE F., MORETTI A., HAIDUKOWSKI M., VANNACCI G. (2012): *DON on wheat crop residues: effects on mycobiota as a source of potential antagonists of Fusarium culmorum*, «Phytopathologia Mediterranea», 51, pp. 225-235.
- SARROCCO S., MAURO A., BATTILANI, P. (2019a): *Use of Competitive Filamentous Fungi as*

- an Alternative Approach for Mycotoxin Risk Reduction in Staple Cereals: State of Art and Future Perspectives*, «Toxins», 11, pp. 701.
- SARROCCO S., VALENTI F., MANFREDINI S., ESTEBAN P., BERNARDI R., PUNTONI G., BARONCELLI R., HAIDUKOWSKI M., MORETTI A., VANNACCI G. (2019b): *Is exploitation competition involved in a multitrophic strategy for the biocontrol of Fusarium Head Blight?*, «Phytopathology», 109, pp. 560-570.
- SARROCCO S., VANNACCI G. (2018): *Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: a review*, «Crop Protection», 110, pp. 160-170.
- SAVARY S., FICKE A., AUBERTOT J.N., HOLLIER C. (2012): *Crop Losses Due to Diseases and Their Implications for Global Food Production Losses and Food Security*, «Food Security», pp. 3-21. DOI 10.1007/s12571-012-0200-5
- UNITED NATIONS (2015): *Transforming our world: the 2030 Agenda for sustainable development*, <<https://sdgs.un.org/>>.
- VANNACCI G., HARMAN G.E. (1987): *Biocontrol of seed-borne Alternaria raphani and A. brassicicola*, «Can. J. Microbiol.», 33, pp. 850-856.
- VICENTE I., BARONCELLI R., MORÁN-DIEZ M.E., BERNARDI R., PUNTONI G., HERMOSA R., MONTE E., VANNACCI G., SARROCCO S. (2020): *Combined comparative genomics and molecular biology approaches provide insights into the terpene synthases inventory in Trichoderma*, «Microorganisms», 8 (10), p. 1603.
- VICENTE I., SARROCCO S., MAFATTI L., BARONCELLI R., VANNACCI G. (2019): *CRI-SPR-Cas for fungal genome editing: a new tool for the management of plant diseases*, «Front. Plant Sci.», 10, n. 135.
- VITERBO A., INBAR J., HADAR Y., CHET I. (2007): *Plant disease biocontrol and induced resistance via fungal mycoparasites*, in *Environmental and Microbial Relationships, The Mycota*, a cura di Kubicek C., Druzhinina I., Springer, Berlin/Heidelberg, Volume 4.
- ZAPPARATA A., BARONCELLI R., BRANDSTROM DURLING M., KUBICEK C.P., KARLSSON M., VANNACCI G., SARROCCO S. (2021): *Fungal cross-talk: an integrated approach to study distance communication*, «Fungal Genetics & Biology», 148, 103518, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103518>.
- ZAPPARATA A., DA LIO D., SOMMA S., VICENTE I., MAFATTI L., VANNACCI G., MORETTI A., BARONCELLI R., SARROCCO S. (2017): *Genome sequence of Fusarium graminearum ITEM 124 (ATCC 56091), a mycotoxigenic plant pathogen*, «Genome Announcements», 5(45): e01209-17.