

Nuovi orientamenti di ricerca e sviluppo con funghi antagonisti alla luce del “Piano Strategico Nazionale per lo Sviluppo del Sistema Biologico”

Sheridan L. Woo*,** - Roberta Marra*** - Francesco Vinale**** - Nadia Lombardi** - Matteo Lorito****,**

* Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Napoli Federico II- Napoli

** Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP) – S.S. Portici (NA)

*** Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II- Portici (NA)

Introduzione

L’ottenimento di produzioni agricole più sicure e rispettose dell’ambiente rappresenta una delle principali sfide del XXI secolo. L’implementazione della Direttiva Europea n. 128/2009 sull’uso sostenibile dei prodotti fitosanitari, recepita in Italia con il D.L. n. 150 del 14 agosto 2012, ha lo scopo di ridurre i rischi per la salute umana e per l’ambiente derivanti dalla gestione delle produzioni agricole, promuovendo l’adozione di tecniche di lotta biologica e integrata ed un basso utilizzo di agrofarmaci di sintesi.

Nel 2015 il Ministero delle Politiche Agricole, Ambientali e Forestali (MIPAAF) ha promulgato il “Piano Strategico Nazionale per lo Sviluppo del Sistema Biologico”, con il quale intende rafforzare un settore che è diventato importante per la produzione agricola italiana ed è in continua crescita. Le indicazioni strategiche mirano ad affrontare le problematiche dell’agricoltura biologica nell’attuale contesto economico, politico-istituzionale, sociale ed ambientale, promuovendo la ricerca scientifica e l’innovazione tecnologica. Gli obiettivi del Piano Strategico non riguardano solo la redditività aziendale e l’occupazione in agricoltura, ma anche il rafforzamento di interventi per contrastare le avversità ambientali, la riduzione dell’inquinamento del suolo e delle risorse idriche, e la tutela della salute di produttori e consumatori.

L’Azione 10 del Piano Strategico -“Piano per la ricerca e l’innovazione in agricoltura biologica”, intende sostenere

e promuovere la ricerca nel settore delle produzioni biologiche, attraverso un approccio multidisciplinare che potrà garantire l’innovazione dei sistemi produttivi. Tra le tematiche prioritarie vi sono: il rafforzamento delle filiere di produzione vegetale, il miglioramento genetico di specie ortofrutticole e cerealicole, lo sviluppo di nuovi sistemi colturali capaci di adattarsi alle avversità ambientali in pieno campo, il rafforzamento e lo sviluppo della produzione in ambiente protetto, la promozione della zootecnia biologica, la promozione di sistemi agro-zoo-forestali che comprendono il riciclaggio della sostanza organica e dei nutrienti, l’innovazione dei sistemi di trasformazione e commercializzazione, nonché la riduzione degli input chimici per la gestione delle produzioni. Il Piano prevede che per ottenere una difesa fitosanitaria efficace è necessario adottare misure di prevenzione basate su pratiche agronomiche, impiegare sostanze attive a basso rischio o utilizzare strategie di lotta biologica per contrastare le avversità.

In passato, i metodi impiegati per la difesa delle colture in agricoltura biologica erano limitati all’utilizzo di rame, fosfati, zolfo e di agenti di lotta biologica, quali insetti predatori o parassitoidi, batteri e alcune specie di funghi antagonisti attraverso applicazioni mirate al contenimento di specifici patogeni. In patologia vegetale si definisce lotta biologica l’uso di agenti microbici (Microbial BioControl Agents o MBCAs) o di sostanze naturali di varia origine

Tabella 1 - Specie e ceppi di *Trichoderma* presenti nell’elenco dei Prodotti per la Protezione delle Piante (PPP). La lista include isolati attivi contro patogeni vegetali approvati in base al Regolamento (EC) N. 1107/2009, alla data del 18 febbraio 2017 (http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/authorisation_of_ppp_en).

Table 1 - Species and strains of *Trichoderma* included in Plant Protection Products (PPP) list, active against plant pathogens and approved by the EU Regulation No. 1107/2009, as noted February 18, 2017 (http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/authorisation_of_ppp_en).

Sostanze	Stato attuale in base al Reg. (EC) No 1107/2009	Data di Approvazione	Data di Scadenza	Riferimenti legislativi
<i>Trichoderma asperellum</i> (ex- <i>T. harzianum</i>) ceppi ICC012, T25 e TV1	Approvato	5/1/2009	4/30/2019	2008/113, Reg. (EU) No 540/2011
<i>Trichoderma asperellum</i> (ceppo T34)	Approvato	6/1/2013	5/31/2023	Reg. (EU) No 1238/2012 (Dossier completo 2010/132/EU)
<i>Trichoderma atroviride</i> (ex- <i>T. harzianum</i>) ceppi IMI 206040 e T11	Approvato	5/1/2009	4/30/2019	2008/113, Reg. (EU) No 540/2011
<i>Trichoderma atroviride</i> ceppo I-1237	Approvato	6/1/2013	5/31/2023	Reg. (EU) No 17/2013 Dossier completo 08/565/EC)
<i>Trichoderma atroviride</i> ceppo SC1	Approvato	7/6/2016	7/6/2031	Reg. (EU) 2016/951, Reg. (EU) No 540/2011
<i>Trichoderma gamsii</i> (ex- <i>T. viride</i>) ceppo ICC080	Approvato	5/1/2009	4/30/2019	2008/113, Reg. (EU) No 540/2011
<i>Trichoderma harzianum</i> ceppi T-22 e ITEM 908	Approvato	5/1/2009	4/30/2019	2008/113, Reg. (EU) No 540/2011
<i>Trichoderma polysporum</i> ceppo IMI 206039	Approvato	5/1/2009	4/30/2019	2008/113, Reg. (EU) No 540/2011

in grado di sopprimere e/o inibire gli agenti fitopatogeni. L'isolamento, la caratterizzazione e l'utilizzo diretto di MBCAs antagonisti per limitare i danni causati dalle fitopatie ha posto le basi del contenimento biologico classico (Baker e Cook, 1974). Tra gli MBCAs più utilizzati nella lotta biologica contro i patogeni, sia in pieno campo, sia in ambiente protetto, vi sono i funghi antagonisti che appartengono al genere *Trichoderma*, approvati come fungicidi nella lista dei "Plant Protection Products" in base al Regolamento (EC) N. 1107/2009 (Tabella 1). L'uso di prodotti a base di *Trichoderma* spp. è, inoltre, consentito nell'agricoltura biologica.

Antagonisti dei fitopatogeni

Trichoderma spp. sono microrganismi ubiquitari dotati di una elevata adattabilità a diverse condizioni climatiche ed ambientali. La loro capacità di parassitizzare altri funghi terricoli è nota da oltre 70 anni (Weindling, 1932), ed è stata diffusamente sfruttata per contrastare funghi patogeni, oomiceti e persino nematodi (Monte, 2001). Le modalità di azione attraverso cui *Trichoderma* è in grado di contenere i funghi bersaglio rientrano nei classici meccanismi di lotta biologica: parassitismo diretto o micoparassitismo, secrezione di enzimi litici, antibiosi, e competizione per le sostanze nutritive o per le nicchie ecologiche (Benitez *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2012, 2013; Lorito *et al.*, 2010; Vinale *et al.*, 2008). Questi meccanismi non si escludono a vicenda, ma la capacità di lotta biologica osservata in un ceppo può essere dovuta al sinergismo tra differenti modalità di azione che contribuiscono a diversi livelli a limitare l'insorgenza di fitopatie (Howell, 2003).

Gli effetti diretti che l'azione di *Trichoderma* provoca sui funghi patogeni sono complessi, e di notevole importanza per la difesa della produzioni agricole. Fino a poco tempo fa, l'antagonismo diretto sul patogeno da parte di *Trichoderma* spp. era considerato alla base degli effetti benefici riscontrati sulle colture, dove esso era responsabile indirettamente anche del miglioramento nella crescita e nello sviluppo della pianta. Infatti, la selezione di nuovi MBCAs per i prodotti commerciali è stata per lungo tempo indirizzata alla ricerca di specie e ceppi con elevata capacità antagonista. La ricerca scientifica negli ultimi 20 anni ha generato una notevole mole di conoscenze sui modi d'azione di questi MBCAs, individuando numerosi geni che codificano per proteine, metaboliti ed enzimi litici che degradano le pareti cellulari fungine e/o hanno attività antimicrobica coinvolti nell'antagonismo (Howell, 2003, Lorito *et al.*, 2010).

E' ormai comprovato che i microbi che per molti versi agiscono come dei simbiotici, come i rizobatteri e lo stesso *Trichoderma*, esercitano effetti positivi indiretti sulla pianta, tra cui: il miglioramento della germinazione dei semi e della sopravvivenza del materiale propagativo al trapianto; la promozione della crescita delle piante, del sistema radicale o la resa produttiva finale; la stimolazione della risposta di difesa della pianta che induce la resistenza sistemica indotta (ISR) o la resistenza sistemica acquisita (SAR) contro l'attacco dei fitopatogeni; l'attivazione di effettori molecolari/elicitatori (ad es. enzimi, proteine, metaboliti secondari) utili per la sopravvivenza; l'incremento della resistenza agli stress abiotici quali mancanza/eccesso idrico, salinità, o temperature estreme; o l'aumento della solubilizzazione, disponibilità e assimilazione di macro- e micro-nutrienti ~~che migliorano la qualità nutrizionale~~

(Druzhinina *et al.*, 2011; Harman *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2012; Lorito *et al.*, 2010).

Le ultime ricerche rivelano che alcuni ceppi di *Trichoderma* hanno sviluppato caratteri genetici che li rendono particolarmente adatti all'interazione con la pianta piuttosto che all'antagonismo-micoparassitismo (Harman *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2010; Seidl *et al.*, 2006; Shores *et al.*, 2010; Studholme *et al.*, 2013; Vinale *et al.*, 2008). Gli effetti ~~riguardare~~ l'attivazione del sistema di difesa contro, o di tolleranza alle, avversità sia biotiche sia abiotiche, con meccanismi coinvolti che si stanno rivelando essere interconnessi e sovrapponibili. Recentemente, numerosi studi hanno approfondito questi nuovi processi di interazione multi-componente fungo-pianta (Vd paragrafo successivo), dove la prossima sfida sarà quella di determinare in che modo poter utilizzare queste conoscenze per migliorare la protezione e la produttività delle colture (Hermosa *et al.*, 2013; Lorito *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012).

Induzione della resistenza in pianta

Trichoderma spp., oltre ad essere largamente utilizzati in agricoltura come agenti che abbassano il livello di inoculo dei patogeni, riescono ad interagire con le piante, in particolare a livello della rizosfera, e sono considerati sempre più utili ad una gestione sostenibile delle produzioni (Berg *et al.*, 2009). Numerose specie si sono dimostrate in grado di stimolare i meccanismi di difesa della pianta contro i patogeni grazie ad un dialogo molecolare ~~incrociato~~ che coinvolge i metaboliti bioattivi del MBCA (Harman *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2012; Lorito e Woo, 2015; Lorito *et al.*, 2010; Shores *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2006). L'induzione di meccanismi di resistenza da parte di diversi ceppi di *Trichoderma* modifica il trascrittoma ed il proteoma delle piante (Shores *et al.*, 2010) e determina, inoltre, la produzione di metaboliti vegetali coinvolti nelle risposte di difesa, come enzimi implicati nelle biosintesi di fitoalessine o nella risposta allo stress ossidativo, o la produzione di proteine correlate alla patogenesi (Pathogenesis Related proteins - PR proteins).

La prima chiara dimostrazione di resistenza indotta da parte di *Trichoderma* è stata pubblicata da Bigirimana *et al.* (1997). Gli autori hanno dimostrato che il trattamento al suolo con *T. harzianum* ceppo T-39 rendeva le piante di fagiolo resistenti alle malattie causate dai patogeni fungini *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum lindemuthianum*, nonostante il ceppo T-39 fosse presente solo sulle radici e non sulle foglie. Studi simili sono stati poi effettuati su una vasta gamma di specie vegetali, sia monocotiledoni che dicotiledoni, e con diverse specie e ceppi di *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004).

L'associazione tra pianta e microrganismo implica un riconoscimento molecolare ~~tra le due componenti~~ ~~attraverso~~ una rete di segnali che include il coinvolgimento di acido jasmonico (JA) ed etilene (ET). Questi composti intervengono sia nella resistenza sistemica acquisita (SAR) o indotta (ISR) contro un patogeno, sia nella risposta all'agente di lotta biologica (Hermosa *et al.*, 2012). Infatti alcuni ceppi di *Trichoderma* possono influenzare positivamente la resistenza di base stimolando la pianta con un pattern di composti bioattivi noti come MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns). Questi includono molecole a basso peso molecolare, idrofobine

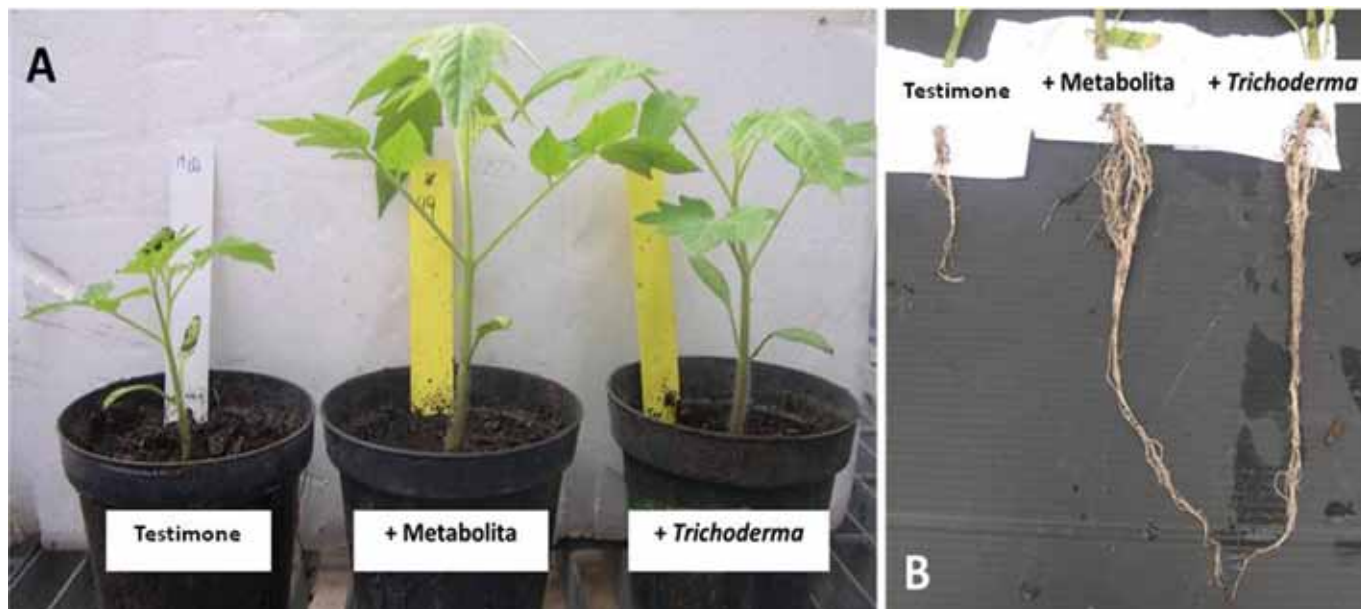


Figura 1 - Promozione della crescita di piante di pomodoro trattate con spore di *Trichoderma* o un suo metabolita secondario rispetto al controllo (trattato con acqua). Effetti sulla parte epigea (A) e ipogea (B).

Figure 1 - Growth promotion of tomato plants treated with *Trichoderma* spores or a *Trichoderma* secondary metabolite, compared to a water control. Effects on aboveground (A) and belowground (B) parts.

(Djonovic *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2008), proteine simili alle espansine (Brotman *et al.*, 2008), metaboliti secondari (ne sono noti circa 300) ed enzimi esocellulari dotati di attività antimicrobica diretta (Djonovic *et al.*, 2007; Lorito *et al.*, 2010; Ruocco *et al.*, 2015; Seidl *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2006). Inoltre, alcune proteine di *Trichoderma* coinvolte nel processo di colonizzazione delle radici possono anche fungere da MAMPs: la proteina swollenin TasSwo prodotta da *T. reesei* ha stimolato le risposte di difesa nelle radici e foglie di cetriolo e favorito la protezione locale contro funghi e batteri (Brotman *et al.*, 2008); l'endopoligalatturonasi ThPG1 ha generato in *Arabidopsis* una risposta simile alla ISR innescata da rizobatteri benefici (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR) (Morán-Diez *et al.*, 2009).

Promozione della crescita delle piante e incremento della tolleranza agli stress

Numerosi lavori hanno dimostrato la capacità di *Trichoderma* spp. di promuovere la crescita di diverse colture (mais, pomodoro, peperone, cetriolo, lattuga, ecc.) associata ad un incremento dell'apparato radicale, del peso della pianta e della superficie fogliare, con conseguente aumento delle rese di produzione (Fig. 1; Baker *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 1986; Harman, 2000). Anche la qualità di alcuni prodotti sembra essere migliorata a seguito dei trattamenti con questi funghi. Recentemente è stato osservato un incremento del contenuto di polifenoli totali e della capacità antiossidante nelle uve trattate in campo con ceppi o metaboliti di *Trichoderma* (Pascale *et al.*, 2017).

Le intrinseche capacità opportunistiche di alcuni ceppi di *Trichoderma* fanno sì che questi funghi filamentosi possano vivere sia come componenti della microflora del suolo e della rizosfera, sia come endofiti. La presenza nella rizosfera di nutrienti, sotto forma di essudati radicali, nonché di potenziali “prede” microbiche, può facilitare la colonizzazione dei tessuti da parte dei *Trichoderma* e l'instaurarsi di una interazione benefica (Druzhina *et al.*, 2011).

Alcuni ceppi, descritti come “*rhizosphere competent*” e utilizzati per lo sviluppo di bioformulati commerciali, causano infezioni asintomatiche delle radici che interessano solo gli strati cellulari più esterni (Yedidia *et al.*, 1999). È interessante notare come gli effetti benefici che i *Trichoderma* utilizzati in agricoltura come bioagrofarmaci o biofertilizzanti esercitano sulle piante risultino maggiori quanto più le condizioni di coltivazione sono lontane da quelle ideali. Infatti, aumenti significativi delle rese di produzione sono stati osservati quando le piante erano soggette a condizioni di stress o che riducevano la naturale soppressività del suolo (Lorito *et al.*, 2010).

Gli effetti benefici di *Trichoderma* sulla tolleranza agli stress abiotici sono noti (Bae *et al.*, 2009; Donoso *et al.*, 2008), sebbene i relativi meccanismi sono ancora largamente sconosciuti. Mastouri *et al.* (2010) hanno dimostrato che il trattamento effettuato su pomodoro con *T. harzianum* determina un'accelerazione della germinazione dei semi, incrementa il vigore delle piantine e migliora la tolleranza a stress abiotici di varia natura attraverso un processo che protegge la pianta dai danni ossidativi. Un meccanismo simile è stato osservato anche con i rizobatteri (PGPR), per i quali l'aumento della tolleranza verso stress abiotici è stato correlato ad una riduzione dei danni provocati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) accumulati nelle piante (Mastouri *et al.*, 2010).

La promozione della crescita e la tolleranza agli stress abiotici sono state correlate alla produzione di acido 3-indolacetico (IAA), che promuove la crescita vegetale e lo sviluppo delle radici laterali, e di giberelline attraverso il controllo dei repressori proteici DELLA. In *Trichoderma*, l'attività della deaminase dell'acido 1-amminociclopropano-1-carbossilico (ACC) riduce la disponibilità di ACC necessaria per la biosintesi di ET (Fig. 2). La diminuita produzione di ET promuove la crescita della pianta attraverso la degradazione delle proteine DELLA, con conseguente aumento di produzione delle giberelline, e può, inoltre, influenzare le risposte di difesa della pianta regolate da JA

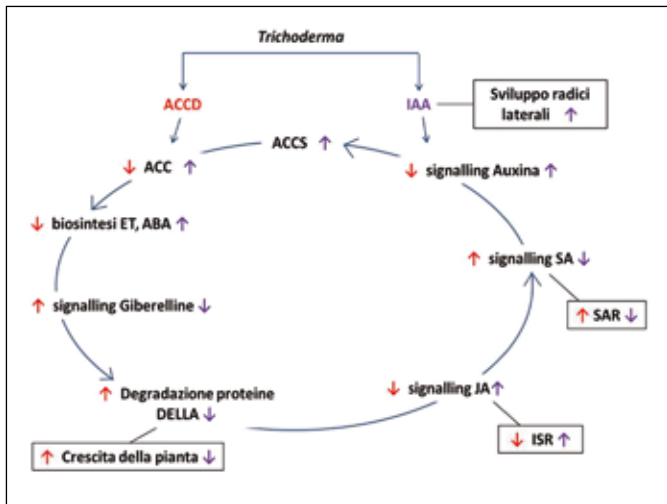


Figura 2 - Modello di interazione molecolare pianta-*Trichoderma* (adattata da Hermosa *et al.*, 2012). Gli effetti della produzione di ACCD (ACC deaminase) e dell'acido 3-indolacetico (IAA) da parte di *Trichoderma* sono contrassegnati, rispettivamente, con frecce rosse e viola. Le frecce rivolte verso l'alto e verso il basso corrispondono, rispettivamente, a livelli/risposte incrementati e ridotti dei fitormoni che controllano la crescita delle piante e le risposte immunitarie. ABA: acido abscissico; ACC: acido 1-amminociclopropano-1-carbossilico; ACCS: ACC sintase; ET: etilene; ISR: resistenza sistemica indotta; SAR: resistenza sistemica acquisita; JA: acido jasmonico; SA: acido salicilico.

Figure 2 - *Trichoderma-plant cross-talk model* (adapted from Hermosa *et al.*, 2012). The effects of *Trichoderma* on ACC deaminase (ACCD) and indole-3-acetic acid (IAA) production are indicated by red and purple arrows, respectively. Up and down pointing arrows correspond to increased or decreased levels/responses, respectively, of phytohormones that control plant growth and immune responses. ABA, abscisic acid; ACC, 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid; ACCS, ACC synthase; ET, ethylene; ISR, induced systemic resistance; JA, jasmonic acid; SA, salicylic acid; SAR, systemic acquired resistance.

e SA. In *Trichoderma* la produzione di IAA contribuisce alla biosintesi di ET indotta da una fonte di auxina esogena, che a sua volta stimola la biosintesi di acido abscissico (Hermosa *et al.*, 2012, 2013).

Biodisponibilità e assimilazione di nutrienti in pianta

I microrganismi che albergano nel suolo influenzano la solubilità, quindi la disponibilità, dei nutrienti minerali in prossimità delle radici (Marschner, 1995), e sono in grado di modificare il pH del suolo e l'equilibrio di numerose reazioni chimiche e biochimiche (de Santiago *et al.*, 2013). In letteratura sono riportate diverse evidenze in merito alla capacità di *Trichoderma* spp. di incrementare la biodisponibilità di elementi insolubili o scarsamente solubili, come fosforo, ferro, zinco, rame e manganese (Yedidia *et al.*, 2001). Effetti benefici in termini di nutrimento minerale si sono avuti a seguito dell'inoculo di alcune specie di *Trichoderma* in piante di grano e lupino (de Santiago *et al.*, 2009, 2011). L'effetto sembra legato al rilascio di siderofori, la cui azione dovrebbe contrastare la scarsa biodisponibilità per la pianta dei minerali ferrosi presenti nel suolo, in particolare in terreni poco acidi (Kraemer *et al.*, 2006; Lemanceau *et al.*, 2009). Altomare *et al.* (1999) hanno dimostrato la capacità del ceppo T22 di *T. harzianum* di solubilizzare fosfati e composti minerali scarsamente solubili (tra cui Fe_2O_3 , MnO_2 , Zn) attraverso meccanismi di chelazione e riduzione, coinvolti anche nei processi di lotta biologica degli agenti fitopatogeni e, con

buona probabilità, nella promozione della crescita delle piante.

Ulteriori vantaggi per la pianta derivanti dall'interazione stabilita con *Trichoderma* sono rappresentati da un miglioramento dei meccanismi di riduzione e assimilazione dell'azoto, e da una ridotta espressione di geni correlati allo stress o all'accumulo di metaboliti tossici prodotti dalla pianta in risposta all'attacco del patogeno (Shoresh *et al.*, 2010). Tucci e collaboratori (2011) hanno mostrato che sia le caratteristiche genetiche della pianta, sia quelle del ceppo utilizzato, influenzano in maniera determinante l'esito dell'interazione.

Il ruolo dei metaboliti secondari

Tra i composti naturali di origine microbica che possono avere degli effetti benefici nelle produzioni agricole vi sono i metaboliti secondari (SMs), ovvero un gruppo eterogeneo di sostanze naturali (in generale con un peso molecolare inferiore ai 3000 daltoni), aventi un ruolo fondamentale nei processi di competizione, simbiosi e trasporto dei metalli. Gli antibiotici sono inclusi in questo gruppo e rappresentano molecole in grado di inibire la crescita di alcuni microrganismi (Demain e Fang, 2000). *Trichoderma* spp. sono noti produttori di SMs dotati di diverse attività biologiche (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991; Ghisalberti, 2002; Reino *et al.*, 2008; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Vinale *et al.*, 2014 – Fig. 3). In alcuni casi, la produzione di antibiotici è stata correlata con le capacità di contenimento e la loro applicazione *in vitro* ha mostrato effetti sui patogeni simili a quelli ottenuti utilizzando l'agente di lotta biologica vivo (Vinale *et al.*, 2008).

La produzione di SMs in *Trichoderma* è specie- e ceppo-specifica e varia in funzione dell'equilibrio tra la biosintesi (eventualmente indotta) ed il livello di biotrasformazione o degradazione da parte di altre specie microbiche che

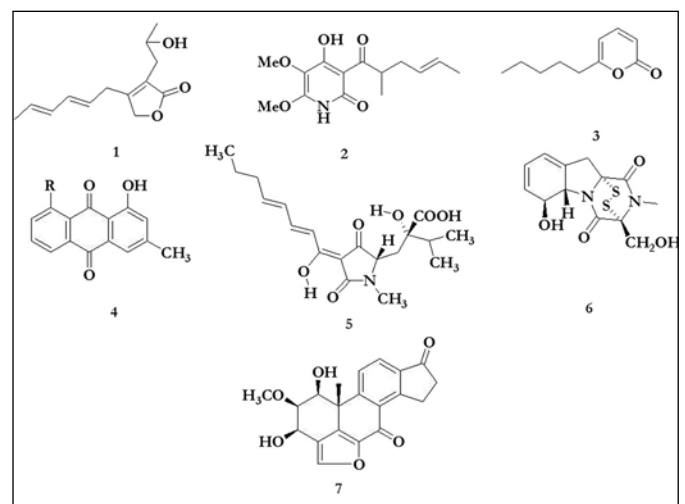


Figura 3. Alcuni metaboliti secondari prodotti da *Trichoderma* spp. dotati di capacità biologiche rilevanti per lo sviluppo di nuovi bio-formulati. 1: harzianolide; 2: harzianopiridone; 3: 6-pentil- α -pirone; 4: 1,8-diidrossi-3-metil-antraquinone; 5: acido harzianico; 6: gliotossina; 7: viridiolo.

Figure 3. Some secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. having biological activities relevant for the development of novel bio-formulations. 1: harzianolide; 2: harzianopyridone; 3: 6-pentyl- α -pyrone; 4: 1,8-dihydroxy-3-methyl-antraquinone; 5: harzianic acid; 6: gliotoxin; 7: viridiol.

partecipano all'interazione (Vinale *et al.*, 2009). *Trichoderma* è in grado non solo di produrre composti tossici con una attività antimicrobica diretta contro i patogeni, ma anche di rilasciare principi attivi in grado di stimolare le piante ad attivare e produrre i propri metaboliti coinvolti della difesa (Vinale *et al.*, 2012). Numerosi studi hanno dimostrato che vari cambiamenti metabolici avvengono nella radice durante la colonizzazione da parte di *Trichoderma*, coinvolgendo ad esempio proteine correlate alla patogenesi (PR-proteins) ~~che inducono la resistenza in pianta~~ ed enzimi di difesa, tra cui varie perossidasi, chitinasi, beta-1,3-glucanasi e lipossigenasi (Hanson e Howell, 2004; Harman, 2000; Howell, 2003). Inoltre, gli stessi metaboliti secondari di *Trichoderma* che attivano l'espressione di geni coinvolti nella difesa della pianta, sono in grado di promuoverne la crescita sia della parte aerea sia dell'apparato radicale aumentando la disponibilità di nutrienti (Vinale *et al.*, 2012). Alcuni di questi composti vengono prodotti in condizioni di crescita standard in laboratorio, mentre per altri è necessario utilizzare tecnologie di purificazione applicate direttamente a sistemi che riproducono le interazioni di *Trichoderma* con altri microrganismi (co-culture microbiche) e/o con le piante (Mukherjee *et al.*, 2012, 2013). Questo ha consentito di caratterizzare sostanze in grado di modificare l'espressoma, cioè l'intero set di geni espressi, della pianta e/o il microbioma, ovvero l'insieme delle specie microbiche e del loro patrimonio genetico, della rizosfera. Inoltre, l'isolamento e l'applicazione in formulati commerciali di molecole bioattive che modificano sostanzialmente, in senso positivo, il metaboloma vegetale, inteso come l'insieme di tutti i metaboliti di una pianta prodotti in una determinata condizione, può contribuire a superare alcune criticità ~~tipiche dei~~ formulati a base di microrganismi vivi. Queste ultime possono riguardare la ~~conservazione~~ o shelf life del prodotto, la colonizzazione di nicchie ecologiche "difficili", il mantenimento di adeguati livelli di attività in presenza di avversità ambientali, la perdita di efficacia dovuta ad incompatibilità con altre pratiche agricole, ecc.

Conclusioni

L'utilizzo di microrganismi antagonisti rappresenta un'efficace strategia non solo per ridurre la dipendenza dall'utilizzo di prodotti chimici di sintesi tipica della difesa fitosanitaria "convenzionale", ma anche per rendere ancora più sostenibili e a basso impatto le produzioni in regime di biologico.

Da i primi studi condotti nel secolo scorso su *Trichoderma* come agente di lotta biologica, l'uso di questo microrganismo si è evoluto al punto che esso è oggi un componente importante in più di 250 prodotti applicati a livello globale in agricoltura (Woo *et al.*, 2014). La presenza di questo fungo nel mercato dei bioformulati è cresciuta in modo esponenziale negli ultimi 5 anni, trovando larga applicazione come agro farmaco biologico, bio-stimolante della crescita delle piante e della resistenza, bio-fertilizzante e bio-decompositore. Infatti, gli studi scientifici negli ultimi anni stanno indagando su nuove potenziali applicazioni ad ampio spettro su colture e ambienti produttivi. Ad esempio, le strategie di ricerca e sviluppo più recenti puntano ad utilizzare *Trichoderma* per potenziare consorzi microbici multispecie piuttosto che applicare ceppi singoli seppur altamente selezionati. Queste miscele, se costruite in base ai dati disponibili sulle caratteristiche genetiche, fisiologiche

e metaboliche dei ceppi utilizzati, possono consentire di realizzare bioformulati dotati della necessaria versatilità ed affidabilità. Ovviamente, *Trichoderma*, con le sue capacità di adattarsi all'ambiente e alle fonti nutritive disponibili, di contrastare i patogeni, di allertare i sistemi di difesa della pianta, di promuovere sviluppo e resa delle colture, rappresenta una componente importante di questa nuova generazione di prodotti multifunzionali e ~~quindi~~ sempre più utili per le moderne produzioni agricole.

Riassunto

La diffusione delle tecniche di lotta biologica in agricoltura è in crescita, dove esse rappresentano un'alternativa o una seria integrazione alla lotta chimica per la protezione delle colture. Tra i metodi biologici implementati con maggior successo vi è l'utilizzo di funghi del genere *Trichoderma*, capaci di interagire sia con i patogeni, contrastandone la crescita e lo sviluppo, sia con le piante, apportando benefici in termini di promozione della crescita e delle rese, pre-attivazione delle risposte di difesa, incremento della resistenza agli stress abiotici, aumento della disponibilità e assimilazione di nutrienti. Simili vantaggi sono stati osservati anche in seguito all'applicazione dei metaboliti secondari prodotti da questi funghi. Queste proprietà saranno importanti nello sviluppo di prodotti biologici di nuova generazione che avranno caratteristiche multiple ed integrate utili a sostenere sia le produzioni convenzionali che quelle in regime di biologico.

Parole chiave: *Trichoderma*; lotta biologica; resistenza indotta; metaboliti secondari; bioformulati.

Summary

New research and development trends with antagonistic fungi according to the "National Strategy Plan for the Development of Organic Farming" in Italy.

*Biological control has become a widespread method used in agriculture in alternative to or integrated with the use of chemicals for crop protection. A method of biocontrol implemented with success involves the use of *Trichoderma* fungal antagonists, capable of both counteracting pathogen activity and limiting population development, as well as providing benefits to the plant in terms of stimulation of defense responses, increased resistance to biotic and abiotic stresses, improvement of nutrient availability and assimilation, plus promoting crop growth and yields. These benefits can be obtained by applying the living *Trichoderma* or the secondary metabolites produced by the fungus, or both of them together. *Trichoderma* properties will be important in the development of the next generation biological products that will have integrated and multifunctional properties useful for supporting both conventional and biological/organic agricultural production.*

Key words: *Trichoderma*; biocontrol; induced resistance; secondary metabolites; bioformulations.

Lavori citati

Altomare C., Norvell W. A., Björkman T., Harman G. E. (1999) - Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295–22. Applied Environmental Microbiology, 65, 2926–2933.
Bae H., Sicher R. C., Kim M. S., Kim S. H., Strem M. D.,

- Melnick R. L., Bailey B. A. (2009) - The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3279-3295.
- Baker K. F., Cook R. J. (1974) - Biological control of plant Pathogens. W.H. Freeman, San Francisco. Reprinted ed., 1982. *Am. Phytopathol. Soc.*, St. Paul, MN. 433 pp.
- Baker R., Elad Y., Chet I. (1984) - The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology*, 74, 1019-1021.
- Benitez T., Rincon A. M., Limon M. C., Codon A. C. (2004) - Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-60.
- Berg G. (2009) - Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 11-18.
- Bigirimana J., De Meyer G., Poppe J., Elad Y., Höfte M. (1997) - Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Mededelingen Van De Faculte it Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent*, 62, 1001-1007.
- Brotman Y., Briff E., Viterbo A., Chet I. (2008) - Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant physiology*, 147(2), 779-789.
- Chang Y. C., Baker R., Kleifeld O., Chet I. (1986) - Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 70, 145-148.
- Demain A. L., Fang A. (2000) - The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, 69, 1-39.
- de Santiago A., Quintero J. M., Avilés M., Delgado A. (2009) - Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2453-2459.
- de Santiago A., Quintero J. M., Avilés M., Delgado A. (2011) - Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron, copper, manganese, and zinc uptake by wheat grown on a calcareous medium. *Plant and Soil*, 342, 97-104.
- de Santiago A., García-López A. M., Quintero J. M., Avilés M., Delgado A. (2013) - Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 598-605.
- Donoso E. P., Bustamante R. O., Carú M., Niemeyer H. M. (2008) - Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 1412-1417.
- Djonović S., Vargas W. A., Kolomiets M. V., Horndeski M., Wiest, A., Kenerley, C. M. (2007) - A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*, 145 (3), 875-889.
- Druzhinina I. S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B. A., Kenerley C. M., Monte E., Mukherjee P. K., Zeilinger S., Grigoriev I. V., Kubicek C. P. (2011) - *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Review Microbiology*, 9 (10), 749-59.
- Ghisalberti E. L., Sivasithamparam K. (1991) - Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23, 1011-1020.
- Ghisalberti E. L. (2002) - Anti-infective agents produced by the hyphomycetes genera *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 343-374.
- Hanson L. E., Howell C. R. (2004) - Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 94, 171-176.
- Harman G. E. (2000) - Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, 377-393.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004) - *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2, 43-56.
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012) - Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158 (1), 17-25.
- Hermosa R., Belén R. M., Cardoza R. E., Nicolás C., Monte E., Gutiérrez S. (2013) - The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16 (2), 69-80.
- Howell C. R. (2003) - Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87, 4-10.
- Kraemer S. M., Crowley D., Kretzschmar R. (2006) - Geochemical aspects of phytosiderophore-promoted iron acquisition by plants. *Advances in Agronomy*, 91, 1-46.
- Lemanceau P., Bauer P., Kraemer S., Briat J. F. (2009) - Iron dynamics in the rizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil* 321, 513-535.
- Lorito M., Woo S. L., Harman G. E., Monte E. (2010) - Translational research on *Trichoderma*: from 'Omics to the field'. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 395-417.
- Marschner H. (1995) - Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, pp889.
- Mastouri F., Björkman T., Harman G. E. (2010) - Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100, 1213-1221.
- Monte E. (2001) - Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, 4, 1-4.
- Morán-Diez E., Hermosa R., Ambrosino P., Cardoza R. E., Gutiérrez S., Lorito M., Monte E. (2009) - The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22, 1021-1031.
- Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Kenerley C. M. (2012) - Secondary metabolism in *Trichoderma*- a genomic perspective. *Microbiology*, 158, 35-45.
- Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Herrera-Estrella A., Schmoll M., Kenerley C. M. (2013) - *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review in Phytopathology*, 51, 105-129.
- Pascale A., Vinale F., Manganiello G., Nigro M., Lanzuise S., Ruocco M., Marra R., Lombardi N., Woo S. L., Lorito M. (2017) - *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection*, 92, 176-181.
- Reino J. L., Guerrero R. F., Hernández-Galán R., Collado I. G. (2008) - Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Review*, 7, 89-123.
- Ruocco M., Lanzuise S., Lombardi N., Woo S. L., Vinale F.,

- Marra R., Varlese R., Manganiello G., Pascale A., Scala V., Turrà D., Scala F., Lorito M. (2015) - Multiple Roles and Effects of a Novel *Trichoderma* Hydrophobin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(2), 167-179.
- Seidl V., Marchetti M., Schandl R., Allmaier G., Kubicek C. P. (2006) - Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *Febs Journal*, 273(18), 4346-4359.
- Shoresh M., Harman G. E., Mastouri F. (2010) - Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43.
- Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L. (1998) - Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1 (Harman G. E. and Kubicek C. P. coord.). Taylor and Francis Ltd., London UK, 139-191.
- Studholme D. J., Harris B., LeCocq K., Winsbury R., Perera V., Ryder L., Ward J. L., Beale M. H., Thornton C. R., Grant M. (2013) - Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture — insights from genomics. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-13.
- Tucci M., Ruocco M., De Masi L., De Palma M., Lorito M. (2011) - The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12, 341-354.
- Vargas W. A., Djonović S., Sukno S. A., Kenerley C. M. (2008) - Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19804-19815.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L., Lorito M. (2008) - *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1-10.
- Vinale F., Ghisalberti E. L., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S. L., Lorito M. (2009) - Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 705–711.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Ruocco M., Woo S., Lorito M. (2012) - *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communication*, 7, 1545-1550.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Woo S. L., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Ruocco M., Lanzuise S., Manganiello G., Lorito M. (2014) – *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycology Journal*, 8, 127-139.
- Weindling R. (1932) - *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22, 837-845.
- Woo S. L., Scala F., Ruocco M., Lorito M. (2006) - The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2), 181-185.
- 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, Special Issue on Fungal-Fungal Interactions*,71-126.
- Yedidia I, Benhamou N., Chet I. (1999) - Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 1061-1070.