



## Sensibilità di popolazioni lombarde di *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea* e *Venturia inaequalis* ai principali fungicidi

Quaderno della Ricerca  
n. 165 - Dicembre 2014



Regione Lombardia  
Agricoltura

Sperimentazione effettuata nell'ambito del progetto di ricerca n. 1712 "Indagini territoriali sulla resistenza ai più comuni fungicidi utilizzati su vite e melo", finanziato da Regione Lombardia con il Piano per la ricerca e lo sviluppo in campo agricolo 2010 (d.g.r. 29 dicembre 2010, n. IX/1180)

**Testi a cura di:**

Annamaria Vercesi, Silvia L. Toffolatti, Paola Campia, Giovanni Venturini  
Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia

**Foto a cura di:**

Silvia L. Toffolatti, Federico Zerbetto, Andrea Pedrazzini, Davide Sordi

**Hanno realizzato le attività sperimentali:**

Università degli Studi di Milano  
Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia  
Via Celoria, 2 - 20133 Milano  
Tel.: +39 02.5031.6776 fax: +39 02 5031.6781  
Referente: prof.ssa Annamaria Vercesi  
e-mail: annamaria.vercesi@unimi.it

**Per informazioni:**

Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura  
U.O. Sviluppo di innovazione, cooperazione e valore delle produzioni  
Struttura Sviluppo e promozione delle produzioni, ricerca,  
innovazione tecnologica e servizi alle imprese  
Piazza Città di Lombardia n.1 - 20124 Milano  
Tel: +39 02 6765.3790 - fax +39 02 6765.8056  
e-mail: agri\_ricerca@regione.lombardia.it  
Referente: Rossana Tonesi tel: +39 02 6765.3737  
e-mail: rossana\_tonesi@regione.lombardia.it

## PRESENTAZIONE

Il progetto di ricerca “Indagini territoriali sulla resistenza ai più comuni fungicidi utilizzati su vite e melo”, di cui questa pubblicazione riporta attività e risultati, si è posto l’obiettivo di valutare la sensibilità dei principali patogeni di vite (*Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea*) e melo (*Venturia inaequalis*) nei confronti dei più diffusi fungicidi utilizzati nella difesa antiparassitaria.

Numerosi patogeni fungini in grado di infettare foglie, fiori e frutti di vite e melo richiedono ogni anno l’applicazione di numerosi trattamenti, spesso effettuati utilizzando sostanze attive monosito, che esercitano una notevole pressione di selezione, con conseguente incremento della proporzione degli individui resistenti.

La Direttiva CE 128/2009 e le relative normative nazionali (D.Lgs 150/2012 e Decreto MiPAAF 22/1/2014) prefigurano una riduzione della gamma di fungicidi disponibili per la difesa delle colture e rendono necessaria l’adozione di misure che consentano di mantenere l’efficacia delle sostanze attive disponibili al loro massimo livello. In quest’ottica, le strategie che consentono di ridurre al minimo l’instaurarsi dei fenomeni di resistenza assumono una notevole importanza e la loro messa a punto non può prescindere da una conoscenza approfondita della composizione delle popolazioni dei patogeni nelle principali zone di produzione e dei siti e dei meccanismi d’azione dei prodotti fitosanitari.

Gli interessanti risultati ottenuti nel corso della sperimentazione e riportati in questo Quaderno della Ricerca, sono rivolti sia alla comunità scientifica, sia ai tecnici e agli agricoltori, che potranno elaborare le strategie di difesa nei confronti dei tre patogeni in esame tenendo conto delle situazioni di criticità.

**Direzione Generale Agricoltura  
Regione Lombardia**

## SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE</b> .....	4
La difesa integrata .....	5
Fungicidi monosito.....	6
La resistenza nei confronti dei fungicidi monosito .....	8
Fungicidi monosito usati su vite e melo .....	13
Fenilammidi.....	13
Acetammidi.....	14
Ammidi degli acidi carbossilici (CAA) .....	14
QoI (Quinone outside Inhibitor: inibitori esterni del chinone) .....	15
QiI (Quinone inside Inhibitor: inibitori interni del chinone) .....	16
Zoxamide.....	16
Fluopicolide .....	17
Carbossamidi o SDHI .....	18
Anilinopirimidine (AP) .....	18
Fenilpirroli.....	19
Inibitori della biosintesi degli steroli (IBS) - DMI .....	19
Inibitori della biosintesi degli steroli (IBS) - Idrossianilidi.....	20
Dodina .....	20
<b>LA RESISTENZA IN LOMBARDIA</b> .....	21
1) <i>Plasmopara viticola</i> (Berk.et Curt.) Berlese e De Toni .....	21
1a) Materiali e metodi.....	23
Siti e modalità di campionamento .....	23
Allestimento e svernamento dei campioni di oospore .....	23
Esecuzione dei saggi di germinazione .....	26
Analisi dei dati .....	27
1b) Risultati e conclusioni.....	27
QoI-azoxystrobin .....	27
CAA- mandipropamid .....	29
PA-metalaxyl .....	29
Cymoxanil .....	29
QiI - cyazofamid .....	28
Fluopicolide.....	32
Zoxamide .....	28
2) <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	32
2a) Materiali e metodi.....	34
Siti e modalità di campionamento .....	34
Isolamento dei ceppi monosporiali.....	37
Conservazione dei ceppi.....	37
Crescita dei ceppi di <i>B. cinerea</i> in presenza di varie sostanze attive .....	37
Preparazione e conservazione delle sospensioni conidiche .....	37
Esecuzione dei saggi di crescita .....	37

Calcolo dell'Ec <sub>50</sub> .....	39
Caratterizzazione molecolare.....	39
Estrazione e purificazione del dna.....	39
Identificazione degli elementi transponibili <i>Boty</i> e <i>Flipper</i> .....	39
Identificazione della polarità sessuale ( <i>mat 1-1</i> e <i>mat 1-2</i> ) .....	40
2b) Risultati e conclusioni.....	41
Carbossamidi - Boscalid.....	42
Idrossianilidi - Fenhexamid.....	43
Anilinopirimidine - Cyprodinil .....	44
Fenilpirroli - Fludioxonil.....	45
Caratterizzazione molecolare dei ceppi.....	46
3) <i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) G. Winter .....	48
3a) Materiali e metodi.....	49
Siti e modalità di campionamento .....	49
Isolamento dei ceppi monosporiali.....	50
Conservazione dei ceppi.....	51
Crescita dei ceppi di <i>V. inaequalis</i> in presenza dei fungicidi .....	51
3b) Risultati e conclusioni.....	51
Qol - Trifloxystrobin .....	52
DMI - Myclobutanil.....	55
Dodina .....	55
Sdhi - Boscalid.....	55
Ap-Cyprodinil.....	56
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	57

## INTRODUZIONE

Il contenimento delle perdite causate da funghi fitopatogeni viene conseguito grazie a diversi mezzi di difesa: fisici, agronomici, genetici e chimici. Questi ultimi sono utilizzati prevalentemente nei confronti di patogeni che infettano le porzioni aeree delle piante ospiti, in particolare fiori e frutti, sui quali è agevole la distribuzione del fungicida, che può quindi contrastare l'infezione/colonizzazione attuata dall'agente della malattia.

Le prime notizie relative all'uso di fungicidi in agricoltura risalgono ai Greci, che conoscevano e sfruttavano le proprietà dello zolfo. Sostanze di varia natura, ma in particolare calce, vennero utilizzate dal Rinascimento in poi per la concia delle sementi: in particolare si segnala una 'ricetta' francese, che prevede l'immersione delle cariossidi di grano in una soluzione di calce e solfato di ferro per prevenire l'infezione della pianta da parte degli agenti delle ruggini. Lo studio approfondito delle proprietà antifungine di elementi chimici e molecole è tuttavia molto più recente ed ha inizio con Tillet, che nel 1755 oltre a dimostrare l'infettività delle spore di *Tilletia caries* (DC.) Tul. & C. Tul., osserva come un trattamento al seme con sali di rame impedisca l'infezione da parte del fungo. Prevost ad inizio '800 indaga l'efficacia di molte sostanze nell'inibire la germinazione delle spore di *T. caries*, tra le quali spicca il rame. La vera svolta è rappresentata dalle osservazioni di Millardet sull'attività antiperonosporica della cosiddetta poltiglia bordolese. Nel 1878 sintomi dovuti a *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berlese e De Toni, l'agente della peronospora della vite, vengono osservati per la prima volta nei pressi di Bordeaux, segnalando l'arrivo del patogeno dagli Stati Uniti in Europa. *Vitis vinifera* L. si dimostra estremamente suscettibile al patogeno, che suscita notevoli preoccupazioni tra i viticoltori del vecchio continente a causa della grave perdita di produzione dovuta alle infezioni su grappolo. Millardet, che opera nella zona intorno a Bordeaux, osserva in quegli stessi anni una notevole riduzione dell'incidenza delle infezioni peronosporiche su viti imbrattate con una miscela di solfato di rame e calce che veniva applicata per scoraggiare i furti di grappoli. Le indagini di Millardet permisero di scoprire l'attività antiperonosporica del rame e di arrivare alla formulazione della poltiglia bordolese, che divenne ben presto il mezzo chimico più utilizzato per contenere i danni dovuti a *P. viticola*. La poltiglia bordolese è il primo fungicida utilizzato su vasta scala ed il suo impiego si estende dalla vite ad altre colture interessate da patogeni simili all'agente della peronospora della vite, come la patata. Tale è la quantità di rame impiegato in agricoltura che, nel corso della prima guerra mondiale, in alcuni paesi come la Germania la quota dell'elemento riservata alla preparazione dei fungicidi venne ridotta in favore di quella dedicata all'industria bellica. Queste restrizioni furono all'origine della penuria di patate che colpì la Germania verso la fine della guerra a causa delle gravi epidemie di peronospora, non adeguatamente contrastabili con i fungicidi, cosa che indirettamente testimonia l'importanza della difesa chimica nel garantire ad inizio del secolo scorso la sicurezza alimentare di importanti paesi europei. Contemporaneamente all'uso del rame si diffonde l'impiego dello zolfo, che dimostra una notevole efficacia nei confronti degli agenti degli oidi su svariati ospiti.

Fino alla metà del secolo scorso non erano disponibili formulati e quindi ogni agricoltore preparava il proprio fungicida in funzione della necessità del momento. La distribuzione della sospensione e/o della polvere fungicida era affidata a erogatori manuali azionati dall'uomo, cosa che rendeva l'operazione molto faticosa nonché pericolosa per la salute degli operatori. Le sospensioni a base di rame e lo zolfo polverulento erano frequentemente fitotossiche, dovevano essere applicati spesso ed a dosi molto elevate. Da queste constatazioni, negli anni successivi alla fine della prima guerra mondiale, prese l'avvio una serie di sperimentazioni volte ad individuare nuove molecole da impiegare per la protezione delle piante che videro coinvolte le industrie chimiche non più impegnate nella produzione bellica, per la quali, quindi, l'agricoltura rappresentava un settore potenzialmente molto proficuo. Vennero messi a punto metodi di laboratorio per la scoperta di nuovi fungicidi (McCallan, 1930). Il primo risultato concreto di questi sforzi fu la scoperta dei primi fungicidi organici di sintesi a seguito dell'individuazione delle proprietà fungicide dei ditiocarbammati, molecole originariamente utilizzate durante il processo di vulcanizzazione

della gomma, che vennero brevettati nel 1934 da Tisdale e Williams. Un'ulteriore evoluzione nel campo della difesa chimica si verificò dopo la fine della seconda guerra mondiale, quando si rafforzò l'interesse dell'industria chimica per le applicazioni fitoiatriche.

L'introduzione dei fungicidi di sintesi comporta la fine delle preparazioni estemporanee dei preparati fungicidi da parte dell'agricoltori e l'affermarsi di vere e proprie industrie, che immettono sul mercato formulati pronti all'uso. Tra il 1942 ed il 1965 vengono immessi sul mercato sostanze attive a largo spettro appartenenti alle classi dei ditiocarbammati (thiram, zineb, nabam, maneb, mancozeb), ftalimmidi (captan e folpet) nonché la dodina, il dithianon, il chlorothalonil, la carbossina e il dodemorph. Ciò mette a disposizione degli agricoltori prodotti molto efficaci nei confronti dei principali patogeni delle piante appartenenti a diverse categorie tassonomiche (*Oomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*), utilizzabili per trattamenti alla parte aerea della pianta o come concianti del seme.

La possibilità di incrementare le rese ottenibili effettuando trattamenti fungicidi è stata recepita dagli agricoltori con entusiasmo, determinando un rapido aumento delle vendite di prodotti fitosanitari ed una applicazione spesso eccessiva ed ingiustificata di trattamenti, in particolare sulle colture infettabili da patogeni in grado di svolgere più cicli di malattia durante una stessa stagione vegetativa. Contemporaneamente, ed in particolare negli anni sessanta e settanta del secolo scorso, venivano abbandonate le tradizionali tecniche di difesa, in particolare quelle agronomiche, nella convinzione che un trattamento potesse risolvere tutti i problemi di contenimento dei danni dovuti a patogeni e parassiti. Va anche sottolineato che, all'epoca, si puntava su produzioni particolarmente abbondanti, intervenendo con concimazioni eccessive e squilibrate che aumentavano il rischio di infezioni le quali, a loro volta, inducevano l'agricoltore ad effettuare un numero sempre crescente di trattamenti. Diventavano via via evidenti alcune ripercussioni negative dell'uso smodato di agrofarmaci: alterazioni anche rilevanti della composizione della comunità biotica associata alle varie colture, con conseguente recrudescenza di alcune malattie/infestazioni fino ad allora considerate secondarie; inquinamento ambientale con effetti a lungo termine difficilmente prevedibili; ripercussioni negative dell'impiego dei prodotti fitosanitari sulla salute dell'uomo e degli animali; accumulo di residui delle sostanze attive utilizzate nelle derrate e nei prodotti finiti a livelli giudicati pericolosi per il consumatore.

## **LA DIFESA INTEGRATA**

Il continuo accumularsi di dati sugli effetti secondari dei trattamenti indusse in particolare in Europa, e in modo più contenuto negli USA, ad un ripensamento relativo all'impostazione dei programmi di difesa: dalle riflessioni di tecnici e studiosi è derivata la formulazione della cosiddetta difesa integrata. Il concetto più importante sul quale è basata la difesa integrata è il riconoscimento dell'importanza di ogni mezzo utile alla protezione delle piante nel conseguimento dell'efficacia finale della strategia di intervento. Alcuni mezzi possono avere un peso maggiore di altri nel ridurre i danni indotti dalle avversità biotiche, ma l'espressione delle loro potenzialità è fortemente condizionata dal contesto nel quale vengono utilizzati. Fungicidi di grande efficacia applicati su colture gestite in modo tale da impedire che raggiungano le superfici infettabili dal patogeno non possono esplicitare al meglio la loro attività: da qui l'importanza della gestione della chioma che, pur avendo altre conseguenze importanti, come la migliore areazione della vegetazione, condiziona in modo decisivo la corretta distribuzione del trattamento. Nella difesa integrata è stato fortemente rivalutato il ruolo dei mezzi agronomici, che in alcuni casi possono risultare decisivi nella riduzione del danno. Analogamente, la disponibilità di geni di resistenza, anche se parziali, va attentamente considerata, specialmente nelle situazioni caratterizzate da un'elevata probabilità di infezione. Il coinvolgimento nei piani di difesa di tutti i mezzi disponibili permette, quindi, di pilotare l'evoluzione di epidemie/infestazioni mantenendo il livello del danno al di sotto della soglia economica consentita. Non si punta più ad una totale eliminazione della malattia o dell'infestazione, quanto ad una sua gestione. L'aspetto eco-tossicologico, che andrà nel tempo assumendo un'importanza sempre maggiore, viene affrontato limitando o vietando l'uso dei formulati caratterizzati da effetti collaterali negativi di maggiore entità.



## FUNGICIDI MONOSITO

Parallelamente all'evoluzione dell'impostazione della difesa, processo peraltro ancora in corso, a partire dal 1965 e con sempre maggiore frequenza nei decenni successivi, vengono introdotti sul mercato fungicidi cosiddetti monosito, la cui sostanza attiva interagisce con un unico bersaglio all'interno delle strutture del patogeno, rappresentato da una proteina che, una volta combinata con la molecola fungicida, non riesce più ad esercitare la sua funzione ed interrompe la catena metabolica nella quale è coinvolta con conseguente morte dell'individuo. Ciò rappresenta un cambiamento di non poco conto rispetto ai primi fungicidi introdotti sul mercato, i quali erano caratterizzati dalla capacità di interagire con numerosissimi siti reattivi ed in grado di inibire più funzioni metaboliche contemporaneamente, denominati pertanto multisito. I fungicidi di più recente introduzione sono, inoltre, in grado nella stragrande maggioranza dei casi di penetrare all'interno del vegetale redistribuendosi localmente, per quanto riguarda i cosiddetti citotropici, o a più lunga distanza, per quanto riguarda i sistemici, che si muovono seguendo la corrente traspiratoria. Il movimento a livello xilematico, e quindi la possibilità di raggiungere la vegetazione neoformata, dipende da molteplici fattori, ma in modo particolare dal coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, solitamente espresso dal parametro  $\log K_{ow}$ : la capacità di movimento nello xilema aumenta man mano che il valore di questo parametro aumenta da 0 a 2 e poi diminuisce fino ad azzerarsi quasi completamente con valori di  $\log K_{ow}$  superiori a 3,5. E' soprattutto la capacità dei nuovi fungicidi di essere assorbiti che suscita l'interesse del mercato: la penetrazione all'interno del vegetale sottrae la sostanza attiva al dilavamento, mentre la redistribuzione interna ovvia ad eventuali imprecisioni nell'applicazione del trattamento. Un altro evidente vantaggio dei fungicidi penetranti è la capacità di esercitare la loro attività nelle prime fasi successive all'infezione: essi possono quindi essere applicati dopo la fase di penetrazione del patogeno, risultando comunque efficaci perché in grado di agire sulle strutture del patogeno presenti all'interno della pianta. Ciò consente all'agricoltore di ovviare ad eventuali ritardi nell'esecuzione del trattamento, dovuti ad avverse condizioni meteorologiche o ad inagibilità degli appezzamenti. La cosiddetta azione 'curativa', com'è stata denominata l'attività post-infezionale, è stata spesso sopravvalutata poiché non si è tenuto conto che tale attività si esplica al meglio quando la colonizzazione da parte del patogeno è nelle fasi iniziali, mentre è pressoché nulla se utilizzata durante gli stadi finali del periodo di incubazione.

Benché il primo fungicida sistemico immesso sul mercato nel 1966 sia in effetti carboxin, ad attività specifica nei confronti dei *Basidiomycota* ed in particolare degli agenti delle carie e dei carboni dei cereali, fu il benomyl, commercializzato due anni più tardi e dotato di analoghe capacità di redistribuzione nel vegetale, a riscuotere il maggiore interesse per due ragioni fondamentali, ovvero lo spettro d'azione decisamente ampio, che esclude solamente gli *Oomycota*, e la possibilità di impiego su un numero elevato di colture. Il successo del benomyl venne drasticamente ridimensionato solamente dopo pochi anni dalla sua introduzione, quando fu constatato che in alcuni areali esso risultava del tutto inefficace su patogeni precedentemente contenuti senza problemi. Dalle indagini effettuate divenne evidente che benomyl aveva selezionato, all'interno della popolazione del patogeno, individui resistenti del tutto insensibili alla sua attività fungicida. L'azione selettiva esercitata da benomyl dipende chiaramente dal fatto che la sostanza attiva ha un'unica proteina bersaglio, la quale deve avere una conformazione tale da permettere la combinazione con la molecola fungicida. L'elevata variabilità esistente all'interno delle popolazioni dei patogeni funghi implica la possibilità che alcuni individui presentino conformazioni della proteina bersaglio anche lievemente modificate che impediscono la combinazione con la sostanza attiva, che risulta quindi del tutto inefficace. La capacità di esercitare una pressione di selezione sulla popolazione del patogeno è propria di tutti i fungicidi monosito con conseguenze spesso negative per il raggiungimento di un adeguato livello di protezione della coltura trattata. L'era dei fungicidi monosito, iniziata a metà degli anni sessanta del secolo scorso, continua tutt'oggi e ha portato alla commercializzazione di sostanze attive vendute ed apprezzate in tutto il mondo. Una pietra miliare della storia dei fungicidi monosito è rappresentata dalle fenilammidi, cui appartiene metalaxyl, la prima sostanza attiva appartenente a questo gruppo



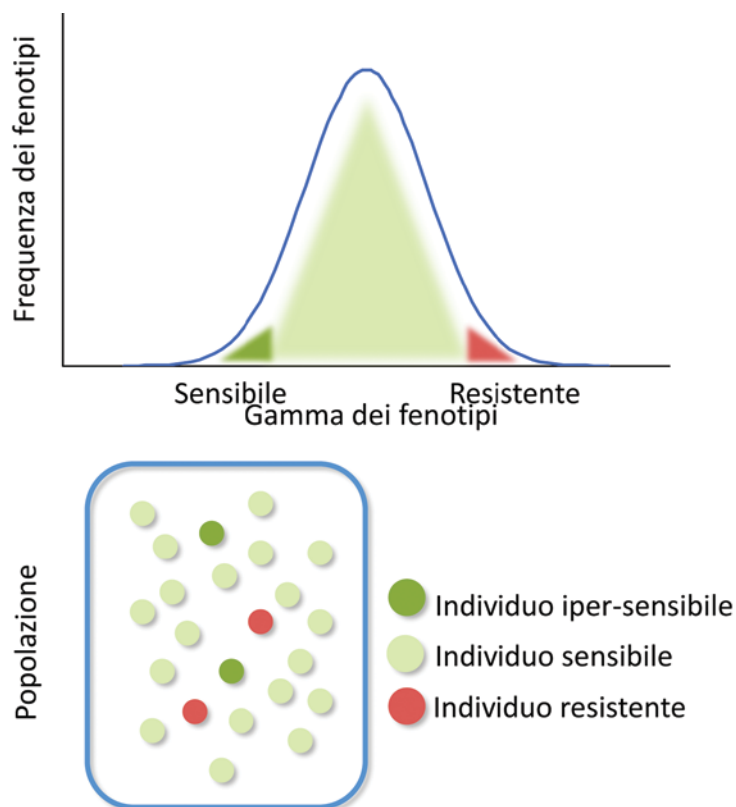
chimico commercializzata nel 1977: si tratta infatti dei primi fungicidi sistemici attivi contro gli *Oomycota*, *phylum* cui appartengono gli agenti di malattie devastanti come le peronosspore. L'individuazione di sostanze attive penetranti nei confronti degli *Oomycota* si era infatti rivelata particolarmente ardua, ma finalmente anche per questi patogeni, che sono favoriti da prolungate bagnature, erano disponibili fungicidi in grado di assicurare una protezione durevole anche in caso di precipitazioni persistenti. Alle fenilammidi sistemiche si affiancano, in funzione antiperonosporica, i citotropici cymoxanil e dimethomorph, capostipite, quest'ultimo, della famiglia delle ammidi degli acidi carbossilici cui appartengono anche benthiavalicarb, valiphenal, iprovalicarb e la recente mandipropamid. L'inibizione della sintesi degli steroli è il meccanismo messo in atto da un elevato numero di sostanze attive per limitare i danni dovuti agli agenti degli oidii. Gli IBS (Inibitori della Biosintesi degli Steroli) sono attualmente tra i fungicidi più venduti al mondo, applicati a cereali, orticole e molte altre colture che proteggono non solo dagli appartenenti alla famiglia delle *Erysiphaceae*, ma anche da altri importanti patogeni quali ad esempio *Fusarium* spp. Nel 1992 diventa disponibile sul mercato azoxystrobin, una sostanza attiva monosito dotata di uno spettro d'azione che comprende *Oomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Azoxystrobin fa parte delle strobilurine composti fungicidi messi a punto dall'industria di agrofarmaci a partire dalle strobilurine naturali, metaboliti secondari dei basidiomiceti *Strobilurus tenacellus* (Pers.) Singer (Anke *et al.*, 1990) ed *Oudemansiella mucida* (Schrad.) Höhn (Musilek *et al.*, 1969). Le strobilurine di sintesi si affermano sul mercato in breve tempo e costituiscono più del 15 % del totale dei fungicidi venduti a livello globale. Altrettanto rapidamente, purtroppo, ceppi resistenti a questi fungicidi si affermano nelle popolazioni di numerosi patogeni, compromettendo l'efficacia dei trattamenti. Nella prima decade del nuovo secolo la comparsa sul mercato di nuove molecole dotate di nuovi meccanismi d'azione si affievolisce a causa dei costi proibitivi delle spese di registrazione dei formulati e delle sempre maggiori restrizioni di carattere eco-tossicologico imposte soprattutto nei paesi industrializzati, Comunità Europea in particolare.

La revisione a livello comunitario della legislazione relativa alla commercializzazione dei prodotti fitosanitari basata sulla Direttiva 91/414 ha determinato l'eliminazione di un elevato numero di molecole, dai caratteri tossicologici poco favorevoli: è stato calcolato che all'incirca il 50 % delle sostanze attive utilizzate in Europa non hanno ottenuto l'autorizzazione alla commercializzazione in conformità alle nuove disposizioni. Ciò ha contribuito ad aumentare il livello di sicurezza, ma ha suscitato non pochi problemi, in particolare sulle cosiddette colture minori sulle quali erano registrate solo poche sostanze attive. Anche le rese di grandi colture come i cereali ed in particolare il grano, la patata, la vite, potrebbero subire delle notevoli restrizioni. Sono soprattutto le sostanze attive multisito ad essere eliminate dal mercato, lasciando quindi spazio ai monositi, i quali hanno profili eco-tossicologici migliori ma sono potenzialmente in grado di esercitare una pressione di selezione sulla popolazione del patogeno in favore dei ceppi resistenti. Il nuovo Regolamento 1107 sulla commercializzazione dei prodotti fitosanitari, approvato dalla CE nel 2009, affina ulteriormente i criteri per la valutazione delle sostanze attive da impiegare in agricoltura, alla luce dello scopo principale del Regolamento stesso, che è quello di 'assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e animale e dell'ambiente', seguendo il principio di precauzione 'al fine di garantire che i prodotti immessi sul mercato non abbiano effetti nocivi' su operatore, consumatore, componenti biotiche ed abiotiche dell'ambiente. Il Regolamento 1107/2009 introduce criteri che escludono aprioristicamente la possibilità di registrare una sostanza attiva che sia cancerogena, mutagena, tossica per la riproduzione di categoria 1 e 2, che interferisca con il sistema endocrino e che sia persistente, tossica, bioaccumulante o molto persistente/molto bioaccumulante. Le sostanze attive registrate vengono classificate, a seconda delle loro caratteristiche, in tre diverse categorie: 1) sostanze di base, autorizzate senza limiti di tempo, prive di qualsiasi effetto negativo e solitamente non commercializzate come prodotti fitosanitari; 2) sostanze a basso rischio, autorizzate per 15 anni e prive di effetti negativi sulla salute umana ed animale e sull'ambiente; 3) candidate alla sostituzione, a causa di effetti tossici su uomo ed animali, capacità di indurre inquinamento ambientale, significativo contenuto di isomeri non attivi. Di fatto il Regolamento 1107 introduce, sostanze di base a parte, un

sistema di revisione continua delle sostanze attive presenti sul mercato con l'evidente intento di eliminare tutte quelle molecole che hanno caratteristiche negative ed il cui uso quindi non soddisfa il principio di precauzione sostenuto dal Regolamento stesso. Tra le sostanze candidate alla sostituzione sono presenti, per motivi diversi, fungicidi ampiamente utilizzati come alcuni triazoli, mentre per ditiocarbammati e folpet potrebbero essere addirittura applicati i criteri di esclusione preventiva. Lo stesso rame, fungicida cardine dell'agricoltura biologica, suscita non poche perplessità. Se bisogna riconoscere l'accuratezza con la quale la CE si prefigge di proteggere salute umana ed animale ed ambiente, non si può negare che le nuove normative pongano quesiti tecnici relativi all'impostazione di una razionale strategia di difesa. Per questo motivo una conoscenza approfondita delle sostanze, in gran parte monosito, utilizzabili per la protezione delle colture è indispensabile per evitarne un utilizzo inopportuno. In particolare occorre evitare che l'uso sconsiderato dei fungicidi monosito selezioni ceppi resistenti, il cui affermarsi nella popolazione dell'ospite associata ad un'adeguata fitness determina una perdita di efficacia del trattamento.

### LA RESISTENZA NEI CONFRONTI DEI FUNGICIDI MONOSITO

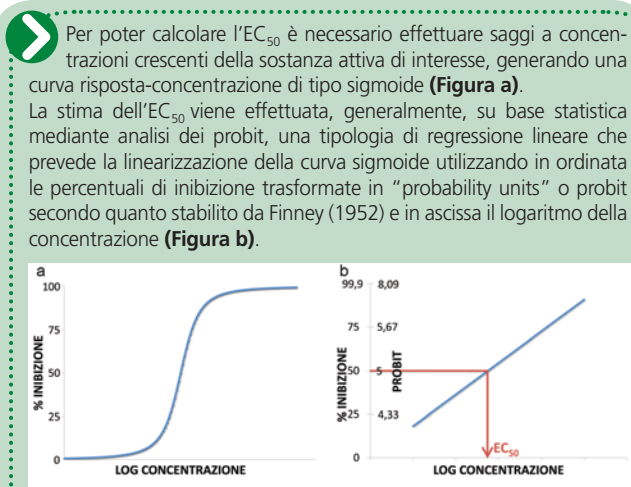
Le popolazioni dei patogeni fungini delle piante sono costituite da un ingente numero di individui appartenenti alla stessa specie/razza i quali, tuttavia, mostrano al loro interno una certa biodiversità. Ciò fa sì che individui caratterizzati da diversi livelli di virulenza, da una differente capacità di produrre metaboliti secondari e da altre caratteristiche facciano parte della stessa popolazione. In genere, se si considera un'unica caratteristica, la frequenza degli individui appartenenti alle classi in base alle quali viene valutata la caratteristica considerata, si dispone secondo una gaussiana: ciò significa che pochi individui appartengono alle classi estreme e che la maggior parte dei componenti della popolazione si colloca nelle classi intermedie (**Figura 1**).



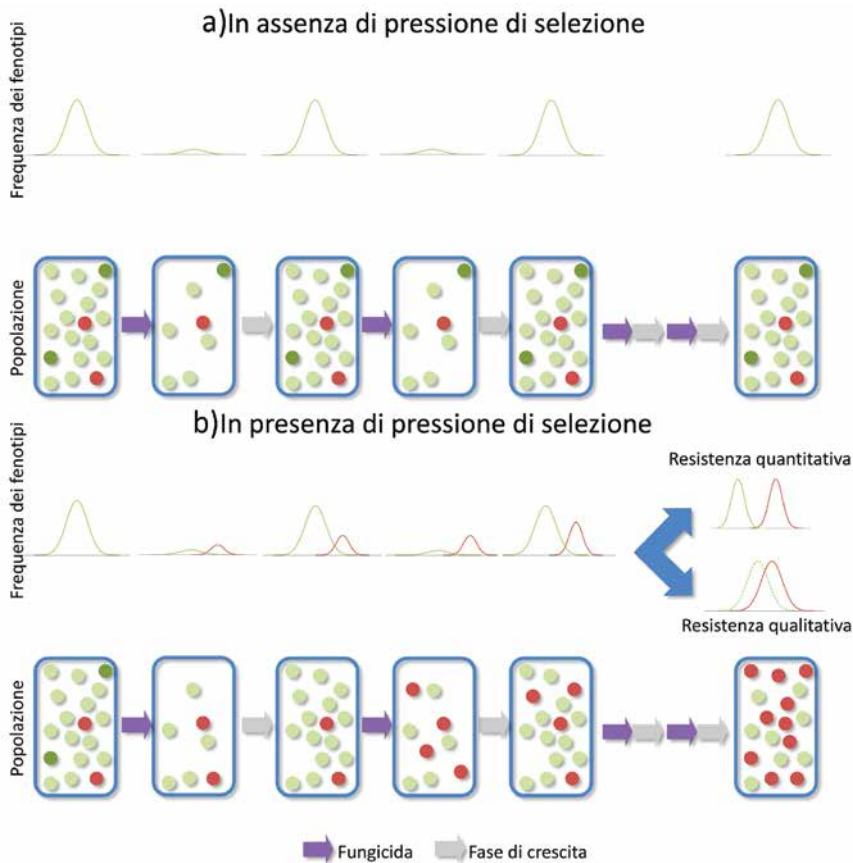
**Figura 1.** Frequenza degli individui sensibili e resistenti all'interno di una popolazione

Fino all'avvento dei fungicidi unisito, non era stata osservata alcuna differenza di reazione dei ceppi appartenenti a specie sensibili nei confronti di sostanze attive multisito, a causa della capacità di questi ultimi di interagire con numerosissimi siti reattivi all'interno delle strutture fungine (**Figura 2a**). L'impiego dei primi fungicidi unisito ha evidenziato la presenza nella popolazione del patogeno di ceppi dotati di una ridotta sensibilità nei confronti della sostanza attiva dotata di un dato meccanismo d'azione. Somministrando concentrazioni crescenti di una sostanza attiva unisito ai componenti di una data popolazione, che non è mai stata precedentemente esposta alla molecola fungicida, è possibile osservare come la frequenza dei ceppi inibiti aumenti fino a raggiungere il valore più elevato in corrispondenza di una data concentrazione del composto ed in seguito diminuisca fino a rasentare l'annullamento alle dosi più elevate: la curva che si ottiene è una tipica gaussiana. La valutazione della reazione di una popolazione di patogeni a una sostanza unisito dotata di un nuovo meccanismo d'azione prima della sua immissione in commercio è fortemente raccomandata in quanto consente di evidenziare la distribuzione della sensibilità degli individui presenti in un determinato areale e di calcolare la cosiddetta  $EC_{50}$ , l'Effective Concentration<sub>50</sub>, vale a dire la concentrazione di fungicida in grado di inibire del 50 % la crescita della popolazione saggiata. La distribuzione della sensibilità e la corrispondente  $EC_{50}$  costituiscono la cosiddetta baseline, che può essere utilizzata in tempi successivi per valutare i cambiamenti indotti nella popolazione dall'utilizzo del fungicida. Sfortunatamente, per la maggior parte delle sostanze attive unisito attualmente in commercio non sono disponibili baseline e di conseguenza sono di difficile interpretazione i risultati di monitoraggi effettuati dopo l'uso prolungato di un dato fungicida. ➡

Le indagini effettuate a livello di popolazione hanno evidenziato in modo inconfutabile l'esistenza, anche in popolazioni mai esposte precedentemente al fungicida monosito, di ceppi che non risultano inibiti da elevate concentrazioni di sostanza attiva, in altre parole di quelli che vengono generalmente chiamati ceppi resistenti. I ceppi resistenti nei confronti di fungicidi monosito sono una componente normale delle popolazioni dei patogeni fungini, espressione della biodiversità che caratterizza ogni comunità microbica. L'applicazione del fungicida monosito non determina quindi la comparsa di ceppi resistenti, ma esercita una pressione di selezione che favorisce l'incremento della frequenza di individui insensibili alla sostanza attiva considerata. Tale pressione di selezione comporta l'eliminazione dei ceppi sensibili, fornendo quindi un vantaggio all'individuo resistente che non deve competere per l'infezione dell'ospite e può quindi, aumentare la propria frequenza nell'ambiente dell'ospite fino a diventare dominante (**Figura 2b**).



**Figura.** Curva risposta-concentrazione (a) e stima dell' $EC_{50}$  basata sui probit (b)



**Figura 2.** Frequenza degli individui sensibili resistenti in assenza (a) o presenza (b) di pressione di selezione

La resistenza nei confronti di fungicidi monosito può essere qualitativa o quantitativa. La resistenza qualitativa è essenzialmente dovuta a mutazioni puntiformi che si verificano casualmente nel gene che codifica per la proteina bersaglio della sostanza attiva. Ciò comporta la sostituzione di un aminoacido nella proteina bersaglio: se tale sostituzione si verifica nel sito di reazione con il fungicida unisito e l'ingombro sterico dell'aminoacido codificato a seguito della mutazione è diverso rispetto a quello originariamente presente, la sostanza attiva non riesce più a reagire con la proteina bersaglio e non può bloccare la funzionalità. Il ceppo nel quale è presente tale mutazione non risente dell'attività tossica del fungicida ed è quindi resistente. Non tutte le mutazioni che si verificano nel gene che codifica per la proteina bersaglio comportano come conseguenza l'insensibilità nei confronti del fungicida: alcune infatti non influiscono sul sito d'aggancio della sostanza attiva, mentre altre compromettono la funzionalità della proteina tanto da risultare letali. La resistenza può essere associata a più mutazioni puntiformi, una delle quali generalmente è più efficace e diffusa: è questo il caso dei ceppi resistenti ai Qol, nei quali la mutazione che porta alla sostituzione G143A è più frequentemente riscontrata di F129L. La frequenza con la quale vengono riscontrate le diverse mutazioni puntiformi può variare, inoltre, in funzione del patogeno considerato: nei ceppi di *P. viticola* resistenti ai Qol viene riscontrata quasi esclusivamente G143A, mentre in *Erysiphe necator* Schwein. è presente maggiormente F129L. Queste differenze possono influire sull'affermarsi dei ceppi resistenti all'interno delle popolazioni dei patogeni, probabilmente a causa del fatto che ad alcune mutazioni puntiformi è associata una migliore capacità competitiva del ceppo. La resistenza dovuta ad una mutazione

puntiforme si estende a tutte le sostanze attive che condividono lo stesso meccanismo d'azione: per questo motivo l'individuazione del meccanismo d'azione è indispensabile per valutare le conseguenze dell'applicazione di un determinato fungicida, in particolare nelle situazioni nelle quali è stata rilevata la presenza di ceppi resistenti. Il progressivo affermarsi dei ceppi resistenti nella popolazione del patogeno comporta uno spostamento verso destra della gaussiana della distribuzione delle frequenze delle risposte dei ceppi alle concentrazioni di fungicida rispetto a quella della popolazione originaria: i ceppi sensibili sono poco numerosi, mentre aumentano quelli inibiti da concentrazioni elevate della sostanza attiva e i ceppi resistenti.

La resistenza quantitativa comporta l'attivazione di una serie di meccanismi che determinano una minore concentrazione del fungicida all'interno delle strutture del patogeno: in particolare può aumentare la capacità del ceppo di detossificare la sostanza attiva, di estromettere il fungicida oppure di produrre maggiori quantità della proteina bersaglio, incrementandone la concentrazione. Le popolazioni dei patogeni che presentano resistenza quantitativa vengono inibite efficacemente da concentrazioni di sostanza attiva superiori a quelle osservate per la popolazione originaria. Anche in questo caso la gaussiana delle frequenze delle risposte dei ceppi della nuova popolazione alle concentrazioni di fungicida si sposta a destra, ma è ancora parzialmente sovrapponibile a quella della popolazione originaria. La resistenza quantitativa, meno diffusa rispetto a quella qualitativa, è stata rilevata in alcuni patogeni nei confronti di alcuni IBS e viene ritenuta meno pericolosa, se si può ricorrere ad un incremento della dose di campo del formulato.

La pressione di selezione esercitata dalle sostanze attive monosito è modulata dalle caratteristiche del patogeno trattato, come riscontrato ripetutamente nel corso degli anni in situazioni di pieno campo. I patogeni che risentono in modo più consistente di tale pressione sono caratterizzati da un'abbondante produzione di spore asessuate: la differenziazione di una gran quantità di spore comporta un aumento della probabilità che in tale massa siano contenuti individui caratterizzati dalla mutazione che conferisce la resistenza. Su questa probabilità influisce il tasso di mutazione che caratterizza ogni specie fungina e rende alcuni patogeni particolarmente esposti alla pressione di selezione. La produzione di spore avviene solitamente per i patogeni fungini al termine del ciclo infettivo, una volta completata la colonizzazione dei tessuti dell'ospite. I patogeni fungini possono compiere uno o più cicli infettivi durante la stessa stagione vegetativa dell'ospite, in altre parole l'abbondante sporulazione prima citata può avvenire una o più volte durante una stessa annata. Sui patogeni policiclici, soprattutto se capaci di formare considerevoli masse di spore, la pressione di selezione del fungicida esercitata ripetutamente durante il ciclo produttivo dell'ospite comporta spesso il rapido affermarsi nella popolazione del patogeno degli individui resistenti. Non a caso i patogeni che sono risultati maggiormente interessati da problematiche legate alla presenza di ceppi resistenti sono tipicamente policiclici: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *P. viticola*, *Puccinia graminis* Pers., *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, *Blumeria* spp.. Un ultimo fattore contribuisce a rendere gravi le conseguenze della pressione di selezione: si tratta della capacità dei patogeni fungini di riprodursi sessualmente. La riproduzione sessuata contribuisce infatti alla costituzione di nuovi genotipi nell'ambito della popolazione dell'ospite che potrebbero assommare le caratteristiche legate alla resistenza a una particolare aggressività in grado di garantire loro elevate capacità competitive nei confronti dei ceppi sensibili.

Quest'ultimo aspetto, vale a dire la competitività dei ceppi resistenti nei confronti dei ceppi sensibili, è di fondamentale importanza nel condizionare l'evoluzione delle popolazioni dei patogeni fungini. Infatti la presenza di ceppi resistenti può non avere alcuna conseguenza pratica nel momento in cui tali ceppi non sono in grado di affermarsi nella popolazione del patogeno e di infettare le parti suscettibili della pianta. L'insieme delle caratteristiche che rendono un determinato individuo adatto a svolgere il suo ciclo biologico ed infettivo viene denominato fitness. La fitness non è di facile definizione in quanto come già detto ha diverse componenti: per quanto riguarda la capacità di adattarsi all'ambiente, sono importanti gli intervalli di temperatura entro i quali l'individuo riesce a svilupparsi attivamente, nonché i limiti termici che ne garantiscono

la sopravvivenza, la rapidità di crescita a temperature diverse e l'attitudine saprofitaria per i parassiti facoltativi. Per tutti i patogeni, alla fitness contribuiscono l'entità della riproduzione asessuata e la capacità di differenziare organi di svernamento adeguati. Queste caratteristiche influiscono sui rapporti del patogeno con l'ambiente abiotico, ma sono altrettanto importanti i fattori che regolano l'interazione ospite-patogeno, in altre parole la capacità di mettere in atto tutti i meccanismi che determinano l'insorgere della malattia: differenziazione di strutture infettive efficienti, produzione di enzimi, sostanze tossiche, proteine legate alla patogenesi. Un altro elemento è dato dalla velocità con la quale avviene il processo infettivo, che non deve essere troppo lenta e deve concludersi con la produzione di abbondante inoculo vitale. Un patogeno dotato di buona fitness quindi si sviluppa rapidamente in ampio intervallo termico, resiste ad alte e basse temperature, rimanendo vitale, e formando adeguate strutture di sopravvivenza, è in grado di infettare le parti suscettibili dell'ospite ampiamente e velocemente e di dar luogo alla formazione di abbondante inoculo attivo. La fitness non è di facile valutazione tanto che esistono tuttora poche informazioni su eventuali differenze tra ceppi sensibili e ceppi resistenti della stessa specie patogena a questo proposito. Un esempio delle possibili conseguenze che un elemento sconosciuto che influisce sulla fitness dei ceppi resistenti può avere sull'evoluzione temporale della composizione delle popolazioni del patogeno riguarda *P. viticola*. È stato infatti osservato che l'incidenza di ceppi resistenti alle fenilammidi nelle popolazioni del patogeno aumenta generalmente durante la stagione vegetativa dell'ospite per poi decrescere considerevolmente alla ripresa vegetativa dell'anno successivo (Gisi *et al.*, 2000): questo andamento è stato attribuito alla scarsa sopravvivenza delle oospore differenziate dai ceppi resistenti rispetto alle strutture sessuate formate dai ceppi sensibili. La diminuzione del potenziale d'inoculo della popolazione resistente durante l'inverno determina una minore incidenza di infezioni primarie formate da tale popolazione, che quindi risulta meno competitiva rispetto ai ceppi sensibili, almeno ad inizio stagione. Anche la difficoltà di crescita dei ceppi di *Botrytis cinerea* Pers. resistenti alle dicarbossimidi in mezzi ad elevata pressione osmotica rappresenta uno svantaggio competitivo su uve molto ricche di zuccheri. Recentemente è stato accertato che in condizioni naturali, popolazioni di *P. viticola* caratterizzate da elevati livelli di resistenza nei confronti di cymoxanil ritornano sensibili dopo 5-9 cicli d'infezione qualora i trattamenti con il fungicida vengano sospesi (Genet e Jaworska, 2013). Questa osservazione è stata confermata nel corso di monitoraggi effettuati in vari vigneti italiani nei quali a fine stagione si riscontrava una netta diminuzione degli EC<sub>50</sub> elevati rilevati sulle infezioni primarie (Toffolatti *et al.*, in corso di stampa). In entrambi i casi una ridotta virulenza è la ragione della diminuzione della proporzione di ceppi resistenti nella popolazione del patogeno nel corso della stagione vegetativa dell'ospite: nel caso di cymoxanil, quindi, una sospensione dei trattamenti associata al verificarsi di numerosi cicli d'infezione può efficacemente contribuire a ristabilire l'egemonia degli individui sensibili. Per nessun patogeno finora indagato sono noti i fattori che maggiormente contribuiscono alla riduzione della fitness, ma solo gli effetti a livello di popolazione. Proprio per il ruolo giocato dalla fitness, la sola presenza di ceppi resistenti in una data popolazione non comporta automaticamente la perdita di efficacia del fungicida considerato. Pertanto occorre essere molto cauti prima di attribuire ai ceppi resistenti eventuali danni alla produzione: occorre infatti accertare da un lato l'effettiva presenza di ceppi resistenti e dall'altro l'accuratezza con la quale sono stati eseguiti i trattamenti e la loro sequenza temporale.

La consapevolezza delle possibili conseguenze negative che l'affermarsi di ceppi resistenti può avere a livello dell'efficacia del trattamento fungicida suggerisce di adottare misure che minimizzino o riducano tale eventualità. Il primo di questi accorgimenti consiste nel limitare il numero dei trattamenti effettuati nel corso di una stessa stagione vegetativa con sostanze attive che condividono lo stesso meccanismo d'azione, cercando di non eseguirli consecutivamente. Altrettanto importante è alternare fungicidi caratterizzati da diversi meccanismi d'azione. In alternativa si possono utilizzare miscele contenenti o sostanze attive unisito dotate di diverso meccanismo d'azione oppure sostanze attive unisito e una sostanza attiva multisito.



## FUNGICIDI MONOSITO USATI SU VITE E MELO

Verranno quindi di seguito illustrate le caratteristiche fondamentali dei principali gruppi di fungicidi utilizzati per il contenimento dei danni dovuti agli agenti patogeni della peronospora (*P. viticola*) e della muffa grigia (*B. cinerea*) della vite e della ticchiolatura (*V. inaequalis*) del melo.

### Fenilammidi

Delle cinque sostanze attive appartenenti alle fenilammidi commercializzate tra la fine degli anni settanta e l'inizio degli anni ottanta del secolo scorso (metalaxyl, benalaxyl, oxadixyl, furalaxyl e ofurace), solo metalaxyl e benalaxyl, entrambe acilalanine, sono utilizzate ancor oggi. Il debutto delle fenilammidi avviene con la messa sul mercato di metalaxyl, il primo fungicida sistemico attivo nei confronti degli *Oomycota*. Derivato da una molecola dalle proprietà erbicide, metalaxyl in particolare presenta un  $\log K_{ow}$  pari ad 1,71, valore considerato ideale per il movimento nel sistema xilematico delle piante, che gli consente di redistribuirsi rapidamente in direzione acropeta. La difficoltà fino ad allora incontrata dalle ditte produttrici di agrofarmaci nell'individuare sostanze unisito attive contro gli agenti delle peronosspore e patogeni simili deriva probabilmente dalle differenze a livello di proteina bersaglio tra gli *Oomycota* ed i funghi propriamente detti, nei confronti dei quali erano stati individuati al contrario più molecole unisito dotate di notevole efficacia. Lo spettro d'azione delle fenilammidi è limitato agli *Oomycota*, agenti di peronosspore e marciumi su molte piante coltivate, in particolare a specie appartenenti ai generi *Plasmopara*, *Albugo*, *Bremia*, *Phytophthora*, *Peronospora*, *Pseudoperonospora*, *Sclerospora*, *Sclerophthora* e *Peronosclerospora*. Le fenilammidi vengono quindi utilizzate su un gran numero di colture arboree ed erbacee, nonché sui tappeti erbosi.

Benché commercializzate da quasi 40 anni, ancor oggi non è noto nel dettaglio quale sia il loro meccanismo d'azione: le indagini effettuate hanno individuato nel complesso dell'RNA polimerasi I il bersaglio di questi fungicidi (Davidse e van der Berg-Valthius, 1989). L'RNA polimerasi I è il complesso enzimatico che, nella cellula eucariote, provvede alla trascrizione dei geni che codificano per l'RNA ribosomale (rRNA 5.8S, 18S e 28S) e risulta quindi di fondamentale importanza per lo svolgimento della sintesi proteica. Le fenilammidi non interferiscono con la germinazione degli sporangii, la motilità delle zoospore, il loro incistamento e germinazione, nonché l'infezione e la formazione del primo austorio. Al contrario, esse compromettono la colonizzazione da parte del patogeno nella fase successiva alla differenziazione del primo austorio. Infatti, tanto gli sporangii quanto le zoospore contengono ribosomi sufficienti a supportare la sintesi proteica richiesta per l'esecuzione dei primi stadi del processo infettivo: nella fasi più avanzate, invece, l'azione del fungicida, che blocca la formazione di ulteriori ribosomi, impedisce di fatto che la crescita venga supportata da un'adeguata sintesi proteica. Il notevole successo commerciale delle fenilammidi, ed in particolare di metalaxyl, venne associato in molti areali all'applicazione, spesso consecutiva, di numerosi trattamenti: di conseguenza si selezionarono ceppi resistenti e vennero osservati casi di cali di efficacia in pieno campo. La resistenza alle fenilammidi è monogenica, dovuta ad un singolo gene a dominanza incompleta. La progenie F1, originata da un individuo resistente ed uno sensibile, ha nella maggior parte dei casi una sensibilità intermedia nei confronti del fungicida, mentre dagli incroci tra individui F1 si ottiene una progenie con una ripartizione tra individui sensibili, mediamente sensibili e resistenti pari a 1s:2i:1r (Gisi e Sierozki, 2008). Osservazioni effettuate su *P. viticola* indicano che nel corso della stagione la percentuale di individui resistenti aumenta in modo graduale, diminuisce a fine stagione ed è ulteriormente ridotta all'inizio della stagione vegetativa successiva (Gisi e Cohen, 1996). Ciò ha fatto supporre che la sopravvivenza dei ceppi resistenti possa essere compromessa da condizioni sfavorevoli durante il periodo di svernamento. Condividendo lo stesso meccanismo d'azione, metalaxyl e benalaxyl presentano **resistenza incrociata**, in altre parole ceppi resistenti a una sostanza attiva sono resistenti anche all'altra. Recentemente sono stati introdotti sul mercato formulati contenenti unicamente l'enantioomero attivo, metalaxyl-M denominato mefenoxam, e benalaxyl-M.



**Resistenza incrociata:** resistenza da parte di un ceppo fungino a fungicidi diversi ma caratterizzati da struttura analoga e/o medesimo meccanismo d'azione (Brent e Hollomon, 2007).



I trattamenti alla chioma con fenilammidi vengono effettuati unicamente con miscele che contengono sostanze attive multisito di superficie, quali mancozeb, rame, clorotalonil, in funzione antiresistenza.

### Acetammidi

Sempre nel 1977 viene commercializzato un altro fungicida antiperonosporico penetrante, cymoxanil. Molto solubile in acqua, cymoxanil presenta un  $\log K_{ow}$ , pari a 0,9, che lo rende un eccellente sistemico. Purtroppo cymoxanil viene rapidamente degradato dalla pianta perdendo la sua attività fungicida, tanto che a pochi giorni dalla sua applicazione non ne rimane traccia. Ciò impedisce che venga trasportato a distanza dal punto di penetrazione in quantità tali da poter inibire la crescita del patogeno. Cymoxanil viene quindi considerato un fungicida citotropico e translaminare, a redistribuzione limitata alle zone adiacenti la zona di applicazione. Esso è utilizzato quasi esclusivamente in miscela con altre sostanze attive, sia mono- sia multisito, dotate di persistenza superiore, in modo da poter abbinare la rapidità d'azione di cymoxanil ad una protezione di durata pari ad almeno una settimana. Cymoxanil viene rapidamente assorbito ed esercita la sua attività quasi esclusivamente all'interno della struttura del vegetale. La quantità di fungicida che rimane sulla superficie del vegetale è probabilmente troppo ridotta per consentire l'inibizione del rilascio delle zoospore dagli sporangi, la germinazione delle zoospore e la penetrazione del tubo germinativo attraverso l'apertura stomatica, attività che il fungicida è in grado di svolgere (Howard *et al.*, 1998). Cymoxanil inibisce lo sviluppo del micelio del patogeno ed è in grado di ridurre sensibilmente l'entità della sporulazione.

Il meccanismo d'azione di cymoxanil rimane tuttora sconosciuto: dai dati finora disponibili sembra che il fungicida non inibisca la sintesi proteica, né quella degli acidi nucleici, DNA e RNA, mentre potrebbe essere modificata la sintesi delle basi azotate, in particolare dell'uridina. Nonostante i quasi 40 anni di utilizzo, le segnalazioni che riguardano la presenza di ceppi resistenti sono relativamente poco numerose. A metà degli anni 90 del secolo scorso, ceppi di *P. viticola* resistenti a cymoxanil vennero individuate in Piemonte e soprattutto in Trentino (Gullino *et al.*, 1997), in conseguenza dell'elevato numero di trattamenti effettuati secondo il criterio della 'lotta tempestiva' che consisteva nell'intervenire a sintomo apparente, spesso su sporulazioni già in atto esercitando quindi una elevata pressione di selezione. Rare sono, inoltre, le segnalazioni relative a *P. infestans*. In numerosi vigneti italiani sono stati riscontrati valori di  $EC_{50}$  superiori a 100 mg/L, vicini alla dose di campo di cymoxanil che è pari a 120 g/L, non correlabili in ogni caso con il numero dei trattamenti effettuati né con il livello di protezione conseguito (Genet e Vincent, 1999). Recentemente è stato osservato che i ceppi di *P. viticola* resistenti al cymoxanil sono meno competitivi rispetto ai ceppi sensibili: in assenza di pressione di selezione, in altre parole in assenza di applicazione del fungicida, i ceppi sensibili prendono nel giro di poche generazioni il sopravvento sugli individui resistenti, che tornano a rappresentare una porzione minoritaria della popolazione (Genet e Jaworska, 2013). Ancor oggi cymoxanil rappresenta una sostanza attiva molto utilizzata in miscele a due e tre vie, non solo sulla vite ma anche su svariate orticole.

### Ammidi degli acidi carbossilici (CAA)

Le ammidi degli acidi carbossilici (CAA) sono sicuramente il gruppo più numeroso di antiperonosporici: ad esso appartengono le ammidi dell'acido cinnamico dimethomorph, pyrimorph e flumorph; le valinamidi carbammate benthiavalicarb, iprovalicarb e valifenalate; e l'ammide dell'acido mandelico, mandipropamid. Il primo fungicida commercializzato è stato dimethomorph, seguito da iprovalicarb nel 1998, benthiavalicarb nel 2003, mandipropamid nel 2005 e valifenalate nel 2008. I loro  $\log K_{ow}$  varia dai 2,5 -2,6 di benthiavalicarb e dimethomorph, ai 3,2 di iprovalicarb e mandipropamid. Il valore assunto dal  $\log K_{ow}$  fa supporre che il movimento di queste molecole sia limitato alle zone intorno al punto di applicazione e che si comportino quindi come citotropici e/o translaminari, mentre piuttosto contenuto dovrebbe essere il trasporto per via xilematica, in particolare per quanto concerne mandipropamid e benthiavalicarb. Questi due ultimi fungicidi si legano fortemente alle cere, proprio grazie al loro elevato  $\log K_{ow}$ , resi-

stendo meglio al dilavamento e quindi proteggendo meglio il grappolo. Questi fungicidi unisito presentano uno spettro d'azione limitato agli agenti delle peronosspore e a *Phytophthora* spp., mentre sono del tutto inefficaci nei confronti del genere *Pythium*.

Tutti i CAA condividono lo stesso meccanismo d'azione, che consiste nell'inibizione della formazione della parete. Queste sostanze attive si legano infatti alla proteina CesA3, che fa parte di un complesso costituito da quattro proteine che provvedono alla sintesi e all'assemblaggio delle fibrille di cellulosa che costituiscono il principale componente della parete degli *Oomycota*. CesA3 in forma dimerica determina la formazione di un poro a livello della membrana cellulare che permette l'estrusione delle microfibrille di cellulosa e quindi l'assemblaggio della parete (Blum *et al.*, 2011). Tutte le fasi del ciclo biologico dei patogeni sensibili che prevedono la formazione della parete possono essere inibiti dai CAA: fanno eccezione il rilascio delle zoospore e la loro fase mobile. I CAA sono quindi in grado di inibire la formazione del tubetto germinativo da parte delle zoospore e la crescita miceliare con conseguente formazione degli austori. Inoltre, alcuni di essi sono in grado di ridurre il tasso di sporulazione. La loro attività è quindi sia preventiva sia post-infezionale. Una volta scoperta la proteina bersaglio dei CAA, è stato possibile stabilire che la resistenza è conferita da una mutazione puntiforme nel gene *CesA3* che comporta la sostituzione della glicina in posizione 1105 con una serina (G1105S) o con una valina (G1105V) (Blum *et al.*, 2010). Nonostante i molti anni durante i quali i CAA, ed in particolare dimethomorph, sono stati intensamente impiegati in agricoltura ed in particolare in viticoltura, non sono mai stati segnalati casi eclatanti di perdita di efficacia in campo correlabili con la presenza di ceppi resistenti, ma solo isolamenti di ceppi resistenti in varie zone d'Europa. Una parziale spiegazione della solitamente ridotta frequenza di ceppi resistenti a CAA nelle popolazioni di *P. viticola* può essere data dalla modalità con la quale viene ereditato il carattere di resistenza. Dall'incrocio tra un ceppo sensibile ed un ceppo resistente si ottiene una F1 costituita da individui sensibili. La progenie F2, ottenuta incrociando gli individui F1, mostra una segregazione del carattere resistenza in ragione di 9 sensibili:1 resistente. I CAA sono tra i fungicidi cardine della protezione nei confronti degli agenti delle peronosspore e sono formulati in genere con fungicidi multisito.

### **QoI (Quinone outside Inhibitor: inibitori esterni del chinone)**

Del folto gruppo dei QoI fanno parte molecole appartenenti a diverse famiglie chimiche, ovvero derivati delle strobilurine naturali (azoxystrobin, pyraclostrobin, pycoxystrobin, kresoxim-metile, trifloxystrobin), un imidazolinone (fenamidone) ed un oxazolidinedione (famoxadone). Con la sola eccezione di famoxadone, essi sono tutti in grado di penetrare all'interno della struttura del vegetale e di redistribuirsi almeno localmente (Bartlett *et al.*, 2002). Lo spettro d'azione dei QoI varia in funzione della sostanza attiva considerata: famoxadone e fenamidone sono utilizzati esclusivamente nei confronti di agenti di peronosspore su vite e su alcune orticole; i derivati delle strobilurine sono in grado di inibire patogeni appartenenti a raggruppamenti tassonomici molto distanti tra di loro. Tutte le strobilurine sono attive sia contro *P. viticola* sia nei confronti di *E. necator*, anche se ognuno di essi mostra un'attività più spiccata nei confronti di uno dei due patogeni. Trifloxystrobin, nonostante una moderata attività nei confronti di *P. viticola*, viene in realtà utilizzato come antioidico su vite e contro la ticchiolatura su melo. Su vite le strobilurine hanno inoltre dimostrato una certa efficacia nel contenere i danni dovuti a *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz, l'agente del black rot. Il primo fungicida QoI ad essere commercializzato nel 1992, il più versatile, è azoxystrobin, che risulta efficace anche nei confronti di *Basidiomycota* quali gli agenti delle ruggini ed in particolare di quelle dei cereali. All'epoca della sua commercializzazione, la versatilità di azoxystrobin venne enfatizzata sottolineando la possibilità di ridurre i danni dovuti a più patogeni con un unico trattamento, conseguendo un indubbio risparmio di tempo e di risorse. Ciò si è tradotto in un uso improprio di azoxystrobin e dei QoI in generale, con l'applicazione di sei-sette trattamenti per stagione vegetativa dell'ospite con la stessa sostanza attiva utilizzata da sola. Il risultato è stato che in molte situazioni si è riscontrato un calo di efficacia in campo dovuto alla massiccia presenza di ceppi resistenti. Il deteriorarsi della situazione a causa della presenza dei ceppi resistenti è stato rapido, compromettendo spesso la

concreta possibilità di utilizzare ulteriormente delle molecole dalle straordinarie possibilità. La messa a punto delle strobilurine rappresenta un processo che ha avuto origine con l'isolamento da parte di alcuni studiosi di metaboliti secondari sintetizzati da *Basidiomycota* caratterizzati da un'attività ad ampio spettro, una semplicità di struttura che si prestava alla sintesi di molteplici analoghi e da un meccanismo d'azione prima sconosciuto. L'industria, lavorando su estratti naturali, ha messo a punto sostanze attive che potevano essere utilizzate in pieno campo. I Qol agiscono sulla respirazione mitocondriale reagendo con il sito di legame per l'ubichinolo (Q) situato sul lato esterno della membrana mitocondriale interna (Qo = Quinone outside o ubichinolo esterno) localizzato sul citocromo b del complesso III della catena respiratoria. Il legame del sito reattivo con i Qol inibisce l'ossidazione dell'ubichinolo a ubichinone e, di fatto, la respirazione e la produzione di energia da parte dell'organismo bersaglio. Le fasi di vita del patogeno che richiedono un elevato dispendio di energia sono particolarmente suscettibili all'azione dei Qol, che inibiscono con notevole rapidità in particolare la germinazione delle spore, ma sono anche attivi sulla crescita miceliare. La resistenza ai Qol è associata a mutazioni puntiformi nel gene che codifica per il citocromo b ed in particolare due che portano nella corrispondente proteina alla sostituzione rispettivamente di una fenilalanina con una leucina in posizione 129, F129L, o di una glicina con un'alanina in posizione 143, G143A. Quest'ultima sostituzione viene frequentemente ritrovata nei basidiomiceti, che si proteggono nei confronti dei metaboliti secondari da essi stessi prodotti, ed è quella più frequente tra i ceppi resistenti di *P. viticola*, *V. inaequalis*, *Blumeria graminis* (DC.) Speer. L'alanina ha un ingombro sterico maggiore rispetto alla glicina e quindi rende difficoltoso il legame tra i Qol e il sito bersaglio. Il citocromo b, è codificato da un gene mitocondriale cosa che fa sì che l'ereditarietà del carattere di resistenza a questi fungicidi non sia quella mendeliana tipica dei caratteri codificati a livello nucleare, come per quanto avviene con i CAA. Il genoma mitocondriale è fornito totalmente dal progenitore femminile, che, se resistente, conferisce questa caratteristica a tutta la prole (Gisi *et al.*, 2002). Benché presente in vari patogeni, la mutazione che porta a G143A non provoca sempre la perdita di efficacia del Qol utilizzato: ciò si verifica ad esempio nel caso di *E. necator*, le cui popolazioni sono tuttavia ancora sensibili a questi fungicidi. È probabile che il diverso comportamento dei patogeni mutati sia dovuto a variazioni della fitness degli individui, che solo in alcuni casi sono in grado di competere con la popolazione sensibile. I fungicidi Qol sono formulati sia da soli sia in miscela con sostanze attive multisito e monosito.

### **Qil (Quinone inside Inhibitor: inibitori interni del chinone)**

Cyazofamid e amisulbrom, di recente introduzione sul mercato, sono gli unici rappresentanti dei Qil. Anche i Qil sono in grado di inibire la respirazione mitocondriale a livello del complesso III, interagendo però con il sito di legame dell'ubichinone localizzato sul lato interno (Qi=quinone inside) della membrana mitocondriale interna (Mitani *et al.*, 2001). Al contrario di quanto rilevato per i Qol, i Qil hanno uno spettro d'azione molto ridotto: sono infatti efficaci solo nei confronti degli agenti delle peronosspore. Si tratta di fungicidi di superficie incapaci di penetrare all'interno dei tessuti del vegetale, che svolgono un'azione preventiva inibendo la germinazione delle zoospore incistate e quindi la penetrazione del tubo germinativo. I Qil non presentano resistenza incrociata con i Qol. Un fungicida da poco posto in commercio, ametoctradin, agisce anch'esso inibendo la respirazione mitocondriale: recenti indagini hanno evidenziato che il suo sito di legame è localizzato a livello di Qo, ma in posizione diversa rispetto a quello che consente la reazione con i Qol. Il sito di legame con ametoctradin potrebbe essere lo stesso della stigmatellina, un potente inibitore dell'ossidazione dell'ubichinolo. Questi nuovi inibitori della respirazione mitocondriale vengono venduti sia da soli, come cyazofamid che viene miscelato con un generico corroborante organico, sia in miscela con altri fungicidi mono o multisito.

### **Zoxamide**

Zoxamide presenta un meccanismo d'azione unico nel suo genere in quanto legandosi alla tubulina impedisce di fatto il regolare svolgimento della divisione nucleare. La tubulina è una protei-

na dimerica costituita da due subunità,  $\alpha$  e  $\beta$ , ed è la principale componente dei microtubuli che costituiscono anche il fuso mitotico. Zoxamide impedisce la formazione dei microtubuli, formando un legame covalente molto specifico con la cisteina posta in posizione 239 della subunità  $\beta$  della tubulina. Questo stesso meccanismo d'azione era tipico dei benzimidazoli ed in particolare del benomyl, che risultavano attivi su tutti i patogeni fungini ad eccezione di quelli appartenenti agli *Oomycota*. Benché utilizzato commercialmente solo nei confronti degli *Oomycota*, in realtà zoxamide ha uno spettro più ampio che include: *B. cinerea*, *V. inaequalis*, *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet e *Cercospora beticola* Sacc. Zoxamide presenta un  $\log K_{ow}$  pari a 3,76, che indica una notevole affinità per i solventi organici. Una volta distribuita zoxamide rimane sulla superficie della pianta, legandosi strettamente alle cere. Questa caratteristica la rende particolarmente adatta alla protezione del grappolo nelle fasi più avanzate della sua formazione. Zoxamide è un tipico fungicida di superficie in grado di svolgere unicamente attività preventiva. La sua attività inibitoria riguarda l'allungamento del tubo germinativo e la crescita miceliare, nonché la formazione delle zoospore all'interno dello sporangio, in altre parole le fasi di sviluppo del patogeno che prevedono un'intensa divisione nucleare, mentre non interferisce con la mobilità delle zoospore, il loro incistamento e l'inizio della germinazione. Finora non sono stati segnalati casi di ceppi resistenti. Zoxamide è commercializzata sia da sola sia in miscela soprattutto con fungicidi multisito.

### Fluopicolide

Flupicolide appartiene ad una nuova classe di fungicidi, le piridinilmetilbenzammidi, ed è attivo nei confronti di molti generi di *Oomycota* compresi *Phytophthora* e *Pythium*. Flupicolide viene utilizzato per limitare i danni causati dagli agenti delle peronosspore, ma anche da oomiceti che provocano marciumi. Non è stata rilevata resistenza incrociata nei confronti di altri fungicidi che presentano lo stesso spettro d'azione, cosa che ha lasciato supporre che il meccanismo d'azione di flupicolide fosse del tutto nuovo (Toquin *et al.*, 2006). Uno degli effetti più evidenti di flupicolide è stato osservato sulle zoospore: l'applicazione del fungicida a zoospore di *P. infestans* determina nel giro di un minuto l'arresto del movimento, il rigonfiamento e la lisi delle zoospore. Anche la crescita miceliare viene inibita e le ife trattate mostrano segni di disorganizzazione interna seguita da lisi.

Il meccanismo d'azione di flupicolide è ancora in fase di studio, così come la vera e propria proteina bersaglio. Le indagini effettuate hanno indicato che l'attività fungicida di flupicolide è strettamente correlata alla sua capacità di interagire con le proteine associate con il citoscheletro. Tra le proteine bersaglio più probabili di flupicolide si annoverano le cosiddette proteine spettro simili, ovvero proteine simili alle spettroline delle cellule animali: queste proteine sono localizzate nelle membrane e contribuiscono a garantirne la stabilità ancorandosi ad altre proteine del citoscheletro. Studi di immunofluorescenza hanno consentito di osservare una completa delocalizzazione delle spettroline, che si spostano dalla membrana plasmatica al citoplasma del micelio e delle zoospore di *P. infestans*, a seguito dell'applicazione di flupicolide. In tal modo viene compromessa la stabilità e l'integrità delle membrane con conseguente lisi cellulare. Ulteriori indagini devono essere svolte da un lato per caratterizzare le spettroline fungine dal punto di vista molecolare e funzionale, e dall'altro per comprendere se la flupicolide interagisce con esse direttamente. La presenza di ceppi resistenti in pieno campo non è ancora stata segnalata, ma sono stati intrapresi studi per cercare di stimare il rischio potenziale di selezione di ceppi resistenti. Individui resistenti di *Phytophthora capsici* Leonian sono stati ottenuti facendo germinare sospensioni di zoospore su terreni nutritivi contenenti 5  $\mu\text{g/mL}$  di flupicolide: ciò ha consentito inoltre di calcolare il tasso di mutazione rapportando il numero di individui resistenti al totale delle zoospore germinate. I ceppi resistenti si mantengono tali anche in assenza di pressione di selezione, indicando chiaramente che la resistenza è conseguenza di una caratteristica genetica: la resistenza a flupicolide sembra regolata da geni semidominanti. La fitness dei ceppi resistenti è del tutto simile a quella degli individui sensibili e la frequenza di individui resistenti è abbastanza elevata, pari a  $10^{-7}$  (Lu *et al.*, 2011). Questi risultati sono stati riconfermati anche da indagini

effettuate su *Pseudoperonospora cubensis* Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev (Wang *et al.*, 2014) e devono indurre a gestire in modo oculato l'utilizzo di fluopicolide in pieno campo. Fluopicolide, il cui  $\log K_{ow}$  pari a 2,2 fa supporre si tratti di un fungicida sistemico, viene commercializzato in miscela con fosetyl-Al, propineb e propamocarb da applicare su vite e numerose ortive.

### **Carbossamidi o SDHI**

Le carbossamidi esplicano la loro azione fungicida a livello della respirazione mitocondriale a livello del complesso II, interferendo con l'attività della succinato idrogenasi (SDH), e vengono pertanto denominate anche SDHI (Succinate Dehydrogenase Inhibitors - inibitori della succinato deidrogenasi). La SDH catalizza l'ossidazione del succinato a fumarato nel ciclo di Krebs mediante l'uso di un trasportatore: la flavina adenina dinucleotide (FAD). Questa reazione, nel contempo, comporta la riduzione dell'ubichinone ad ubichinolo grazie alla produzione di elettroni utili per il proseguimento della catena verso il complesso III. La SDH è composta da quattro subunità (A, B, C, D). Nella sub-unità A si trova il FAD, che cattura gli elettroni rilasciati dall'ossidazione del succinato e li incanala nella sub-unità B, la quale è costituita da ferro-proteine che provvedono al trasporto degli elettroni verso l'ubichinone. Quest'ultimo presenta un sito di legame altamente conservato nell'interfaccia tra la subunità che fornisce gli elettroni e le rimanenti subunità, C e D, legate alla membrana. Le carbossamidi competono con l'ubichinone per il legame con tale sito, formato dalle subunità B, C e D, interrompendo la catena di trasporto degli elettroni (Earley, 2007).

Alle carbossamidi appartengono carboxin e oxycarboxin, utilizzati soprattutto per la concia del seme ed attivi nei confronti di *Basidiomycota* ed in particolare *Rhizoctonia* spp. La sostanza attiva antibotritica di più recente sintesi, boscalid, presenta uno spettro d'attività più ampio che include numerosi *Ascomycota* tra i quali si annoverano *B. cinerea* e *V. inaequalis*. L'impiego di boscalid è relativamente recente e pertanto le informazioni sull'eventuale presenza di ceppi resistenti sono ancora in via di definizione.

### **Anilinpirimidine (AP)**

Sostanze attive appartenente a questa classe di molecole sono state registrate per la prima volta come fungicidi nel 1981 dalla VEB Fahlberg-List Magdeburg, nella ex Repubblica Democratica Tedesca. A seguito di ricerche effettuate negli anni precedenti, tra il 1992 e 1995 sono stati introdotti sul mercato in successione pyrimethanil, cyprodinil e mepanipyrim. La loro attività biologica si esplica esclusivamente sui miceti appartenenti agli *Ascomycota*, ed in particolare su importanti patogeni quali *B. cinerea*, *Pyrenophora teres* (Died.) Drechsler, *V. inaequalis* e *Rhynchosporium secalis* (Oudem) Davis (Muller *et al.*, 1998). L'uso in vigneto di queste sostanze attive si è rivelato molto efficace anche nei confronti dei miceti responsabili dell'accumulo di ocratossina A (Vercesi e Piccolo, 2007). Le anilinpirimidine esplicano la propria attività inibendo la germinazione dei conidi, la formazione di appressori e la crescita miceliare e riducono la secrezione di enzimi idrolitici da parte del patogeno. Si tratta di fungicidi penetranti, che possono quindi contrastare efficacemente la formazione di austori e micelio intercellulare. L'azione post-infezionale delle anilinpirimidine nei confronti di *V. inaequalis* si esplica fino a tre giorni dopo l'avvenuta penetrazione.

Le sostanze attive classificabili come anilinpirimidine sono in grado di bloccare, con un meccanismo di azione monosito, la sintesi della metionina (Masner *et al.*, 1994; Leroux *et al.*, 1995), probabilmente inibendo l'enzima responsabile della sintesi di cistationina a partire da cisteina o da acetilmoserina. Due diverse mutazioni puntiformi, S24P e I64V, sono state indicate quali determinanti della resistenza in *B. cinerea* (Sierotzki *et al.*, 2002). La presenza di ceppi del patogeno resistenti alle anilinpirimidine è stata evidenziata in Francia ed in Italia (Forster *et al.*, 1995), ma la loro diffusione sembra essere piuttosto limitata. In effetti, l'impiego di due, al massimo tre interventi per stagione e di miscele dovrebbero costituire misure efficaci per contenere l'aumento della frequenza degli individui resistenti.

## Fenilpirroli

La più nota sostanza attiva appartenente ai fenilpirroli, è il fludioxonil. La sintesi di fludioxonil, messa a punto da Ciba-Geigy nel 1990, è stata effettuata seguendo una nuova tendenza nel campo della ricerca di nuove molecole ad attività fungicida, che consiste nel modificare la struttura dei metaboliti secondari sintetizzati in natura da funghi e batteri e che porterà alla commercializzazione delle strobiline. Nel caso di fludioxonil, la molecola modello è rappresentata dalla pirrolnitrina, metabolita secondario prodotto da *Pseudomonas* spp. Attivo nei confronti di numerosi funghi patogeni agenti di marciumi di semi e frutti, fludioxonil ha evidenziato un'elevata efficacia nei confronti di *B. cinerea* su vite e su altre colture frutticole ed orticole. Il fungicida non è dotato di capacità penetrante: dopo il trattamento, circa il 90% della sostanza attiva è stato ritrovato sulla superficie vegetale, mentre il restante 10% si è spinto nello strato ceroso della cuticola. Fludioxonil viene utilizzato in miscela con cyprodinil.

Il fungicida inibisce la germinazione delle spore di *B. cinerea* ed influisce negativamente anche sulla crescita miceliare. Fludioxonil interferisce con il meccanismo che regola le risposte dei miceti a cambiamenti delle condizioni osmotiche dell'ambiente di sviluppo. Diversi studi hanno dimostrato, in particolare, che le proprietà fungicide di fludioxonil si esplicano solo in presenza di una piena funzionalità dell'istidina chinasi, una proteina transmembrana in grado di variare la propria fosforilazione in risposta alle condizioni osmotiche ambientali (Corran, 2007). La defosforilazione dell'istidina chinasi in condizioni di elevata pressione osmotica esterna porta, attraverso una serie di reazioni a catena, alla sintesi degli enzimi coinvolti nella sintesi di glicerolo, che permette alla cellula di compensare la pressione osmotica ambientale. Al contrario, la fosforilazione dell'istidina chinasi in condizioni osmotiche opposte, inibisce la corrispondente sintesi di glicerolo. La maggior parte dei ceppi resistenti alle dicarbossimidi ottenuti in laboratorio è resistente anche a fludioxonil, mentre la maggior parte dei ceppi resistenti alle dicarbossimidi isolati da campioni raccolti in campo è al contrario inibita da fludioxonil (Leroux *et al.*, 1999). È stato ipotizzato che la resistenza ai fenilpirroli venga conferita da geni diversi rispetto a quelli da cui dipende la resistenza alle dicarbossimidi, e che probabilmente la resistenza a fludioxonil sia associata a mutazioni che interessano almeno uno dei due geni (Ziogas *et al.*, 2005).

## Inibitori della biosintesi degli steroli (IBS) - DMI

Gli inibitori della biosintesi degli steroli (IBS) rappresentano un consistente gruppo di fungicidi che agiscono a livello diverso sulla sintesi dell'ergosterolo, la componente dominante delle membrane cellulari fungine. I composti IBS sono efficaci nei confronti degli Asco- e Basidiomiceti, che possiedono tutto il complesso enzimatico atto a produrre ergosterolo a partire da Acetil-CoA, mentre risultano del tutto inattivi nei confronti degli *Oomycota*, i quali non sono dotati della capacità di sintetizzare gli steroli *de novo* ma metabolizzano precursori sintetizzati dall'ospite che parassitizzano (Kuck *et al.*, 2012). Gli IBS comprendono più di 40 sostanze attive diverse, raggruppate in 4 classi in funzione della modalità di interferenza con la sintesi degli steroli. Il processo, che porta alla sintesi dell'ergosterolo a partire dallo squalene, coinvolge 11 enzimi.

I DMI (DeMethylase Inhibitors -inibitori della demetilazione) raggruppano le sostanze attive afferenti alla classe I degli IBS, le quali esercitano la propria attività antifungina inibendo l'attività dell'enzima sterolo C14 demetilasi. La classe dei DMI raggruppa diverse classi chimiche introdotte sul mercato tra la fine del 1960 e i primi anni 2000: piperazine e pirimidine, commercializzati per primi e seguiti in ordine cronologico da imidazoli, piridine e triazoli. Molti dei fungicidi appartenenti alle prime quattro classi sono utilizzati prevalentemente su colture ornamentali o a foglia larga, prochloraz sui cereali (Kuck e Vos, 2012). La classe dei triazoli comprende un esteso numero di sostanze attive, introdotte progressivamente sul mercato a partire dal 1976 con triadimefon, utilizzato per il contenimento di agenti di oidio e ruggini. I triazoli vengono generalmente impiegati su piante erbacee (cereali e orticole) e arboree (vite, melo e pero) e presentano uno spettro di azione estremamente ampio, che comprende, ad esempio, gli agenti di ruggine, oidio e septoriosi ma anche agenti di fusariosi della spiga (bromoconazolo, metconazolo) e alternariosi sui vegetali (bromuconazolo). Possono, inoltre, essere impiegati per il



trattamento su foglia o spiga o per la concia dei semi. Tra i triazoli introdotti prima del 1990 si ricordano bitertanol, utilizzato nei confronti di *V. inaequalis*, e penconazolo, utilizzato per la protezione simultanea da oidio e ticchiolatura del melo e dall'oidio su vite. Ai più recenti triazoli appartengono, tra gli altri: fenbuconazolo, efficace nei confronti di numerosi patogeni tra i quali si trovano gli agenti di ticchiolatura e oidio di pero e melo, ma anche ruggini, oidii in genere e alterazioni fogliari varie dei cereali; tetraconazolo, dalla spiccata sistemicità, utilizzato nei confronti di oidio e ruggine sui cereali; prothioconazolo usato per il contenimento di ruggini (*Puccinia triticina* Erikss.), oidio (*B. graminis* f.sp. *tritici*) e fusariosi della spiga; e infine myclobutanil, utilizzato per trattamenti su foglia prevalentemente su alberi da frutto ma anche su pomodoro. Nonostante l'ampia diffusione degli IBS, la resistenza nei loro confronti si è manifestata parecchi anni dopo la loro commercializzazione. Essa è, infatti, una resistenza quantitativa, poligenica, che comporta un graduale spostamento verso una ridotta sensibilità. Pertanto, il rischio di resistenza per tutti gli IBS è considerato medio-basso e di facile gestione mediante l'applicazione di strategie antiresistenza anche perché, con l'eccezione delle classi I e II, in generale, ceppi fungini resistenti ad una classe degli IBS sono sensibili alle altre. Il meccanismo di resistenza proposto per *V. inaequalis*, ad esempio, si basa su numerose mutazioni nel gene *CYP51* che codifica per la 14 $\alpha$ -demetilasi, enzima chiave del processo di sintesi dell'ergosterolo che catalizza la 14 $\alpha$ -demetilazione del lanosterolo, sulla sovraespressione del gene *CYP51* e sull'attivazione di meccanismi di espulsione del fungicida nelle cellule fungine (Schnabel e Jones, 2001).

### **Inibitori della biosintesi degli steroli (IBS) - Idrossianilidi**

Le molecole definite idrossianilidi rientrano nella terza classe degli inibitori della sintesi degli steroli (IBS), alla quale afferiscono i composti che interferiscono con l'attività della C3-cheto riduttasi causando una carenza di ergosterolo che impedisce la sintesi delle membrane cellulari e determina il progressivo deterioramento di quelle esistenti. L'attività fungicida delle idrossianilidi venne scoperta nel corso di sperimentazioni relative a composti erbicidi e portò alla sintesi di fenhexamid. Questa sostanza attiva, contrariamente agli altri IBS, ha uno spettro di attività ridotto, limitato di fatto ai generi *Botrytis*, *Sclerotinia* e *Monilia* (Papin *et al.*, 1990). Nei ceppi sensibili si accumula fecosterone, a conferma della capacità del composto di inibire la C3-cheto riduttasi (Kuck e Vors, 2007). Fenhexamid esercita la propria azione inibente sull'allungamento del tubetto germinativo e sulla crescita miceliare.

I ceppi di *B. cinerea* resistenti a fenhexamid isolati dal campo prima dell'introduzione della sostanza attiva sul mercato si differenziano tra di loro in relazione allo stadio di sviluppo: durante la crescita del micelio, infatti, i ceppi resistenti sono totalmente insensibili a fenhexamid, mentre durante l'allungamento del tubetto germinativo essi si mostrano sensibili al fungicida. Per contro, altri individui presentano un elevato livello di resistenza in entrambi gli stadi di sviluppo (Leroux, 2004).

### **Dodina**

La guanidina dodina è un fungicida ad ampio spettro, caratterizzato da un'elevata attività protettiva ma anche curativa, utilizzato da più di 40 anni. Tuttavia, rimane ancora sconosciuto il meccanismo d'azione. I primi casi di resistenza nei confronti di dodina risalgono al 1969, con il riscontro di problemi nel contenimento delle epidemie di *V. inaequalis* associati all'isolamento di ceppi con EC<sub>50</sub> 4-5 volte superiori a quelli della dose di impiego della dodina in meleti dello stato di New York, negli Stati Uniti (Brent, 2012). Va sottolineato che tali problemi insorsero dopo un decennio di utilizzo continuativo della molecola e che la resistenza nei confronti di dodina è di tipo quantitativo, fondata sull'effetto additivo di almeno due geni, ed è probabilmente associata a meccanismi di espulsione della sostanza attiva da parte della cellula fungina (de Waard *et al.*, 2006).



## LA RESISTENZA IN LOMBARDIA

Di seguito vengono riportati i risultati dell'attività triennale di monitoraggio e caratterizzazione della resistenza in popolazioni di *P. viticola*, *B. cinerea* e *V. inaequalis* isolate nei principali areali viticoli e frutticoli della Lombardia.

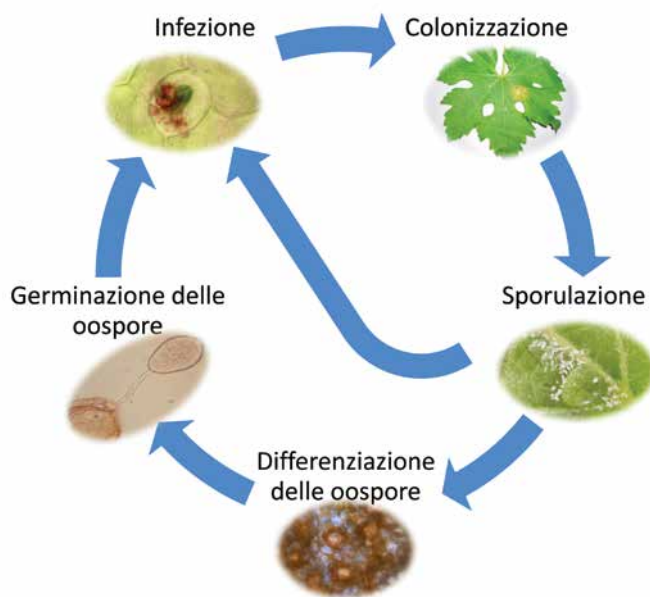
La resistenza nei confronti delle sostanze attive ad attività antifungina è stata valutata mediante saggi volti ad evidenziare scostamenti di individui o popolazioni dai livelli di sensibilità di popolazioni/ceppi di riferimento, oppure dai valori di sensibilità disponibili in letteratura (Russell, 2004). Il parametro utilizzato in generale per tale confronto è stato l' $EC_{50}$ , ovvero la concentrazione di sostanza attiva in grado di determinare l'inibizione di un particolare processo nella misura del 50 % rispetto a quanto osservato in assenza del fungicida (Oliver e Hewitt, 2014). Nel caso particolare della resistenza ai Qol e ai CAA in *P. viticola* è, invece, stato possibile effettuare test che consentono di discriminare la presenza/assenza di resistenza al fungicida utilizzando dosi discriminanti della sostanza attiva. In altri termini, una risposta positiva in presenza di una precisa concentrazione di fungicida prevede una ridotta sensibilità nei confronti dello stesso (Oliver e Hewitt, 2014).

### 1. PLASMOPARA VITICOLA (BERK. ET CURT.) BERLESE E DE TONI

*Plasmopara viticola* è l'agente eziologico della peronospora della vite, una malattia che, se non adeguatamente contenuta, è in grado di compromettere la produzione sia dal punto di vista quantitativo, a causa della perdita dei grappoli, sia da quello qualitativo, poiché il danno inflitto alle foglie determina una minore presenza di zuccheri nelle uve. *P. viticola* è un patogeno policiclico, in grado cioè di effettuare un numero di cicli di infezione variabile in funzione delle condizioni climatiche. Particolarmente favorevoli risultano le annate caratterizzate da temperature miti e piogge frequenti. Fino a pochi anni fa, *P. viticola* era compresa nel regno dei Funghi, nella classe degli *Oomycetes*, che riuniva tutti i funghi dotati di zoospore eteroconti e la cui riproduzione sessuata comportava la formazione di oospore (Webster, 1980). Nel 2001 studi approfonditi sulle caratteristiche di tale gruppo tassonomico fecero sì che Dick (2001) proponesse la separazione degli *Oomycetes* dagli *Eumycota*, classificandoli nel nuovo regno degli *Straminipila*. *P. viticola* è un patogeno considerato ad elevato rischio di resistenza, poiché è in grado di effettuare più cicli di riproduzione asessuata durante la stagione vegetativa dell'ospite ed è dotata di un elevato tasso di dispersione tramite spore (Hollomon e Brent, 2009): questi fattori comportano da un lato l'applicazione di numerosi trattamenti, e quindi il rischio di selezionare ceppi resistenti se si utilizzano fungicidi dotati dello stesso meccanismo d'azione e quindi appartenenti alla medesima classe di resistenza, e dall'altro una veloce diffusione degli stessi.

Le infezioni primarie hanno inizio in primavera, con la germinazione delle oospore, ovvero le strutture sessuate del patogeno che si differenziano al termine della stagione vegetativa della vite e consentono la sopravvivenza del patogeno in assenza del proprio ospite (Agrios, 2005). Le oospore germinano emettendo un tubetto germinativo all'apice del quale si differenzia un macrosporangio piriforme, all'interno del quale si formano zoospore biflagellate in grado di infettare i tessuti suscettibili dell'ospite per via stomatica, dando così origine alle infezioni primarie (**Figura 1.1**). All'interno dei tessuti della vite, *P. viticola* dà luogo alla formazione di un micelio cenocitico con austori deputati all'assorbimento delle sostanze nutritive dell'ospite. Al termine del periodo di incubazione, il parassita emette sempre per via stomatica i propri organi di riproduzione asessuata, gli sporangi, all'interno dei quali si differenziano zoospore che determinano cicli di infezione secondari.

I viticoltori e i tecnici del settore dispongono oggi di diversi mezzi, anche di natura agronomica, per contrastare e prevenire la recettività al patogeno, ma non c'è dubbio che in questo momento non siano ottenibili risultati soddisfacenti senza l'ausilio dei mezzi chimici (Gisi e Sierotzki, 2008). Infatti, la vite europea, *V. vinifera*, è particolarmente suscettibile nei confronti di *P. viticola* e comprende le cv che sono più diffuse nella viticoltura mondiale (This et al., 2006).



**Figura 1.1** Ciclo vitale di *P. viticola*

*P. viticola* è un parassita obbligato della vite, in grado cioè di svilupparsi attivamente solo in presenza di cellule vive del proprio ospite, che intrattiene con l'ospite un rapporto di tipo biotrofico mediato dall'austorio. L'esistenza di un così stretto legame con l'ospite colonizzato ostacola tuttora gli studi ad esso relativi, poiché risulta impossibile coltivare *P. viticola* su substrati nutrizionali *in vitro*.

Le caratteristiche biologiche del patogeno condizionano pertanto gli studi relativi alla resistenza ai fungicidi, che vengono generalmente effettuati a livello di popolazione e non di singolo individuo. Essi sono di tipo qualitativo, poiché consentono di stimare il valore di  $EC_{50}$  medio della popolazione ma non di conoscere la diffusione degli individui resistenti all'interno della stessa. Per poter avere una valutazione quantitativa basata sull' $EC_{50}$  bisognerebbe analizzare il comportamento di un numero significativo di singoli ceppi. Tuttavia, la coltura e il mantenimento del patogeno, necessari per la propagazione di singoli ceppi e per l'ottenimento di sospensioni di sporangii, sono strettamente dipendenti dalla disponibilità di tessuti fogliari di vite durante tutto il periodo di studio: ciò comporta la disponibilità di serre condizionate nelle quali allevare in modo continuativo piante di vite dalle quali prelevare foglie suscettibili. Un approccio simile, basato sull'isolamento e la propagazione di singoli ceppi, non è adatto all'analisi di un elevato numero di campioni poiché rende le analisi troppo laboriose e poco redditizie in termini di tempo impiegato per l'ottenimento dei risultati.

La sensibilità delle popolazioni di *P. viticola* nei confronti dei fungicidi è comunemente stimata in funzione dei valori di  $EC_{50}$  ottenuti in saggi biologici effettuati prelevando in vigneto campioni fogliari dai quali vengono isolati gli sporangii presenti sulla pagina inferiore (Sierotzki *et al.*, 2005). Tale metodica consente di monitorare la popolazione di *P. viticola* esistente in vigneto nel periodo di applicazione dei fungicidi, quando la pressione di selezione è massima e quindi i fenotipi resistenti sono più diffusi. Al contrario, il monitoraggio della resistenza effettuato sulle oospore, che costituiscono l'unica fonte di inoculo per il patogeno nella stagione successiva a quella di formazione, fornisce informazioni sulla popolazione del patogeno presente in vigneto alla fine della stagione vegetativa della vite, la quale è, quindi, costituita da tutti i genotipi sopravvissuti in conseguenza all'applicazione dei fungicidi. Inoltre esso ha il vantaggio di fornire informazioni sulla sensibilità alle sostanze attive di interesse già nel mese di marzo, consenten-

do, inoltre, la pianificazione, in anticipo rispetto all'inizio della stagione vegetativa della vite, di strategie di intervento nei confronti del patogeno in grado di contenere il fenomeno della resistenza mediante una diminuzione della pressione di selezione (Toffolatti *et al.*, 2007). Nel corso del presente studio è stata valutata la sensibilità delle popolazioni di *P. viticola* nei confronti di sostanze attive appartenenti alla classe dei Qol (azoxystrobin), fenilammidi - PA (metalaxyl), CAA (mandipropamid), Qil (cyazofamid), cymoxanil, fluopicolide e zoxamide. I saggi di resistenza sono stati svolti valutando la germinabilità delle oospore, ovvero delle strutture svernanti, in presenza delle sostanze attive. Sono quindi state calcolate la percentuale di oospore resistenti, per quanto riguarda azoxystrobin e mandipropamid, e la concentrazione in grado di inibire la germinazione delle oospore nella misura del 50% rispetto al controllo (EC<sub>50</sub>) per quanto riguarda metalaxyl, cymoxanil, cyazofamid, fluopicolide e zoxamide.

## 1A. MATERIALI E METODI

### SITI E MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO

Nel corso dell'attività di monitoraggio sono stati analizzati 26 vigneti situati nelle province di Brescia, Mantova, Sondrio e Pavia (**Tabella 1.1-1.3**). Di questi vigneti, 4 (SO, BE, CTC e PIZ) sono stati monitorati nel corso di tutto il progetto, 1 (OLF) per due annate consecutive. I trattamenti effettuati in vigneto sono riportati nelle **Tabella 1.1-1.3**.

### ALLESTIMENTO E SVERNAMENTO DEI CAMPIONI DI OOSPORE

Nel mese di ottobre di ciascun anno sono state raccolte foglie di vite che mostravano sintomi di peronospora a mosaico avendo cura di effettuare prelevamenti casuali su tutto l'appezzamento considerato.

Le foglie raccolte sono state esaminate al microscopio ottico (Primo Vert, Zeiss) ad un ingrandimento pari a 4x allo scopo di individuare e ritagliare, con l'ausilio di un bisturi, le zone a maggior concentrazione di oospore. Per ciascun vigneto di provenienza sono stati allestiti otto campioni, ciascuno costituito da cinquanta frammenti racchiusi in un sacchetto di nylon con pori dal diametro pari a 100 µm. I campioni sono stati svernati in condizioni controllate in laboratorio, su un substrato sabbioso in condizioni di umidità costante, pari al 30 % del peso del substrato, a 5 °C e in assenza di luce.

**Tabella 1.1.** Vigneti campionati nel 2011 e relativi trattamenti antiperonosporici. In grassetto le sostanze attive non applicate in miscela.

Sigla	Comune	Trattamenti antiperonosporici 2011	Sostanze attive monosito impiegate
BOA	Boario (BS)	4 rame 2 dimethomorph+rame 3 fosethyl-Al+fluopicolide	2 CAA + 3 FLUOPICOLIDE
CJ	Sirmione (BS)	2 metalaxyl M+mancozeb 3 fosethyl-Al+fluopicolide 1 dimethomorph+rame 6 rame	2 PA + 3 FLUOPICOLIDE + 1 CAA
FRA	Monterotondo di Passirano (BS)	3 rame 1 dimethomorph+rame 1 fosethyl-Al+fluopicolide 1 fosethyl-Al+fluopicolide + dimethomorph 2 iprovalicarb+rame	4 CAA + 2 FLUOPICOLIDE
PIZ	Passirano (BS)	10 rame	TNT (biologico)
CVM	Loc. Case Vecchie, Monzambano, (MN)	1 metiram 2 dithianon 2 dimethomorph+dithianon 1 fosethyl-Al+iprovalicarb+fenamidone 1 fosethyl-Al+fenamidone 1 fosethyl-Al 1 cyazofamid 3 rame	4 CAA + 2 Qol + <b>1 Qil</b>
MNM	Mantova (MN)	3 metalaxyl M+rame 4 rame	3 PA

ALS	Albosaggia (SO)	1 mandipropamid+mancozeb 3 metalaxyl+folpet 1 cyazofamid + dimethomorph 1 cyazofamid + rame 1 rame	1 CAA + 3 PA + 2 Qil
TFS	Teglio (SO)	2 foseethyl-Al+iprovalicarb+mancozeb 2 metalaxyl+mancozeb 3 dimethomorph+rame 2 mandipropamid+rame 2 rame	7 CAA + 2 PA
DSS	Dossi Salati (SO)	2 mandipropamid+folpet 1 metalaxyl+folpet 1 dimethomorph+mancozeb 2 zoxamide+rame 1 dimethomorph+rame 1 rame	4 CAA + 1 PA + 2 ZOXAMIDE
CGS	Castione Grigioni (SO)	3 foseethyl-Al+fluopicolide 6 dimethomorph+rame	6 CAA + 3 FLUOPICOLIDE
SO	Sondrio (SO)	1 zoxamide+rame 1 dimethomorph+rame 1 rame	1 CAA + 1 ZOXAMIDE
VPG	Pietra de' Giorgi (PV)	6 mancozeb 1 dimethomorph+mancozeb 1 cymoxanil+mancozeb 1 cymoxanil	1 CAA + 1 CYMOXANIL + <b>1 CYMOXANIL</b>
CTC	Torrazza Coste(PV)	1 cymoxanil+mancozeb 1 dimethomorph+mancozeb 2 benthiaivalicarb+folpet 4 dimethomorph+rame 2 rame	1 CYMOXANIL + 7 CAA
BE	S. Maria della Versa (PV)	1 dimethomorph+Rame	1 CAA

**Tabella 1.2.** Vigneti campionati nel 2012 e relativi trattamenti antiperonosporici. In grassetto le sostanze attive non applicate in miscela.

Sigla	Comune	Trattamenti antiperonosporici 2011	Sostanze attive monosito impiegate
CAP	Capriano (BS)	1 rame 1 dimethomorph+ mancozeb+rame 1 iprovalicarb+rame 1 cyazofamid 2 foseethyl-Al+fluopicolide 4 rame	2 CAA + 1 FLUOPICOLIDE + <b>1 Qil</b>
PIZ	Passirano (BS)	8 rame	-
ALT	Gonzaga (MN)	2 mandipropamid+mancozeb 3 metalaxyl M + mancozeb 6 rame	2CAA + 3 PA
OLF	Monzambano (MN)	3 dimethomorph + mancozeb 3 metalaxyl M + mancozeb 1 dimethomorph + mancozeb 5 rame	4 CAA + 3 PA
NER	Chiuvo (SO)	3 benalaxyl+mancozeb 1 fenamidone+foseethyl-Al+iprovalicarb 2 zoxamide+rame 3 rame	2 CAA + 3 PA + 2 ZOXAMIDE + 1 Qol
NEG	Chiuvo (SO)	2 foseethyl-Al+fluopicolide 1 dimetomorph+rame 1 foseethyl-Al+fluopicolide 1 mandipropamid +rame 1 dimethomorph+rame 2 cyazofamid 2 foseethyl-Al+rame 1 rame	3 CAA + 3 FLUOPICOLIDE + <b>2 Qil</b>
SO	Sondrio (SO)	1 dimethomorph + rame 2 rame	1 CAA

CTC	Torrazza Coste (PV)	1 mancozeb+ cymoxanil 1 dimethomorph+mancozeb 1 mancozeb+metalaxyl 1 zoxamide+rame 4 rame	1 CAA + 1PA + CYMOXANIL + 1 ZOXAMIDE
MAR	Retorbido (PV)	2 mancozeb 2 fenamidone+fosethyl Al+iprovalicarb 3 rame	2 CAA+ 2 Qol
BE	Santa Maria della Versa (PV)	1 dimethomorph + rame 1 rame	1 CAA

**Tabella 1.3.** Vigneti campionati nel 2013 e relativi trattamenti antiperonosporici. In grassetto le sostanze attive non applicate in miscela.

Sigla	Comune	Trattamenti antiperonosporici 2011	Sostanze attive monosito impiegate
PAS	Passirano (BS)	1 zoxamide + rame 1 cyazofamid 2 dimethomorph + rame 2 mandipropamid	1 ZOXAMIDE + 2 CAA + <b>2 CAA</b> + <b>1 Qil</b>
PIZ	Corte Franca (BS)	RAME	-
ERB	Erbusco (BS)	4 dimethomorph + rame 2 cymoxanil 1 cyazofamid 4 zoxamide + rame	4 CAA + <b>2 CYMOXANIL</b> + <b>1 Qil</b> + 4 ZOXAMIDE
FOR	Adro (BS)	1 dimethomorph + rame 2 dimethomorph + rame 2 cymoxanil 2 cyazofamid 1 dithianon 1 cymoxanil 1 zoxamide + rame 1 fosethyl-Al +rame 2 ametoctradin + metiram 1 propineb rame	3 CAA + <b>3 CYMOXANIL</b> + <b>2 Qil</b> + 1 ZOXAMIDE
OLF	Olfino di Monzambano (MN)	5 dimethomorph + mancozeb 3 dimethomorph + rame Idrossido di rame	8 CAA
MAS	Castione Andevenno (SO)	2 metalaxyl + mancozeb 2 mancozeb+fosethyl-Al+iprovalicarb 2 dimethomorph + rame 1 rame	2 PA + 4 CAA
SO	Sondrio (SO)	Testimone non trattato TNT	-
TRI	Triasso (SO)	1dimethomorph + mancozeb 3 metalaxyl + mancozeb 1 fenamidone, fosethyl-Al ed iprovalicarb 2 zoxamide + rame	2 CAA + 3 PA + 1 Qol + 2 ZOXAMIDE
BE	S. Maria Della Versa (PV)	Testimone non trattato TNT	-
CIG	Cigognola (PV)	4 fluopicolide + fosethyl-Al 1 fenamidone + fosethyl-Al 1 fosethyl-Al +rame solfato	4 FLUOPICOLIDE + 1 Qol
CTC	Torrazza Coste (PV)	4 dimethomorph + mancozeb 4 metalaxyl + mancozeb rame	4 CAA + 4 PA

## ESECUZIONE DEI SAGGI DI GERMINAZIONE

I saggi di germinazione sono stati effettuati a partire dal mese di marzo. I frammenti fogliari sono stati sospesi in circa 2 mL di acqua distillata sterile e quindi finemente triturati con l'ausilio di omogeneizzatori di vetro (Potter). La sospensione così ottenuta è stata filtrata attraverso due filtri con pori di diverso diametro, dapprima da 100 µm, per eliminare le impurità di maggiori dimensioni, e poi da 45 µm, per raccogliere le oospore. Queste sono state quindi sospese nuovamente in 1 mL di acqua distillata sterile e si è proceduto alla titolazione della sospensione ottenuta. Tramite una micropipetta sono state prelevate due gocce da 10 µL cadauna e, mediante conta diretta al microscopio, è stato calcolato il numero medio delle oospore presenti. Sono quindi stati calcolati i volumi (µL) sufficienti a garantire la presenza di 100 oospore e le gocce contenenti le oospore sono state inoculate su piastre Petri contenenti diversi substrati sterili a base di agar-acqua all'1% (Agar Noble, Difco™). Per ciascun substrato sono state prese in esame 1200 oospore divise in tre ripetizioni da 400.

Per ciascun campione, costituito da due ripetizioni, è stata prevista l'inoculazione su un terreno di controllo, costituito dal solo agar-acqua, e su terreni contenenti azoxystrobin (Qol) e mandipropamid (CAA) alle concentrazioni discriminanti di 10 e 100 mg/L rispettivamente, o a concentrazioni crescenti di metalaxyl (PA), cymoxanil, cyazofamid (Qil), fluopicolide e zoxamide (**Tabella 1.4**). Le sostanze attive utilizzate sono state disciolte in dimetilsolfossido (azoxystrobin, mandipropamid, metalaxyl, fluopicolide e zoxamide), acetone (cyazofamid) o acqua distillata sterile (cymoxanil) ed addizionati al substrato sterile conservato a 50°C. Particolare cura è stata posta nel far sì che la concentrazione di solvente nel substrato finale non superasse lo 0,1%, per evitare effetti negativi del solvente sulla germinazione delle oospore. I substrati agarizzati ed il

**Tabella 1.4.** Elenco delle sostanze attive e relative concentrazioni saggate

Principio attivo	Concentrazione (mg/L)					
TNT	0					
Azoxystrobin	10					
Mandipropamid	100					
Metalaxyl	0,1	0,5	1	10	100	
Cymoxanil	2,3	23	120	230	460	
Cyazofamid	0,001	0,01	0,1	0,5	1	
Fluopicolide	0,01	0,1	1	10	100	
Zoxamide	0,01	0,1	1	10	100	

materiale utilizzato per l'isolamento delle oospore sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti ad una pressione di 1 atm. Le piastre, incubate a 20°C in assenza di luce, sono state osservate allo stereomicroscopio Leica Wild M-10 ad intervalli regolari a partire da una settimana fino a 14 giorni dall'incubazione, allo scopo di conteggiare il numero di oospore che avevano differenziato il macrosporangio.

I dati così raccolti sono stati utilizzati per calcolare:

- G: media delle percentuali di germinazione delle ripetizioni per ogni campione;
- tmin: tempo minimo di germinazione espresso in giorni;
- tmed: media dei tempi medi di germinazione delle ripetizioni, espressa in giorni, calcolata secondo la formula  $nD/N$  dove
  - n : numero delle oospore germinate/giorno;
  - D : giorno della loro germinazione;
  - N : numero totale delle oospore germinate.

Nel caso di assenza di germinazione, i tempi minimi e medi sono stati considerati infiniti.

## ANALISI DEI DATI

Le percentuali di germinazione sono state quindi utilizzate per il calcolo della percentuale di oospore resistenti (RO) ad azoxystrobin e mandipropamid mediante la formula  $RO = (Gaf/Gaw) \times 100$  dove:

- Gaf: percentuale di germinazione delle oospore su agar-acqua + fungicida;
- Gaw: percentuale di germinazione delle oospore su agar-acqua.

Per quanto riguarda le restanti sostanze attive è stata calcolata la  $EC_{50}$  ( $EC$ =concentrazione efficace), corrispondente alla concentrazione di fungicida in grado di inibire la germinazione delle oospore nella misura del 50% rispetto al controllo. I dati utilizzati per il calcolo dell' $EC_{50}$  sono i valori di concentrazione del fungicida trasformate in logaritmo in base 10 e la percentuale di riduzione della germinazione delle oospore (RG) rispetto al controllo (Hsiang *et al.*, 1997) calcolata secondo la formula  $RG = 100 - ((G_x \times 100)/G_0)$  dove:

- $G_x$ : G alla singola concentrazione di fungicida ( $x$ );
- $G_0$ : G sul terreno di controllo non addizionato con il fungicida.

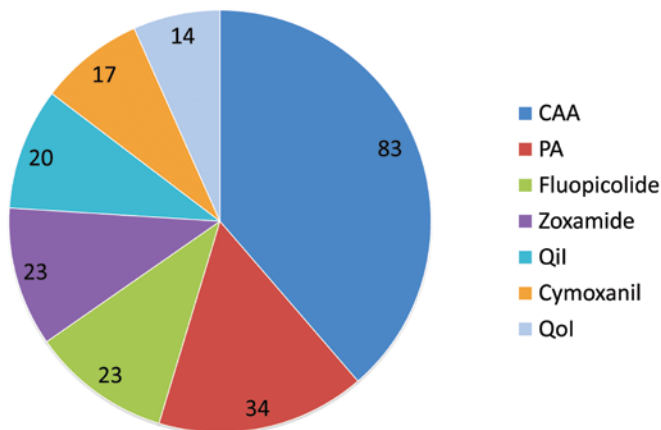
I valori di RG sono stati sottoposti all'analisi dei probit, una volta verificate le condizioni di applicazione. Per ciascuna sostanza attiva, è stato calcolato il fattore di resistenza (FR) della popolazione, dividendo l' $EC_{50}$  calcolata per il singolo vigneto per l' $EC_{50}$  di un vigneto di riferimento non trattato con nessuna delle sostanze attive di interesse (BE 2011). Fattori di resistenza pari o superiori a 10 indicano un possibile rischio di resistenza (Oliver e Hewitt, 2014).

Tutte le analisi sono state effettuate mediante il software SPSS v. 21 (SPSS Inc.).

## 1B. RISULTATI E CONCLUSIONI

I piani di difesa attuati nei vigneti lombardi sono caratterizzati, in generale, dal rispetto di quanto stabilito dai disciplinari di produzione integrata adottati a livello regionale e sono inoltre contraddistinti dall'uso delle sostanze attive monosito per un numero limitato di applicazioni, in miscela e/o in alternanza con principi attivi dotati di diverso meccanismo d'azione.

In generale, le sostanze attive sono state utilizzate in miscela con sostanze attive appartenenti a classi di resistenza differenti o multisito (**Tabelle 1.1-1.3**). La classe dei CAA è stata impiegata nella quasi totalità dei vigneti (83 %), seguita dalle fenilammidi-PA, utilizzate nel 34% dei casi, e da fluopicolide e zoxamide, applicate nel 23% dei vigneti (**Figura 1.2**). Le rimanenti sostanze attive, ovvero cymoxanil, Qil e Qol e sono state impiegate nel 14-20% dei vigneti. L'unico vigneto nel quale non è stata utilizzata alcuna sostanza attiva di sintesi è PIZ, sito a Passirano (BS), il quale è stato trattato unicamente con formulati a base di rame.



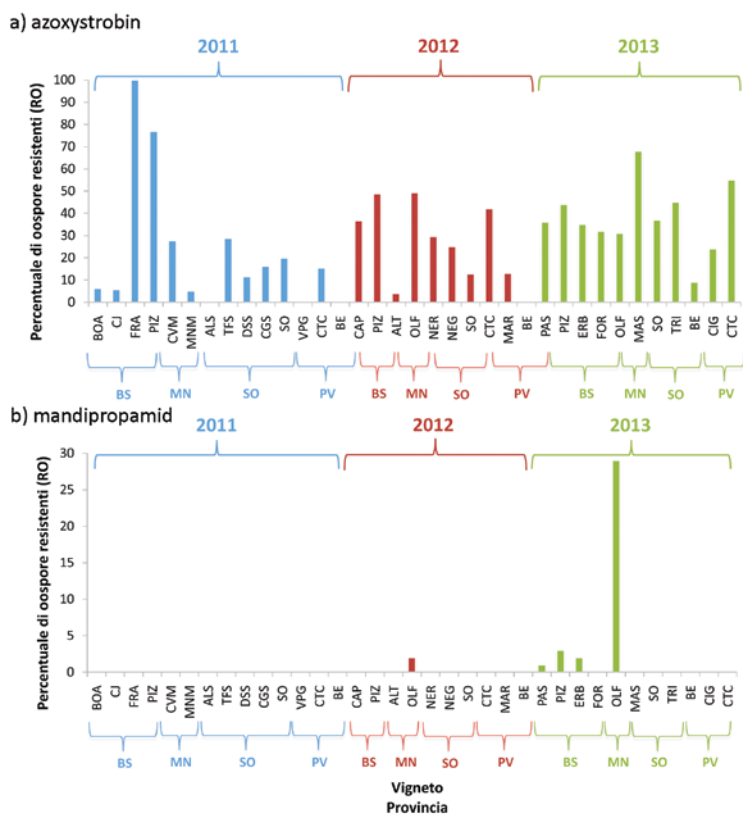
**Figura 1.2.** Percentuali di utilizzo in vigneto dei fungicidi antiperonosporici saggiati nel corso dei tre anni di sperimentazione.

### Qol-Azoxystrobin

La presenza di individui resistenti ai Qol è stata riscontrata nella maggior parte dei vigneti monitorati, ad eccezione di ALS e VPG nel 2011 e BE nel 2011 e 2012, nei quali non è stata rilevata alcuna oospora resistente (**Figura 1.3a**). Le percentuali di oospore resistenti (RO) ad azoxystro-



bin sono risultate superiori al 10% nel 75% dei campioni, e comprese tra il 4 ed il 9% nel 14% dei campioni. I fungicidi antiperonosporici appartenenti alla classe dei Qol sono stati applicati sporadicamente nei vigneti monitorati e non sembra esserci alcuna relazione tra il trattamento nel corso della singola annata e la presenza di resistenza nelle popolazioni: i valori di RO riscontrati nei vigneti trattati o meno con i Qol, infatti, risultano analoghi. Ad esempio, la popolazione di oospore del vigneto FRA, non trattato con i Qol, è composta unicamente da individui resistenti, come dimostrato da una RO pari al 100%. La presenza di oospore resistenti potrebbe essere imputabile alla migrazione di ceppi resistenti da appezzamenti contigui nei quali i Qol sono utilizzati oppure alla presenza residua di individui resistenti selezionati in annate precedenti. I trattamenti a base di Qol, infatti, hanno avuto ampia diffusione tra il 1994 ed il 2004, e il loro utilizzo non in miscela e per un numero eccessivo di trattamenti, ha portato in breve tempo alla selezione di ceppi resistenti anche in elevata percentuale (Toffolatti e Vercesi, 2012). Indagini effettuate sulle oospore nel corso di annate consecutive nel medesimo vigneto hanno dimostrato che la percentuale di individui resistenti all'interno di una popolazione di *P. viticola* inizia a diminuire significativamente a partire dalla seconda annata di sospensione dell'utilizzo dei Qol in vigneto (Toffolatti *et al.*, 2011). Tuttavia, una parte della popolazione rimane costituita da individui resistenti, favorita dalla modalità di trasmissione del carattere della resistenza ai Qol, che riguarda il DNA mitocondriale e avviene per via materna. Pertanto tutti gli individui portatori della mutazione G143A che differenziano gli organi di riproduzione femminili (oogoni), danno origine a oospore resistenti (Gisi *et al.*, 2002). In effetti, il monitoraggio eseguito nel vigneto bresciano PIZ, nel valtellinese SO e nel pavese CTC ha evidenziato percentuali di oospore resistenti ad azoxystrobin analoghe nel corso di tre annate consecutive, confermando come il ritorno delle popolazioni di *P. viticola* alla sensibilità richieda diverso tempo.



**Figura 1.3.** Percentuali di oospore resistenti (RO) ad azoxystrobin (a) e mandipropamid (b) relative alle popolazioni di oospore di *P. viticola* campionate nel triennio di indagine nelle diverse province lombarde.

### CAA- Mandipropamid

Dai dati raccolti sull'impiego degli antiperonosporici nei vigneti oggetto di indagine, è evidente che le sostanze attive appartenenti ai CAA sono le più utilizzate: con l'eccezione di PIZ, trattato secondo i principi della viticoltura biologica, MNM nel 2011 e SO, BE e CIG nel 2013, in tutti gli altri siti è stato effettuato almeno un intervento con CAA, in miscela con fungicidi penetranti o, più spesso con sostanze attive multisito di superficie. Solamente nei vigneti bresciani CJ e FRA e nel pavese CTC nel 2011 e FOR nel 2013 sono state effettuate alcune applicazioni di CAA non in miscela. In generale, l'utilizzo dei CAA non ha superato i 4 trattamenti, sebbene in alcuni vigneti, come quelli dei valtellinesi TFS, CGS e dei pavesi CTC e BE nel 2011, siano state raggiunte 6-7 applicazioni, sempre in miscela. Va sottolineato il caso del vigneto mantovano di Olfino di Monzambano (OLF), nel quale sono stati applicati 8 trattamenti con dimethomorph in miscela con mancozeb o rame, superando in tal modo il numero consigliato di applicazioni della medesima sostanza attiva nell'arco di una singola stagione vegetativa della vite.

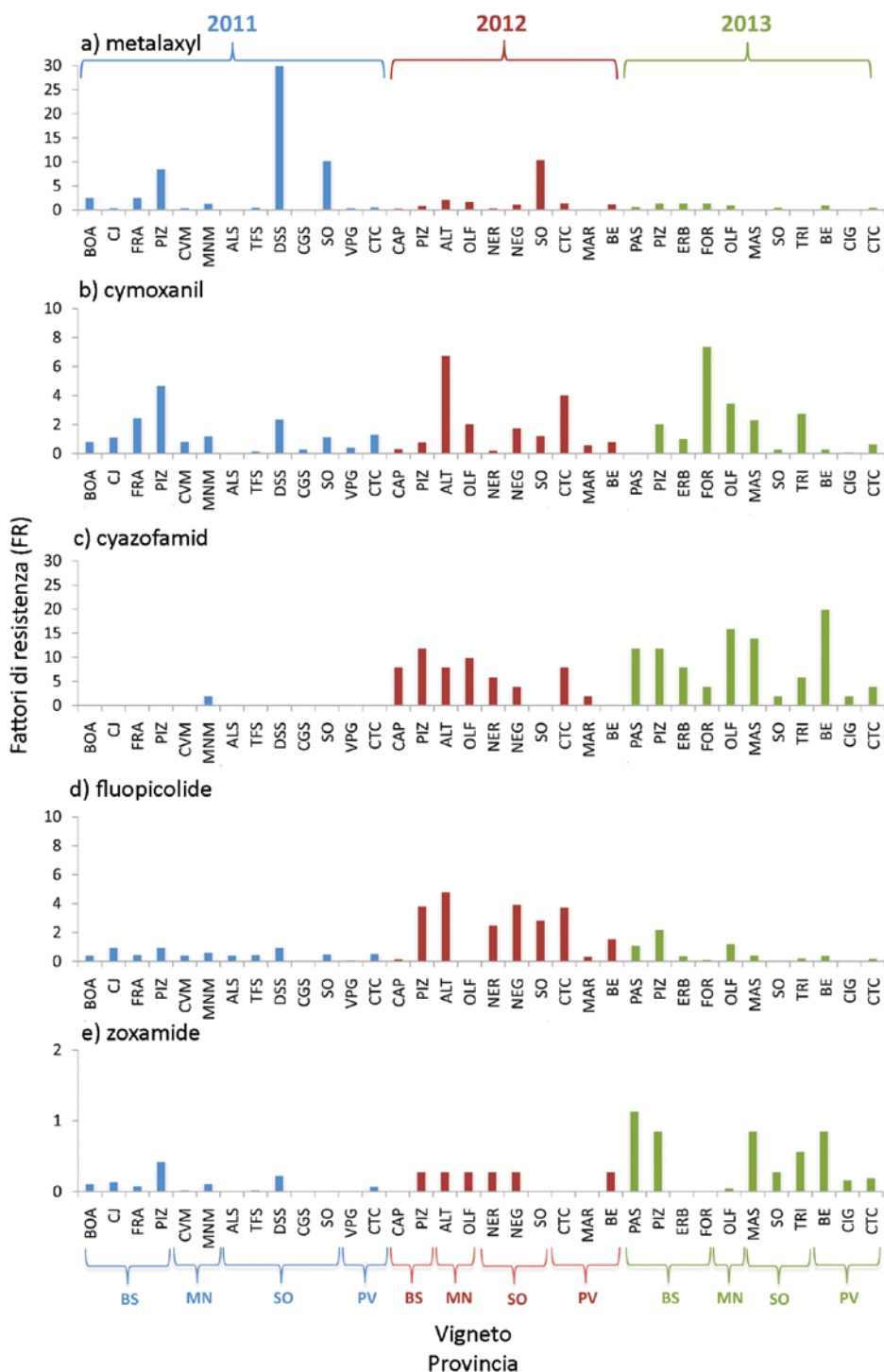
Nonostante l'ampia diffusione dell'utilizzo dei CAA, secondo quanto riportato nel presente studio, non si rilevano particolari criticità nella sensibilità a questo gruppo di fungicidi, poiché nell'86 % dei vigneti non è stata riscontrata la presenza di alcuna oospora resistente e nell'11 % le percentuali hanno oscillato entro valori molto contenuti (1-3 %) (**Figura 1.3b**). L'unica eccezione è costituita proprio dal vigneto di OLF, dove la popolazione è passata dal 2% di oospore resistenti rilevato nel 2012 al 30% riscontrato nel 2013, probabilmente a seguito della elevata pressione di selezione attuata dalla strategia di intervento antiperonosporica adottata nel 2013. Ciò dimostra come il quadro della sensibilità nei confronti di una sostanza attiva possa repentinamente cambiare anche nel corso di una singola annata, evidenziando ancora una volta come la pressione di selezione esercitata dall'utilizzo non razionale del fungicida unita a condizioni favorevoli per la malattia e alla capacità di *P. viticola* di differenziare abbondante inoculo possano portare allo spostamento di una consistente parte della popolazione verso la resistenza.

### PA-Metalaxyl

Le fenilammidi, ed in particolare metalaxyl, sono state impiegate sempre in miscela con partner antiresistenza per un numero generalmente pari a 2-3 applicazioni a stagione, seguendo le norme regionali per la difesa della vite. I valori di  $EC_{50}$  relativi a metalaxyl calcolati nelle popolazioni di *P. viticola* nel corso dei tre anni sono risultati compresi tra 0,0001 e 0,64 mg/L di sostanza attiva, valori che ricadono nell'intervallo di sensibilità (0-1 mg/L di sostanza attiva) indicato da Gisi e collaboratori (2007) per quanto riguarda singoli ceppi e da Toffolatti e collaboratori (2011) per quanto riguarda popolazioni di oospore (0,1 e 0,6 mg/L). Solamente in 4 vigneti sono stati riscontrati fattori di resistenza superiori a 10, ovvero nei vigneti di valtellinesi di DSS e CGS nel 2011 e SO nel 2011 e 2012 (**Figura 1.4a**). I valori di  $EC_{50}$  di tali campioni ricadono nell'intervallo tipico degli individui intermedi per la resistenza (1-10 mg/L). Inoltre, il ritorno a normali valori di sensibilità osservabile nel vigneto SO nel 2013 ( $EC_{50} = 0,15$  mg/L; FR=0,6) costituisce un ulteriore segnale incoraggiante per quanto riguarda lo stato di sensibilità nei confronti delle fenilammidi, il quale non desta, pertanto, particolari preoccupazioni. Non sono rilevabili variazioni nella sensibilità a metalaxyl imputabili al numero di trattamenti effettuati nella singola stagione vegetativa.

### Cymoxanil

Cymoxanil è stato impiegato tra 1 e 3 volte a stagione nei vigneti oggetto di indagine, da solo (VPG nel 2011, ERB e FOR nel 2013) o in miscela con partner antiresistenza (VPG e BE nel 2011, CTC nel 2011 e 2012). I valori di  $EC_{50}$  sono risultati quasi sempre inferiori a 40 mg/L di sostanza attiva, un valore ben lontano dalla concentrazione di impiego del fungicida (120 mg/L). I fattori di resistenza sono risultati inferiori a 7,4 (**Figura 1.4b**). Mediamente le  $EC_{50}$  calcolate per il 2013 risultano inferiori a quelle delle annate precedenti, ad eccezione di PIZ. Infine, la capacità di cymoxanil di inibire la germinazione delle oospore non è variata in funzione dei trattamenti effettuati con formulati contenenti tale sostanza attiva nei vigneti indagati. Non si segnalano, pertanto, particolari situazioni di rischio, nemmeno nei vigneti in cui cymoxanil è stato applicato da solo.

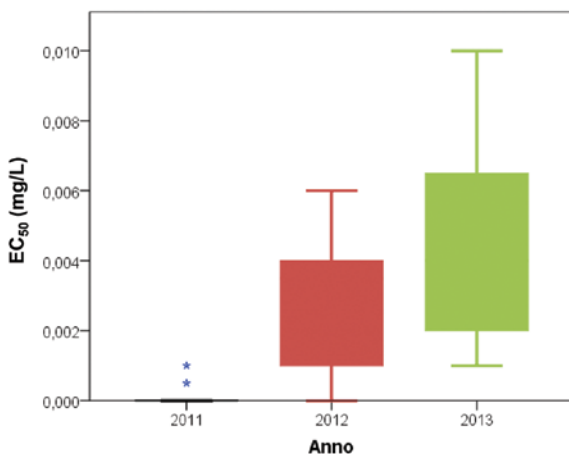


**Figura 1.4.** Fattori di resistenza (FR) relativi a metalaxyl (a), cymoxanil (b), cyazofamid (c), fluopicolide (d) e zoxamide (e) nelle popolazioni di oospore di *P. viticola* campionate nelle diverse province lombarde durante il triennio di indagine.

## Qil - cyazofamid

L'inibitore della respirazione cyazofamid è stato impiegato sporadicamente nei vigneti oggetto di campionamento, generalmente da solo. Unicamente ad ALS nel 2011 esso è stato applicato in miscela con dimethomorph o rame (**Tabella 1.1**). I valori di  $EC_{50}$  riscontrati nelle popolazioni di oospore di *P. viticola* sono risultati piuttosto contenuti, compresi cioè tra 0,0001 e 0,01 mg/L di sostanza attiva. Tuttavia, è possibile osservare un progressivo incremento, fino a 2 ordini di grandezza rispetto all'inizio, nei valori di  $EC_{50}$  nel corso delle 3 annate di indagine (**Figura 1.5**). Mentre nel 2011 il 93 % delle popolazioni di oospore saggiate non era in grado di germinare in presenza di 0,001 mg/L di cyazofamid, tale percentuale è scesa al 20-24 % nel 2012 e 2013. L'incremento nei valori di  $EC_{50}$  non risulta associato all'utilizzo della sostanza attiva in vigneto: infatti fattori di resistenza superiori a 10 sono stati rilevati nei vigneti di PIZ nel 2012 e PAS, PIZ, OLF, MAS e BE nel 2013 (**Figura 1.4c**).

Considerando che la dose di impiego di cyazofamid su vite è pari ad un massimo di 0,18 mg/L, non si segnalano al momento particolari criticità per quanto riguarda questo fungicida. Tuttavia il notevole incremento dei valori di  $EC_{50}$  osservato nel 2013 indica la presenza di una situazione in evoluzione e suggerisce di utilizzare la sostanza attiva seguendo le norme relative alle strategie antiresistenza.

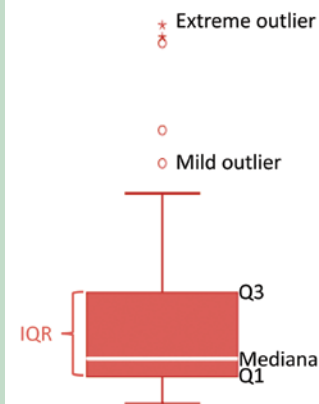


**Figura 1.5.**

Distribuzione box-plot dei valori di  $EC_{50}$  (mg/L) relativi a cyazofamid rilevati nei tre anni di indagine.



Box-plot: tipologia di grafico che permette di visualizzare la variabilità esistente tra popolazioni anche nel caso in cui la distribuzione statistica dei dati sia sconosciuta attraverso l'utilizzo dei valori minimi e massimi, i cosiddetti baffi, l'intervallo interquartilico (box), ovvero la differenza tra il terzo (Q3) ed il primo quartile (Q1), e la mediana, ovvero la linea centrale. I quartili rappresentano i tre punti che dividono un set di valori in quattro gruppi, ognuno dei quali rappresenta un quarto (25 %) della popolazione campionata. La distanza interquartilica (interquartile range o IQR), è una misura della dispersione della distribuzione, un dato utile ad evidenziare valori anomali, poiché in esso è compreso il 50 % delle osservazioni collocate intorno al valore centrale. Un intervallo interquartilico ridotto indica che la metà delle osservazioni presenta valori molto vicini alla mediana, mentre un IQR ampio evidenzia una elevata dispersione (varianza) dei dati. I grafici box-plot, inoltre, forniscono indicazioni sulla normalità dei dati: se la distribuzione è normale, infatti, nel grafico le distanze tra ciascun quartile e la mediana sono uguali, così come le due linee che partono dai bordi della scatola e terminano con i baffi. Infine, nel grafico box-plot vengono evidenziati, con asterischi e cerchi, eventuali valori anomali (outlier) che fuoriescono dalla distribuzione e possono, pertanto, rappresentare dati interessanti al fine dell'individuazione di eventuali ceppi resistenti. SPSS, in particolare, indica con un asterisco (\*) i valori che sono più di 3 differenze interquartili sopra Q3 o sotto Q1 (extreme outlier) e con una "o" i valori che sono da 1,5 a 3 differenze interquartili sopra Q3 o sotto Q1 (mild outlier).



## Fluopicolide

Laddove è stata impiegata, fluopicolide è stata utilizzata sempre in miscela con fosethyl-Al, talune volte anche con dimethomorph (**Tabelle 1.1-1.3**). I valori di  $EC_{50}$  si sono attestati entro un intervallo caratteristico di una situazione di normale sensibilità (Latorse *et al.*, 2006), ovvero tra 0,01 e 1,55 mg/L di sostanza attiva, e non sono stati riscontrati fattori di resistenza superiori a 10 in nessun vigneto (**Figura 1.4d**). Non sono state altresì rilevate particolari variazioni nella sensibilità imputabili all'utilizzo di fluopicolide in vigneto. Pertanto, nei vigneti lombardi oggetto di monitoraggio, non è stata riscontrata alcuna situazione di criticità.

## Zoxamide

Anche zoxamide è stata applicata in miscela con un partner antiresistenza, in questo caso il rame (**Tabelle 1.1-1.3**). Essa si è rivelata un efficace inibitore della germinazione delle oospore, poiché molto raramente è stato possibile assistere a germinazione, che è risultata comunque molto contenuta, in presenza di 1mg/L di sostanza attiva. Solo su un campione, PAS, trattato con la sostanza attiva non in miscela, è stata registrata una ridottissima germinazione (0,08%) in presenza di 10 mg/L di sostanza attiva. L'intervallo di valori relativo all' $EC_{50}$  è stato pari a 0,0001-0,04 mg/L di sostanza attiva e i fattori di resistenza sono risultati inferiori a 1,1 (**Figura 1.4e**). La situazione complessiva della sensibilità nei confronti di zoxamide non desta particolari preoccupazioni, nonostante vada segnalato un deciso incremento dei valori di  $EC_{50}$  nei vigneti di PIZ e BE nel 2013 rispetto alle annate precedenti che andrebbe più attentamente indagato.

In conclusione, la situazione delineata dai saggi di germinazione delle oospore di *P. viticola* è di sostanziale sensibilità delle popolazioni del patogeno alle principali sostanze attive antiperonosporiche ad eccezione dei QoI, dei CAA e delle fenilammidi, ovvero le classi contenenti più principi attivi dalla diversa natura chimica ma dal medesimo meccanismo d'azione e da più tempo e più largamente impiegate in vigneto. La presenza di individui resistenti alle suddette classi di fungicidi all'interno delle popolazioni di *P. viticola* è il risultato della storia fitoiatrica dei vigneti e non deve destare particolari preoccupazioni, a meno che il numero di individui resistenti non risulti tanto elevato da compromettere il controllo della malattia in pieno campo. Va sottolineato che tale situazione non è stata mai osservata nel corso della presente attività di ricerca. In effetti, l'utilizzo di sostanze attive appartenenti a classi di resistenza diverse nel corso della medesima stagione vegetativa può consentire il contenimento degli individui resistenti, poiché essi sono incapaci di sopravvivere all'azione delle classi di fungicidi diverse da quelle per la quale essi manifestano una ridotta sensibilità. E' pertanto molto importante applicare in maniera il più possibile stringente le strategie anti-resistenza, in modo da diminuire la pressione di selezione e mantenere l'efficacia delle sostanze attive sia presenti da lungo tempo sia di più recente introduzione. In tal senso i risultati concernenti cyazofamid nel corso della presente attività di ricerca evidenziano come le popolazioni possono cambiare nel corso di poche annate.

## 2. BOTRYTIS CINEREA PERS.

La muffa grigia, provocata da *B. cinerea*, è la malattia litica più diffusa nei vigneti di tutto il mondo, anche se i danni dovuti al micete possono variare in modo notevole in funzione dell'andamento climatico e del vitigno considerato. I danni imputabili a *B. cinerea* causano una riduzione della quantità del raccolto e compromettono la qualità del prodotto finale. Le uve affette in maniera consistente da muffa grigia sono, infatti, difficilmente vinificabili e i vini ottenuti con uve colpite da tale alterazione risultano di scarso pregio (Bisiach, 1977). L'attività di *B. cinerea* può, in condizioni ambientali particolari, essere sfruttata per ottenere uve da lavorare con vinificazioni speciali, dando origine a vini prelibati e di pregio. In questo caso particolare, il processo patologico indotto dal fungo prende il nome di marciume nobile (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

*B. cinerea* appartiene al phylum Ascomycota del regno degli Eumycota. È un fungo polifago capace di infettare numerose colture orticole, floricole e arboree da frutto, ed in particolare vite, fragola e kiwi. Essa è caratterizzata da uno spiccato saprofitismo e può, quindi, crescere anche su substrati

in via di decomposizione, come i residui vegetali. *B. cinerea* è un parassita facoltativo ed un patogeno policiclico, caratterizzato da una modalità di colonizzazione dell'ospite di tipo necrotico (Belli, 2012). Durante la stagione autunno-invernale il micete sopravvive, in vigneto, sia come micelio annidato nelle gemme e nei residui vegetali sia come sclerozi, ovvero modificazioni ifali che consentono la sopravvivenza dell'individuo in condizioni ambientali sfavorevoli anche in assenza dell'ospite. Non appena le condizioni ambientali diventano favorevoli allo sviluppo attivo del micete, in tardo inverno-inizio primavera, da tali strutture vengono differenziate le spore asessuate, i conidi, che rappresentano i veri propaguli infettivi del fungo. Infatti, sebbene da alcuni dati si possa arguire che *B. cinerea* si riproduca sessualmente in vigneto (Fournier e Giraud, 2008; Vaczy *et al.*, 2008; Campia, 2014), il ritrovamento su vite di apotecie contenenti le ascospore (4-8 per asco) è, di fatto, molto raro (Lorbeer, 1980) e in alcuni ambiti la riproduzione del patogeno è prevalentemente di tipo asessuato (Ma e Michailides, 2005). La forma sessuata di *B. cinerea* è denominata *Botryotinia fuckeliana* De Bary. Sono quindi i conidi, e molto più raramente le ascospore, che danno luogo alle prime infezioni. Essi vengono dispersi dalle piogge e dal vento, e, una volta raggiunti gli organi verdi della vite, germinano, penetrano preferibilmente attraverso lesioni nei tessuti dell'ospite e danno origine al micelio, la forma vegetativa del patogeno. Sui tessuti infetti si assiste alla formazione di rami conidiofori alle cui estremità si differenziano conidi, i quali danno origine a nuovi cicli di infezione e conferiscono il caratteristico aspetto alla malattia: la muffa grigia.

*B. cinerea* è in grado di infettare l'ospite in ogni fase del suo sviluppo, ma solamente quando le condizioni del substrato permettono l'espressione del suo potenziale patogenetico si assiste alla comparsa dei sintomi, in caso contrario essa rimane latente all'interno del tessuto colonizzato, anche per periodi prolungati. I sintomi della malattia variano in funzione dell'organo colpito: su foglia si assiste alla formazione di necrosi, sul grappolo a marciume (**Figura 2.1**): gli acini perdono la propria naturale consistenza, diventano deliquescenti e si ricoprono, infine, di una fitta muffa grigia. Il patogeno può infettare tutti gli organi della vite, ma i danni di maggiore entità riguardano il grappolo, in particolare nel periodo che intercorre tra invaiatura e maturazione.

**Figura 2.1.** Sintomi di muffa grigia su grappolo, foglia e tralcio.



Le strategie di difesa nei confronti di *B. cinerea* si basano sull'integrazione di misure derivanti da conoscenze relative alla biologia del patogeno e all'influenza esercitata sul processo patogenetico dalla fase fenologica della vite e dalle condizioni climatiche. Le pratiche agronomiche, volte alla riduzione delle lesioni sul grappolo e della bagnatura degli organi suscettibili, rivestono un ruolo fondamentale nell'impostazione della difesa, come la scelta della cv: acini dalla buccia sottile e grappolo compatto sono, infatti, fattori predisponenti la malattia. Laddove tali pratiche non siano



sufficienti e in presenza di condizioni climatiche caratterizzate da temperature contenute ed elevata umidità nel periodo primaverile-estivo si attua una difesa di tipo chimico, basata sul metodo fenologico. I trattamenti vengono effettuati in corrispondenza delle fasi fenologiche che maggiormente predispongono all'instaurarsi della malattia, ovvero: A) fine fioritura, per evitare la contaminazione dei residui fiorali; B) pre-chiusura del grappolo, per proteggere le parti interne dello stesso; C) inizio invaiatura e D) all'approssimarsi della maturazione, quando il grappolo è più recettivo. I trattamenti vengono effettuati solamente se le condizioni climatiche sono favorevoli al patogeno e possono essere ridotti a 1-2 all'anno (Vercesi *et al.*, 2014).

Nei formulati antibotritici maggiormente utilizzati in Italia ed in Lombardia si ritrovano quattro classi di fungicidi monosito: anilinoipirimidine (cyprodinil, mepanipyrim e pyrimethanil); idrossianilidi (fenhexamid); fenilpirroli (fludioxonil); e carbossamidi (boscalid). I fungicidi appartenenti a ciascuna di queste classi sono accumulati da resistenza incrociata.

*B. cinerea* è considerato un patogeno ad alto rischio di resistenza e, in effetti, sono molto numerosi gli studi che riguardano l'isolamento e la caratterizzazione di ceppi resistenti non solo ad una determinata classe ma anche a più classi di fungicidi in contemporanea, secondo il fenomeno della multi-drug resistance.

Nel corso dell'attività di ricerca e monitoraggio sono stati effettuati saggi atti a valutare la sensibilità di popolazioni di *B. cinerea*. Inoltre, obiettivo fondamentale è stato quello di acquisire informazioni sulla composizione delle popolazioni presenti nel singolo vigneto, facendo particolare riferimento non solo alla presenza, ma anche alla frequenza di ceppi resistenti nonché alle caratteristiche biologiche del patogeno in grado di influenzare la diffusione e la trasmissione della resistenza, come la riproduzione sessuata e la presenza di elementi trasponibili nei ceppi di *B. cinerea*. Queste caratteristiche consentono, infatti, di introdurre una variabilità genetica che può influenzare la trasmissione del carattere della resistenza, che altrimenti sarebbe stabile e quindi ancor più difficile da debellare una volta presente in vigneto. D'altro canto, anche l'esistenza di una elevata variabilità genetica può causare effetti sfavorevoli, in quanto la ricombinazione dei cromosomi può determinare la contemporanea presenza nello stesso individuo di più mutazioni che possono conferire un vantaggio evolutivo al patogeno anche in termini di resistenza a una o più classi di fungicidi (Oliver e Hewitt, 2014). Il monitoraggio è stato effettuato nelle quattro province lombarde maggiormente vocate alla viticoltura, ovvero Brescia, Mantova, Pavia e Sondrio, selezionando vigneti nei quali erano state segnalate problematiche nel contenimento della malattia.

## 2A. MATERIALI E METODI

### SITI E MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO

I vigneti campionati e i relativi trattamenti effettuati sono elencati nelle **Tabelle 2.1-2.3**.

I prelievi sono stati effettuati nel mese di settembre di ciascuna annata. Per rendere il campionamento rappresentativo della situazione del vigneto e ripetibile nel corso delle annate, ogni vigneto è stato suddiviso in quattro blocchi (A, B, C e D) costituiti da tre filari ciascuno. Il campionamento è stato effettuato nel filare centrale di ogni blocco, dividendo il filare in quattro ripetizioni (1, 2, 3 e 4). Singoli grappoli con evidenti sintomi di muffa grigia sono stati prelevati da ogni ripetizione e ai 4 vertici del vigneto, raccogliendo in questo modo 20 grappoli sintomatici (**Figura 2.2**).

Tutti i vigneti hanno subito regolari trattamenti antibotritici nel corso degli anni, ad eccezione di uno sito a Tirano (SO), campionato nel 2011, il quale non è stato trattato per tre anni consecutivi ed è stato utilizzato come appezzamento sensibile di riferimento.

In occasione del campionamento, è stato effettuato un rilievo della malattia allo scopo di evidenziare eventuali relazioni tra la presenza di ceppi resistenti di *B. cinerea* e una riduzione di efficacia del trattamento. I rilievi sono stati effettuati nel filare centrale di ciascuno dei 4 blocchi nei quali è stato suddiviso il vigneto secondo lo schema riportato di seguito. Per ciascun blocco sono stati presi in considerazione 100 grappoli, ognuno dei quali è stato classificato secondo una scala da 0 (sano) a 7 (dal 75 al 100% di superficie sintomatica). Sulla base dei dati rilevati è stato calcolato l'indice percentuale d'infezione (I%) come riportato da Rho e collaboratori (2004).



**Figura 2.2.** Esempio di schema di campionamento dei grappoli sintomatici, Olfino di Monzambano (MN).



**Tabella 2.1.** Localizzazione delle aziende, cultivar, elenco delle sostanze attive antibotritiche utilizzate nell’annata di campionamento e nelle annate precedenti e incidenza della malattia (%I).

Vigneti	Comune	Cultivar	Trattamenti antibotritici 2011 *	Trattamenti annate precedenti,	%I
1	Rovizza di Sirmione (BS)	Trebbiano di Lugana	fenhexamid (B)	AP (2 all’anno per 7-8 anni)	5,4
2	Sirmione (BS)	Trebbiano	boscalid (B)	cyprodinil + fludioxonil	1,9
3	Adro (BS)	Cabernet sauvignon	pyrimethanil (A e B)	pyrimethanil e cyprodinil + fludioxonil	<1
4	Corte Franca (BS)	Cabernet	pyrimethanil (C)	pyrimethanil in C	<1
5	Tirano (SO)	Chiavennasca	Non trattato da 2 anni	cyprodinil + fludioxonil fino al 2009	<1
6	Chiuro (SO)	Chiavennasca	cyprodinil + fludioxonil (C)		<1
7	S. Anna (SO)	Nebbiolo	fenhexamid (D)	cyprodinil + fludioxonil dal 2005 in D	<1
8	Dossi salati (SO)	Nebbiolo	boscalid (B), cyprodinil+ fludioxonil (D)		<1
9	Retorbido (PV)	Merlot	fenhexamid B	fenhexamid da 5-6 anni	5
10	Codevilla (PV)	Reisling Renano	pyrimethanil (C)	cyprodinil + fludioxonil in chiusura (2008 e 2010)	31,9
11	TorrazzaCoste (PV)	Barbera	procimidone (B) fluazinam (C)		8
12	Torrazza Coste (PV)	Merlot	procimidone (B) fluazinam (C)		6
13	Monzambano Visconti (MN)	Merlot	pyrimethanil (C)	AP in A o B, fenhexamid in C o D	3,1
14	Cavriana (MN)	Merlot	cyprodinil+ fludioxonil (B), fenhexamid D		<1
15	Gonzaga (MN)	Lambrusco	cyprodinil+ fludioxonil (B)	pyrimethanil e cyprodinil + fludioxonil dal 2008 in B	2
16	Mantova	Lambrusco viadanese	cyprodinil + fludioxonil (B e C)	cyprodinil e fludioxonil in B e in C	<1

\*B: chiusura del grappolo; C: inizio invaiatura; D: inizio maturazione.

**Tabella 2.2.** Vigneti campionati nel 2012, trattamenti antibiotritici effettuati nell'annata di campionamento e nelle annate precedenti e incidenza della malattia (%I).

Vigneti	Comune	Cultivar	Trattamenti antibiotritici 2011 *	Trattamenti annate precedenti,	%I
17	Pozzolengo (BS)	Trebbiano	boscalid (B) cyprodinil+fludioxonil (C)	boscalid (A) 3 anni pyrimethanil (C) 7 anni cyprodinil+fludioxonil (B) 4 anni	5
18	Sirmione (BS)	Trebbiano	thiohanate methyl (A) cyprodinil+fludioxonil (B) boscalid (C)	cyprodinil + fludioxonil 4 anni boscalid 3 anni	2
19	Adro (BS)	Cabernet	mepanipyrin (A e B)	pyrimethanil (A e B) 6-7 anni	2
20	Berbenno (SO)	Chiavennasca	pyrimethanil (C)	anilinopirimidine 3 anni	25
21	Berbenno (SO)	Chiavennasca	pyrimethanil (C) cyprodinil+fludioxonil (D)	pyrimethanil (C) cyprodinil+fludioxonil (D) 2 anni	35
22	Chiuro (SO)	Chiavennasca	cyprodinil+ fludioxonil (C)	cyprodinil+fludioxonil (B/C) 3 anni	2
23	Torrazza Coste (PV)	Barbera	fluazinam (B)	iprodione (B) 3 anni fluazinam (C) 2 anni mepanipyrin (C) 5 anni	10
24	Torrazza Coste (PV)	Pinot	mepanipyrin (A) cyprodinil+fludioxonil (B)	pyrimethanil (A) cyprodinil+fludioxonil (B) 3 anni	2
25	Casteggio (PV)	Barbera	fluazinam (B)	cyprodinil+fludioxonil 2 - 3 anni	30
26	Gonzaga (MN)	Lambrusco	cyprodinil+fludioxonil (B)	cyprodinil+fludioxonil (B) 4 anni	10
27	Ponti sul Mincio (MN)	Garganega	cyprodinil+fludioxonil (B)	cyprodinil+fludioxonil (B) 4 anni	40
28	Cavriana (MN)	Merlot	cyprodinil+fludioxonil (B)	cyprodinil + fludioxonil in B fenhexamid in D	50

\*B: chiusura del grappolo; C: inizio invaiatura; D: inizio maturazione.

**Tabella 2.3.** Vigneti campionati nel 2013, trattamenti antibiotritici effettuati nell'annata di campionamento e nelle annate precedenti e incidenza della malattia (%I).

Vigneti	Comune	Cultivar	Trattamenti antibiotritici 2011 *	Trattamenti annate precedenti,	%I
29	Cazzago San Martino (BS)	Chardonnay B	cyprodinil; mepanipyrin	cyprodinil; mepanipyrin; fenhexamid	5,3
30	Rodengo Saiano (BS)	Chardonnay B	Nessuno	cyprodinil + fludioxonil per 2 anni	11,9
31	Erbusco (BS)	Chardonnay B	2 boscalid; cyprodinil + fludioxonil	boscalid; cyprodinil + fludioxonil; pyrimethanil	9,3
32	Cortefranca (BS)	Chardonnay B	2 boscalid; cyprodinil + fludioxonil	boscalid; cyprodinil + fludioxonil; pyrimethanil	5,4
33	Adro (BS)	Chardonnay B	boscalid	boscalid per 4 anni	16,5
34	Sirmione (BS)	Trebbiano	boscalid+pyrimethanil	fenhexamid; cyprodinil + fludioxonil per 2 anni	1
35	Torrazza Coste (PV)	Barbera	fluazinam (B)	cyprodinil+fludioxonil per 5 anni, boscalid per 4 anni	1
36	Chiuro (SO)	Chiavennasca	cyprodinil+fludioxonil (C)	cyprodinil+fludioxonil in B/C per 4 anni	1

\*B: chiusura del grappolo; C: inizio invaiatura.

## ISOLAMENTO DEI CEPPI MONOSPORIALI

I campioni, posti in contenitori di plastica sterili contenenti un dischetto di carta bibula bagnato con acqua sterile, sono stati conservati in una borsa frigorifera, portati in laboratorio e sottoposti immediatamente alle procedure di isolamento dei ceppi di *B. cinerea*. Da ciascun vigneto sono stati ottenuti 20 ceppi monosporiali secondo il seguente procedimento.

Una ridotta quantità di conidi di *B. cinerea* è stata prelevata dalla superficie dell'organo infetto con un'ansa sterile e posta in 1 mL di soluzione composta da acqua distillata sterile e Tween® 20 allo 0,01%. Previa agitazione, 100 µL di sospensione sono stati prelevati e disseminati su agar-acqua all'1,5 % contenuto in piastre Petri (Ø 9 cm). Dopo una notte di incubazione a 20 °C, le piastre sono state osservate al microscopio ottico allo scopo di prelevare, con bisturi sterile, singole spore in fase di germinazione. Queste sono state inoculate su terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar, Difco®, Becton & Dickinson Co.) contenuto in piastre Petri (Ø 6 cm). Le colture di *B. cinerea* sono state poste a incubare ad una temperatura di 20 °C, fino a ottenere colonie sporulanti.

Tutti i materiali e i terreni colturali sono stati sterilizzati in autoclave a 1 atm, 121 °C per 20'.

## CONSERVAZIONE DEI CEPPI

Da ogni ceppo monosporiale in crescita su PDA sono stati prelevati 10 tasselli di agar-micelio mediante un foratappi di 6 mm di diametro sterilizzato alla fiamma, i quali sono stati trasferiti in provette Eppendorf da 2 mL contenenti una soluzione di acqua distillata e glicerolo al 15 % e conservati a -20 °C e/o a -80 °C. Per i ceppi conservati a -80 °C la capacità di dar luogo allo sviluppo di nuove colonie si protrae per diversi anni.

## CRESCITA DEI CEPPI DI *B. CINEREA* IN PRESENZA DI VARIE SOSTANZE ATTIVE

### **Preparazione e conservazione delle sospensioni conidiche**

L'allestimento della prova ha comportato in primo luogo la preparazione di sospensioni conidiche a concentrazione nota. I conidi dei ceppi di *B. cinerea* sono stati ottenuti da colture cresciute su PDA per 7 giorni a 20°C, al buio (Raposo *et al.*, 1995). Al termine del periodo di incubazione i conidi sono stati prelevati con un'ansa sterile e risospesi in 1 mL di acqua e glicerolo al 15% contenuto all'interno di una provetta sterile. La concentrazione dei conidi è stata determinata al microscopio ottico, mediante l'ausilio di una camera contaglobuli KOVA. Aliquote delle sospensioni sono state prelevate e poste in una quantità di soluzione di acqua e glicerolo al 15% tale che la concentrazione finale risultasse pari a  $2 \times 10^4$  conidi/mL. Le sospensioni di conidi state conservate a -20 °C. Per ogni ceppo sono state approntate quattro sospensioni conidiche.

### **Esecuzione dei saggi di crescita**

I saggi di crescita sono stati eseguiti in terreno di coltura liquido, preparato secondo quanto riportato da Myresiotis e collaboratori (2007), addizionato con il fungicida. Per il saggio relativo a cyprodinil si è resa necessaria la preparazione di un terreno privo dell'estratto di lievito poiché in esso è contenuto l'aminoacido metionina, la cui sintesi è inibita dall'attività delle anilinopirimidine: l'assunzione della metionina dal terreno colturale da parte dei ceppi di *B. cinerea* non permetterebbe di valutare l'eventuale attività inibitoria svolta dai fungicidi saggiati e darebbe luogo a falsi positivi per la resistenza.

Tutte le operazioni di manipolazione dei ceppi di *B. cinerea* sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare, mentre la preparazione delle soluzioni contenenti il fungicida sono state effettuate sotto cappa chimica.

Le sostanze attive (technical grade) sono state saggiate secondo le concentrazioni riportate in **Tabella 2.4**. Esse sono state dapprima disciolte in una soluzione di dimetilsolfossido (DMSO) fino alla concentrazione di 10 g/L e poi serialmente diluite in terreno di coltura liquido fino ad ottenere concentrazioni pari al doppio di quanto riportato in **Tabella 2.4**.

**Tabella 2.4.** Sostanze attive e relative concentrazioni finali saggate espresse in mg/L

Sostanza attiva	Concentrazione (mg/L)							
Boscalid	0	0,005	0,05	0,25	0,5	2,5	5	25
Fludioxonil	0	0,00025	0,0025	0,025	0,05	0,25	2,5	5
Fenhexamid	0	0,0005	0,005	0,025	0,05	0,25	0,5	5
Cyprodinil	0	0,00025	0,0025	0,025	0,5	0,25	2,5	5

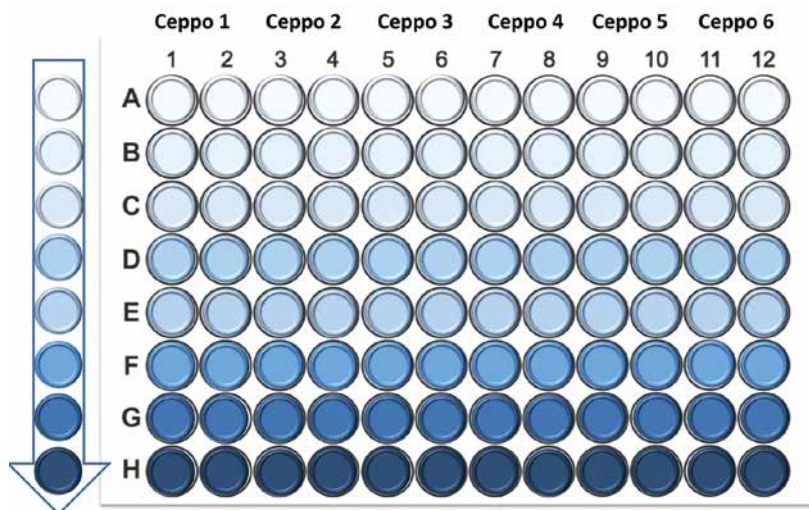
Mediante l'utilizzo del sistema di pipettaggio automatico Ep-motion 5075 (Eppendorf), 50 µL di terreno liquido contenente il fungicida e 50µL di sospensione conidica ( $1 \times 10^4$  conidi per pozzetto) sono stati posti in piastre di polistirene sterili da 96 pozzetti con il fondo piatto. Per evitare effetti negativi sulla crescita del micete imputabili al solvente in cui sono state disciolte le sostanze attive, la concentrazione di DMSO nei pozzetti è stata tale da non superare mai lo 0,3 %. Per ogni ceppo sono stati allestiti pozzetti privi di fungicida e di DMSO da utilizzare come testimoni non trattati. Lo schema della piastra è riportato in **Figura 2.3** dove ciascuna soluzione contenente il fungicida è stata distribuita distintamente in una singola riga seguendo un ordine di concentrazione crescente, mentre le sospensioni conidiche sono state inoculate per colonna avendo cura di allestire 2 ripetizioni per ciascun ceppo.

Le piastre sono state immediatamente sottoposte a lettura dell'assorbanza (492 nm) allo spettrofotometro per micropiastre Sunrise® Absorbance Reader (Tecan Group Ltd.), chiuse con un coperchio e successivamente poste ad incubare per 72 ore a 20 °C ed in assenza di luce. Al termine delle 72 ore è stata ripetuta la lettura allo spettrofotometro per verificare la crescita del micete.

Dalla differenza tra le due letture è possibile quantificare la variazione di densità ottica nei singoli pozzetti e quindi di biomassa fungina nell'intervallo di tempo considerato. Il confronto del dato relativo ai pozzetti contenenti conidi non trattati e quelli esposti alle diverse concentrazioni di sostanze attive ha permesso di calcolare la percentuale di inibizione della crescita (IC) relativa a ciascuna sostanza attiva e concentrazione saggiata secondo la formula:

$$IC = \frac{[A_{13} - A_{10} \text{ nontrattato}] - [A_{13} - A_{10} \text{ trattato}]}{A_{13} - A_{10} \text{ nontrattato}} \times 100$$

dove  $A_{13}$ =assorbanza a 72 ore dall'inoculazione;  $A_{10}$ =assorbanza al tempo 0; 'non trattato' indica il terreno di controllo; 'trattato' indica la singola concentrazione di fungicida.



**Figura 2.3.** Piastra multipozzetto con lo schema della prova relativa 6 ceppi di *B. cinerea*. Le concentrazioni crescenti di fungicida, da 0 al valore massimo, sono rappresentate in scala di blu.

## CALCOLO DELL'EC<sub>50</sub>

Il calcolo della EC<sub>50</sub>, espressa come concentrazione di fungicida in grado di inibire la crescita del micete nella misura del 50 % rispetto al mezzo colturale privo di sostanza attiva, è stato eseguito allo scopo di valutare eventuali variazioni nella risposta al fungicida imputabili alla presenza di ceppi resistenti.

I valori di EC<sub>50</sub> sono stati utilizzati per calcolare il fattore di resistenza (FR) dei singoli ceppi, calcolato in base alla formula:  $FR = EC_c / EC_{mv}$  dove:

EC<sub>c</sub> = EC<sub>50</sub> di ciascun ceppo

EC<sub>mv</sub> = valore medio assunto da EC<sub>50</sub> nel vigneto non trattato di Tirano (SO) campionato nel 2011.

I valori medi di EC<sub>50</sub> del vigneto di Tirano (SO) sono risultati pari a 0,242 mg/L per boscalid, 0,617 mg/L per cyprodinil, 0,0981 mg/L per fenhexamid e 0,0230 mg/L per fludioxonil. Fattori di resistenza superiori a 10 sono stati considerati un primo indice di riduzione della sensibilità del ceppo o della popolazione, mentre FR inferiori a 10 sono stati attribuiti a ceppi dotati di una normale sensibilità nei confronti della sostanza attiva in esame.

Tutte le analisi sono state effettuate mediante il software SPSS v. 21.

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

I ceppi di *B. cinerea* sono stati analizzati a livello molecolare per determinare la variabilità genetica, espressa come distribuzione della polarità sessuale (mating type) e presenza di elementi trasponibili, ovvero sequenze di DNA in grado di spostarsi e inserirsi in posizioni diverse del genoma mediante trasposizione. Gli elementi trasponibili caratterizzati in *B. cinerea* sono *Boty* (Diolez *et al.*, 1995), trasposone di classe 1 (retrotrasposone) e *Flipper* (Levis *et al.*, 1997) un trasposone di classe 2.

*B. cinerea* è prevalentemente eterotallica e presenta due distinti tipi di polarità sessuale, *MAT1-1* e *MAT1-2*. E' stato pertanto valutata la polarità sessuale di tutti i ceppi per avere informazioni sulla possibile influenza della riproduzione sessuale sulla trasmissibilità dei caratteri di resistenza ai fungicidi.

## ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA

Il micelio di *B. cinerea* utilizzato per l'estrazione del DNA è stato ottenuto da colonie in attiva crescita su terreno di coltura MEA (2 % Malt Extract, 2 % bacto Agar) ricoperto con uno strato di Cellophane sterile (BCL Cellophane, Bridgewater, UK) in piastre Petri da 9 cm di diametro. Dopo un'incubazione di 48-60 ore a 20 °C al buio, 200/300 mg di micelio sono stati raccolti con un'ansa sterile e trasferiti in una provetta sterile da 2 mL. Il contenuto della provetta è stato congelato e polverizzato con azoto liquido utilizzando un micro-pestello sterile. Il protocollo di estrazione e purificazione del DNA è stato effettuato secondo quanto descritto da Vercesi e collaboratori (2014).

Il DNA è stato risospeso in tampone TE (pH 8,0) (10 mM Tris base; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) e conservato a -20 °C fino alle successive prove.

## IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI BOTY E FLIPPER

La presenza dei due elementi trasponibili nei singoli ceppi è stata effettuata mediante reazione di multiplex PCR utilizzando la procedura riassunta in **Figura 2.4**. Come controllo negativo è stato omesso il DNA. I prodotti della PCR sono stati visualizzati ai raggi UV a seguito di **elettroforesi in gel di agarosio** (1,5%) utilizzando il tampone TAE ed etidio bromuro (0,005%). La discriminazione tra *Boty* e *Flipper* è stata effettuata



**PCR:** la tecnica di reazione a catena della polimerasi (in inglese Polymerase Chain Reaction) è un'applicazione versatile che permette di produrre un numero estremamente grande (milioni) di copie di una specifica sequenza di DNA a partire da una ridotta quantità (nell'ordine dei nanogrammi) di DNA stampo o bersaglio (in inglese template).

**Elettroforesi in gel di agarosio:** consente di separare e visualizzare i prodotti di amplificazione della PCR. L'elettroforesi consente di caratterizzare la composizione di un prodotto di PCR sfruttando la mobilità del DNA in un campo elettrico. Poiché il DNA è carico negativamente, si muove dal polo negativo verso il polo positivo. L'utilizzo del gel, che costituisce una fitta rete di pori, permette al DNA di muoversi ad una velocità diversa nella cella elettroforetica in funzione della propria dimensione. Alla fine del processo è possibile visualizzare molecole di DNA amplificate dalla diversa dimensione sotto forma di bande luminose se esposte ai raggi ultravioletti, previa colorazione mediante un colorante intercalante come il bromuro di etidio.



in funzione della lunghezza dell'amplificato, che con i primer per *Boty* è 970 bp (base pairs-paia di basi), con i primer per *Flipper* è di 1250 bp (**Figura 2.4**).

I ceppi di *B. cinerea* sono stati denominati:

- *transposa*, se caratterizzati dalla presenza di *Boty* e *Flipper*;
- *Boty*, se caratterizzati dalla sola presenza dell'elemento *Boty*;
- *Flipper*, se aventi il solo elemento *Flipper*;
- *vacuma*, se contraddistinti dall'assenza di entrambi gli elementi.



**Multiplex PCR:** consente di amplificare contemporaneamente diverse sequenze di DNA bersaglio all'interno del DNA di partenza. Per poter essere distinti mediante elettroforesi in gel di agarosio, i prodotti di amplificazione devono essere di dimensioni diverse.

## IDENTIFICAZIONE DELLA POLARITÀ SESSUALE (MAT 1-1 E MAT 1-2)

La distribuzione dei mating type (*MAT 1-1* e *MAT 1-2*) è stata determinata mediante multiplex PCR utilizzando le coppie di primer fornite da Faretra e collaboratori (Università degli Studi di Bari Aldo Moro) (**Figura 2.4**). La coppia di primer *MAT 1-1* amplifica una sequenza di 627 bp mentre la coppia di primer *MAT 1-2* amplifica 958 bp. Sono stati utilizzati come controlli positivi i ceppi di *B. cinerea* SAS405 per *MAT 1-1* e SAS56 per *MAT 1-2* gentilmente forniti da Faretra, e acqua distillata come controllo negativo.

Gli amplificati sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio, come precedentemente descritto, e i ceppi sono stati attribuiti all'una o all'altra polarità sessuale in funzione della presenza della banda di interesse (**Figura 2.4**).

Il confronto tra le frequenze dei ceppi *MAT1-1* rispetto a quelle dei ceppi *MAT 1-2* per ciascuna popolazione di *B. cinerea* è stato realizzato utilizzando il test  $\chi^2$ .

	<i>Boty/Flipper</i>	<i>MAT1-1/MAT1-2</i>
PRIMERS	<p><i>Boty</i></p> <p>ATAAAGAAGCAACCGGATGG AGTCTATCGGGTCCATCCTT</p> <p><i>Flipper</i></p> <p>CACAAAACCTACAGAAGA TCGTTTCTTGGACTGTA</p>	<p><i>MAT1-1</i></p> <p>AATGCAGAAGAGCCAACGA CGGTTCCAACCTTGAACAAT</p> <p><i>MAT1-2</i></p> <p>GTGGAGATGGTGGTGGAGTT GAAAATGGGTACCGCATCAC</p>
MISCELA DI AMPLIFICAZIONE	<p>-50 ng di DNA di <i>B. cinerea</i></p> <p>-10 µL di 2X Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix</p> <p>-0,15 µM di primer <i>Boty</i></p> <p>-0,6 µM di primer <i>Flipper</i></p> <p>-4,8 µL di acqua bi-distillata</p>	<p>-50 ng di DNA di <i>B. cinerea</i></p> <p>-12,5 µL di 2X Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix</p> <p>-0,1 µM di primer <i>MAT 1-1</i></p> <p>-0,6 µM di primer <i>MAT 1-2</i></p> <p>-6,7 µL di acqua bi-distillata</p>
CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE	<p>95 °C, 3 minuti</p> <p>94 °C, 1 minuto</p> <p>60 °C, 1 minuto</p> <p>72 °C, 90 secondi</p> <p>72 °C, 5 minuti</p> <p>35x</p>	<p>95 °C, 10 minuti</p> <p>95 °C, 15 secondi</p> <p>60 °C, 45 secondi</p> <p>72 °C, 1 minuto</p> <p>72 °C, 2 minuti</p> <p>40x</p>
GEL DI AGAROSIO	<p>Ceppo</p> <p>Transposa Boty Flipper Vacuma</p> <p>bp 1250 970</p>	<p>Ceppo</p> <p>MAT1-2 MAT1-1</p> <p>bp 958 627</p>

**Figura 2.4.** Condizioni di amplificazione e caratterizzazione dei ceppi per quanto riguarda la presenza di elementi trasponibili e la polarità sessuale.

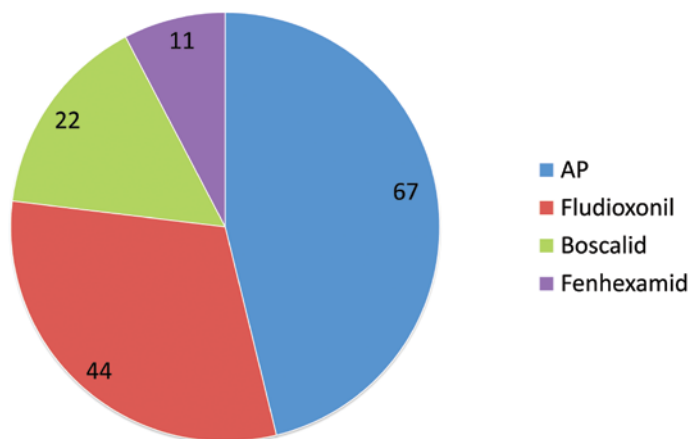
## 2B. RISULTATI E CONCLUSIONI

Come si può evincere dalla **Figura 2.5**, le sostanze attive afferenti alle anilinopirimidine, seguite da fludioxonil che viene in effetti utilizzato in miscela con l'anilinopirimidina cyprodinil, sono state le più utilizzate nei vigneti oggetto di monitoraggio. Boscalid è stato impiegato nel 22% dei casi, mentre fenhexamid solo nell'11%.

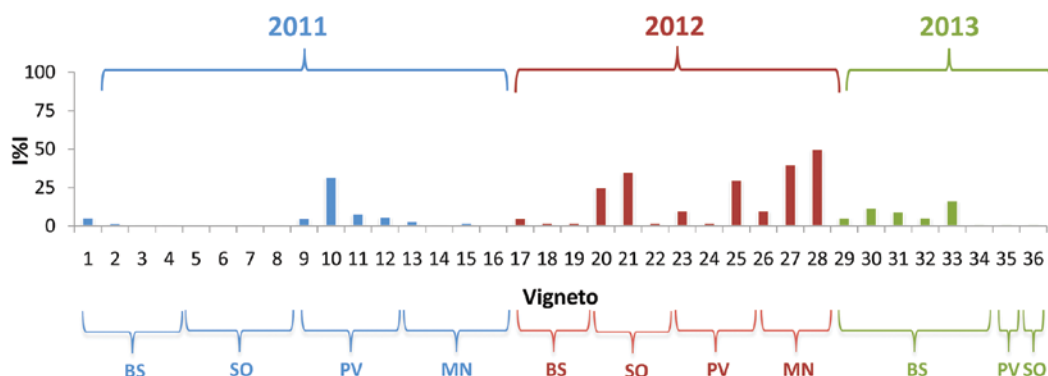
Per quanto riguarda l'entità la malattia, essa è stata molto ridotta nei vigneti monitorati nel 2011 (1%<8 %), ad eccezione di quello sito a Codevilla (PV), dove è stato riscontrato quasi il 32 % di 1%I (**Figura 2.6**). Nell'annata successiva, al contrario, la malattia si è mostrata frequentemente e con una decisa consistenza, con 1%I superiori compresi tra il 25 ed il 50%, in alcuni vigneti delle province di SO, PV e MN. Nel 2013, la malattia è stata diffusamente riscontrata solamente nella provincia di Brescia.

Nel corso delle indagini sono stati isolati ed analizzati complessivamente 720 ceppi di *B. cinerea*. In termini generali, la percentuale di inibizione della crescita di *B. cinerea* ha mostrato un incremento proporzionale all'aumento della concentrazione del fungicida analizzato nella maggior parte ceppi oggetto di indagine (**Figura 2.7**). In alcuni casi, laddove era presente resistenza, è stata osservata una ridotta inibizione della crescita del micelio anche a concentrazioni elevate di fungicida.

Nei prossimi paragrafi verranno illustrati i risultati relativi alle singole sostanze attive.

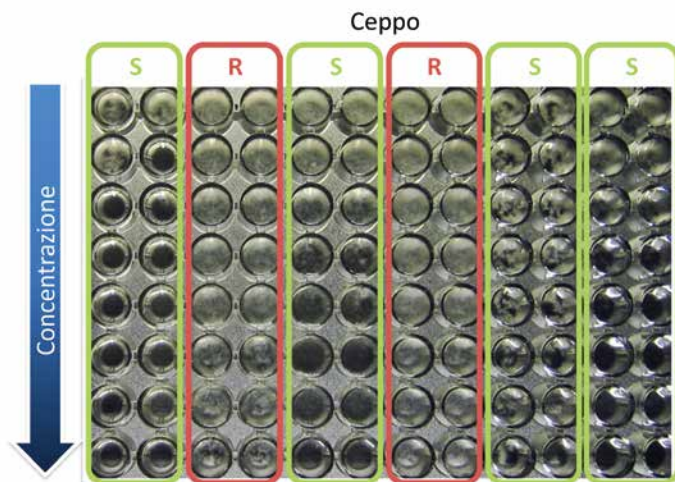


**Figura 2.5.** Percentuali di utilizzo in vigneto dei fungicidi antibiottrici saggiati nel corso dei tre anni di sperimentazione.



**Figura 2.6.** Incidenza della malattia, espressa come indice percentuale di infezione (1%I) nelle popolazioni di *B. cinerea* campionate nelle diverse province lombarde durante il triennio di indagine.





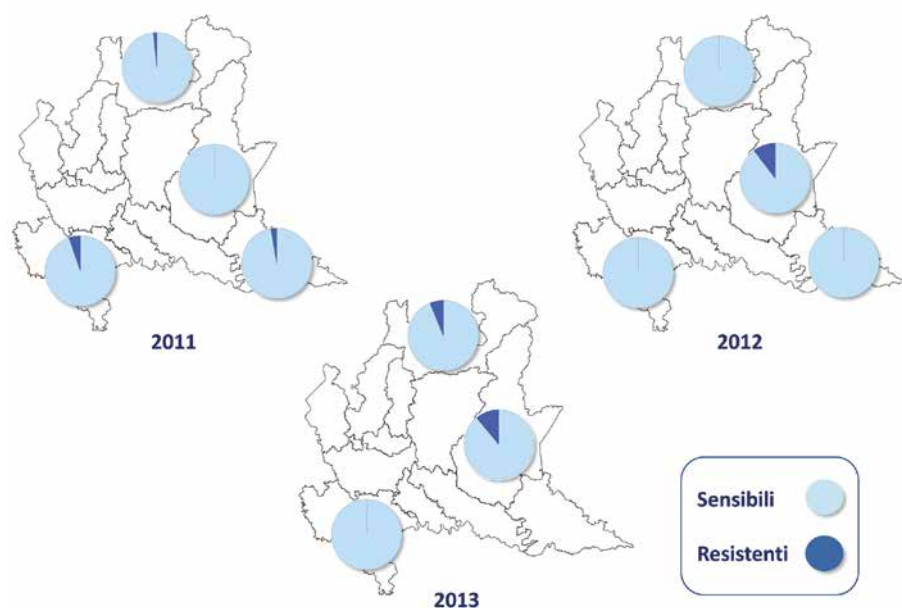
**Figura 2.7.** Esempio di crescita di ceppi sensibili (S) e resistenti (R) sul terreno liquido addizionato con concentrazioni crescenti di fungicida.

### CARBOSSAMIDI - BOSCALID

Le  $EC_{50}$  relative a boscalid dei ceppi di *B. cinerea* isolati nei vigneti sperimentali si sono attestate su valori generalmente contenuti. I ceppi sensibili ( $FR < 10$ ) sono stati caratterizzati da  $EC_{50}$  inferiori a 2,4 mg/L di sostanza attiva, valore superato dai ceppi resistenti ( $FR > 10$ ). La percentuale di individui resistenti sul totale saggiato nei tre anni di indagine è molto ridotta: infatti solamente il 3,4 % dei ceppi, prevalentemente isolato nel 2012 e 2013 da vigneti siti nella provincia di Brescia, si sono distinti per  $FR > 10$ . I valori di  $EC_{50}$  dei ceppi di *B. cinerea* sensibili a boscalid sono in linea con quelli riscontrati da altri Autori su isolati di vite (**Tabella 2.5**). La presenza di ceppi resistenti nella popolazione non sembra essere associata all'esecuzione di trattamenti a base di carbossamidi in vigneto.

**Tabella 2.5.** Confronto tra i valori di  $EC_{50}$  dei ceppi sensibili a boscalid, fludioxonil, fenhexamid e cyprodinil del presente studio e di ceppi sensibili (S), mediamente resistenti (MR) o resistenti R riscontrati da altri Autori.

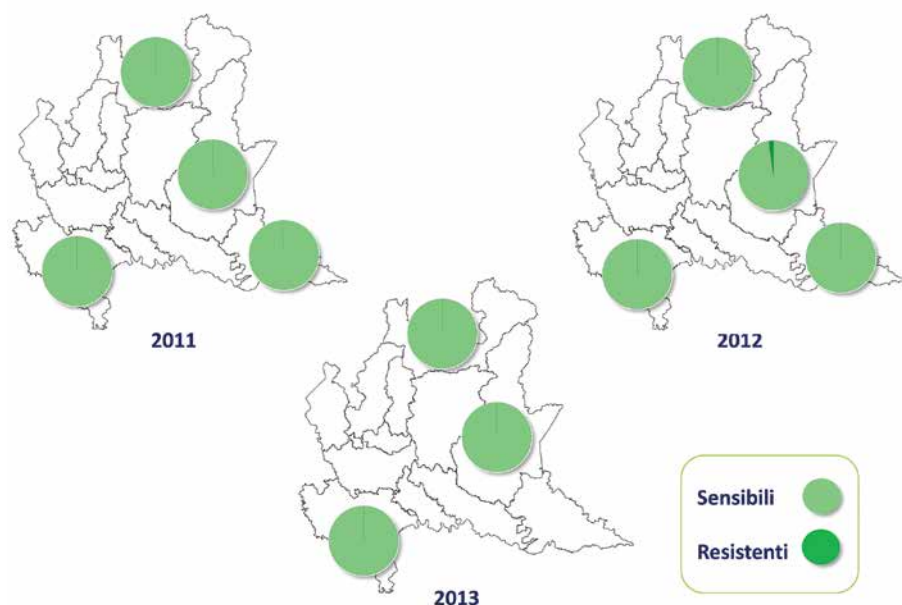
Sostanza attiva	Classe	$EC_{50}$ (mg/L)				Coltura
		Boscalid	Fludioxonil	Fenhexamid	Cyprodinil	
Kretschmer <i>et al.</i> , 2009	S	$0,08 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,006 \pm 0,001$	Vite
Stammler e Speakman, 2006	S	0,01-0,21	-	-	-	Vite
Leroux, 2007	S	0,4	0,004	0,01	0,01	Vite
Weber e Hahn, 2011	S	0,04-0,346	0,01-0,178	0,06-0,23	0,03-0,48	Fragola e Lampone
	MR	-	0,3-0,65	-	0,75-1,44	
	R	3,43-54,5	-	>100	1,89-22,7	
Presente studio, 2011	S	$0,18 \pm 0,1$	$0,02 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,13$	Vite
Presente studio, 2012	S	$0,06 \pm 0,08$	$0,04 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,79$	Vite
Presente studio, 2013	S	$0,10 \pm 0,19$	$0,01 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,65$	Vite



**Figura 2.8.** Percentuali di ceppi sensibili e resistenti a boscalid a livello provinciale nel 2011-2013.

### IDROSSIANILIDI - FENHEXAMID

I valori di  $EC_{50}$  relativi a fenhexamid, piuttosto contenuti e analoghi a quelli rilevati in studi precedenti (**Tabella 2.5**), indicano una situazione di normale sensibilità alla sostanza attiva nei vigneti oggetti di monitoraggio. Solamente un ceppo, isolato nel vigneto bresciano di Adro nel 2012, è risultato resistente (**Figura 2.9**). Il quadro generale per quanto riguarda fenhexamid non desta preoccupazioni ed è compatibile con il ridotto utilizzo della sostanza attiva nei vigneti lombardi. Il ritrovamento di un individuo resistente è giustificata dalla variabilità genetica del fungo.



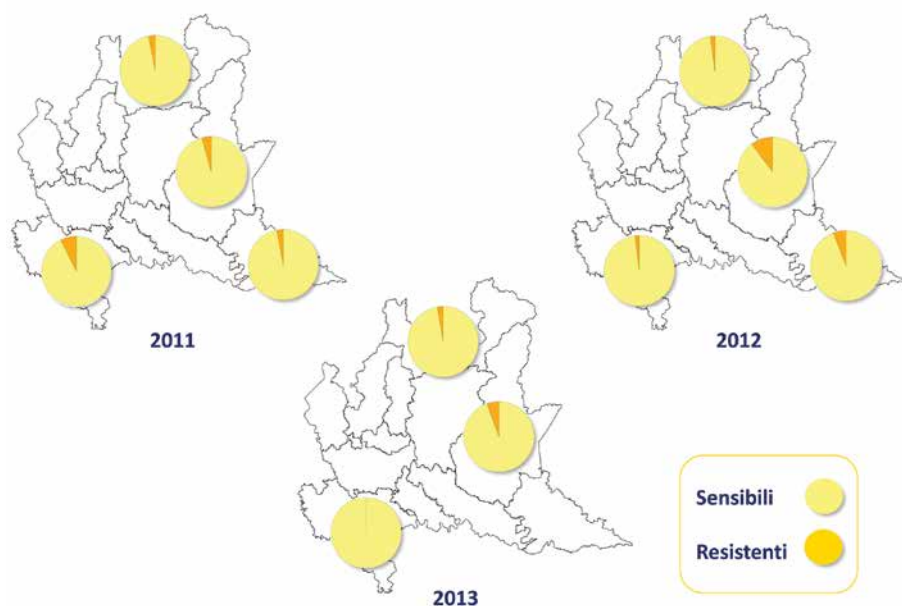
**Figura 2.9.** Percentuali di ceppi sensibili e resistenti a fenhexamid a livello provinciale nel 2011-2013.

## ANILINOPIRIMIDINE - CYPRODINIL

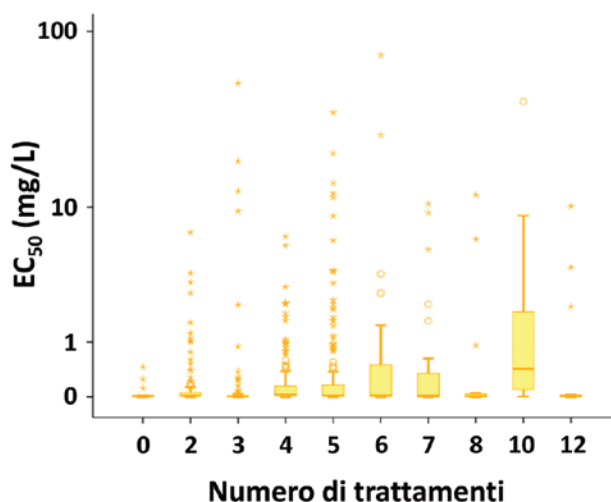
La presenza di ceppi resistenti a cyprodinil, sebbene in percentuale ridotta rispetto ai sensibili, è stata uniformemente distribuita nelle diverse province e nelle annate (**Figura 2.10**).

I valori di  $EC_{50}$  relativi ai ceppi sensibili ( $FR < 10$ ) saggiati nel presente studio ( $0,36 \pm 0,13$  nel 2011;  $0,33 \pm 0,79$  nel 2012; e  $0,24 \pm 0,65$  nel 2013) sono più elevati rispetto a quelli dei ceppi sensibili individuati da altri Autori (**Tabella 2.5**): ciò potrebbe essere imputabile al fatto che le anilinoipirimidine, che comprendono sostanze attive con struttura chimica diversa ma dotate dello stesso meccanismo d'azione e pertanto caratterizzate da resistenza incrociata, vengono utilizzate da numerosi anni in Lombardia. Di conseguenza l' $EC_{50}$  per questi prodotti potrebbe risultare più elevata rispetto a quanto riscontrabile in situazioni in cui i ceppi non sono mai venuti a contatto con fungicidi appartenenti a questa classe di resistenza. La mancanza di dati pregressi sulla baseline (sensibilità di base) delle popolazioni di *B. cinerea* in Lombardia, impedisce, purtroppo, di stabilire se quanto riscontrato rappresenti uno scostamento delle popolazioni da una normale sensibilità. Se si considera il numero totale di trattamenti effettuati con le anilinoipirimidine in ciascun vigneto a partire dal 2006, si può notare una tendenza verso un progressivo incremento nella distribuzione dei valori di  $EC_{50}$  delle popolazioni *B. cinerea* imputabile all'accumulo del numero di trattamenti nel corso del tempo (**Figura 2.11**).

Tuttavia, secondo i risultati dei saggi effettuati con cyprodinil, l'esecuzione di trattamenti a base di anilinoipirimidine in vigneto non sembra essere associata ad una riduzione della sensibilità media delle popolazioni: la frequenza di individui resistenti a cyprodinil è piuttosto contenuta (4,2 %). E' evidente tuttavia che i tre dei quattro ceppi outliers con FR maggior di 10 sono stati isolati nei vigneti sottoposti nel 2013, e nelle annate precedenti, ad interventi effettuati con formulati a base di anilinoipirimidine.



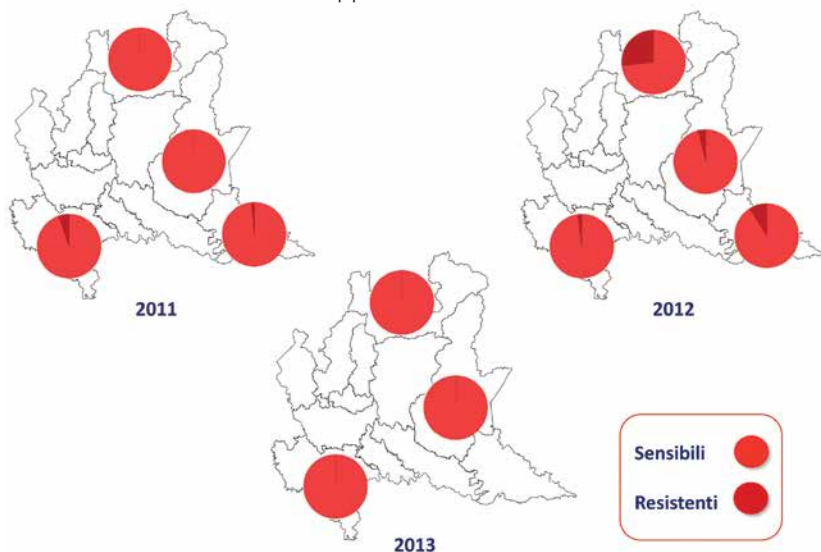
**Figura 2.10.** Percentuali di ceppi sensibili e resistenti a cyprodinil a livello provinciale nel 2011-2013.



**Figura 2.11.** Distribuzione box-plot dei valori di  $EC_{50}$  (mg/L) dei ceppi di *B. cinerea* in relazione al numero di trattamenti effettuati in vigneto dal 2006 all'annata di campionamento.

### FENILPIRROLI - FLUDIOXONIL

Per quanto concerne la classe dei fenilpirroli, la maggior parte dei ceppi di *B. cinerea* saggati si è rivelata sensibile, con valori di  $EC_{50}$  in linea con quelli riscontrati da altri Autori (**Tabella 2.5**). La percentuale di ceppi resistenti si è attestata entro valori analoghi a quelli di cyprodinil (4,2 %). Tuttavia è possibile notare un andamento diverso nella composizione delle popolazioni nel corso del tempo: la maggior parte dei ceppi resistenti è stata isolata nell'annata 2012, principalmente da vigneti valtellinesi (**Figura 2.12**). Nel 2011 sono stati isolati sporadici ceppi resistenti nelle province di Pavia e Brescia, mentre nel 2013 è stata riscontrata unicamente la presenza di individui sensibili a fludioxonil. La situazione osservata nel 2012 potrebbe essere imputabile al generale andamento della malattia, la quale è stata più consistente rispetto a quanto osservato nelle altre due annate e potrebbe aver favorito la diffusione dei ceppi resistenti.



**Figura 2.12.** Percentuali di ceppi sensibili e resistenti a fludioxonil a livello provinciale nel 2011-2013.

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI

Circa la metà dei ceppi di *B. cinerea* provenienti dai vigneti lombardi monitorati tra il 2011 ed il 2013 è caratterizzata dalla presenza di entrambi gli elementi trasponibili (*Boty* e *Flipper*), appartenendo così al gruppo *transposa* (Figura 2.13). La restante parte degli isolati possiede per la maggior parte l'elemento trasponibile *Boty* o non possiede alcun elemento trasponibile (*vacuma*). Solo tra il 2 ed il 6 % degli individui possiede l'elemento trasponibile *Flipper* da solo.

Sebbene in termini assoluti le percentuali delle 4 categorie molecolari (*vacuma*, *transposa*, *Boty* e *Flipper*) abbiano subito variazioni nei tre anni, la distribuzione dei ceppi del patogeno è risultata pressoché stabile.

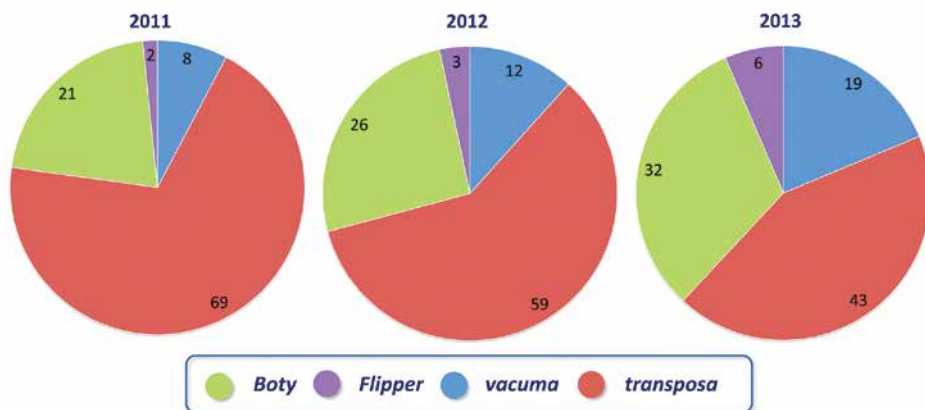


Figura 2.13. Percentuali dei ceppi *Boty*, *Flipper*, *vacuma* e *transposa* nel triennio 2011-2013.

La presenza/assenza degli elementi trasponibili non sembra essere associata a scarsi livelli di sensibilità. Inoltre, non sembra esserci relazione tra la presenza di una tipologia molecolare con alti livelli di EC<sub>50</sub> anche se è da sottolineare che, se si considerano tutti i ceppi resistenti alle quattro classi di fungicidi saggiate isolati nel corso dei tre anni di studio, si può notare come essi appartengano per la maggior parte alle categorie *transposa* e *Boty* (Figura 2.14). Le uniche eccezioni sono rappresentate da due ceppi resistenti a boscalid e due ceppi a fludioxonil che sono risultati *vacuma*. Nessuno dei ceppi appartenenti alla classe *Flipper* è risultato resistente alle 4 classi di fungicidi. Sembra pertanto che gli individui resistenti alle sostanze attive saggiate appartengano, quindi, per la maggior parte alla categoria molecolare *transposa* o *Boty*.

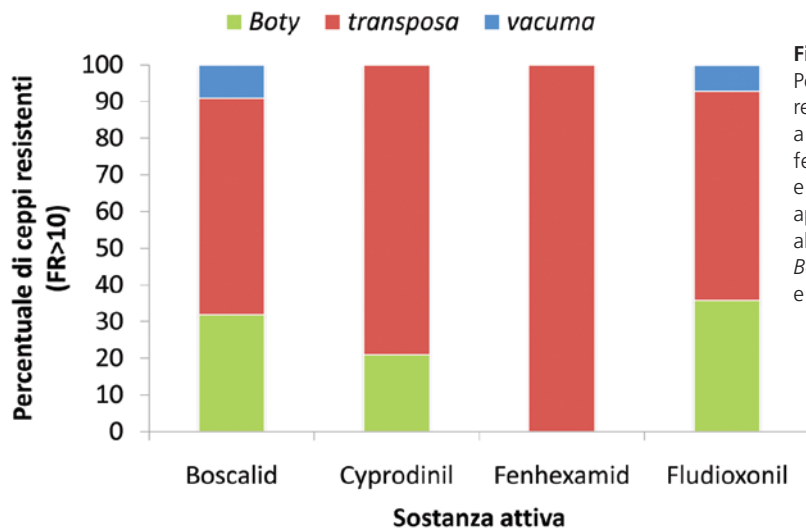
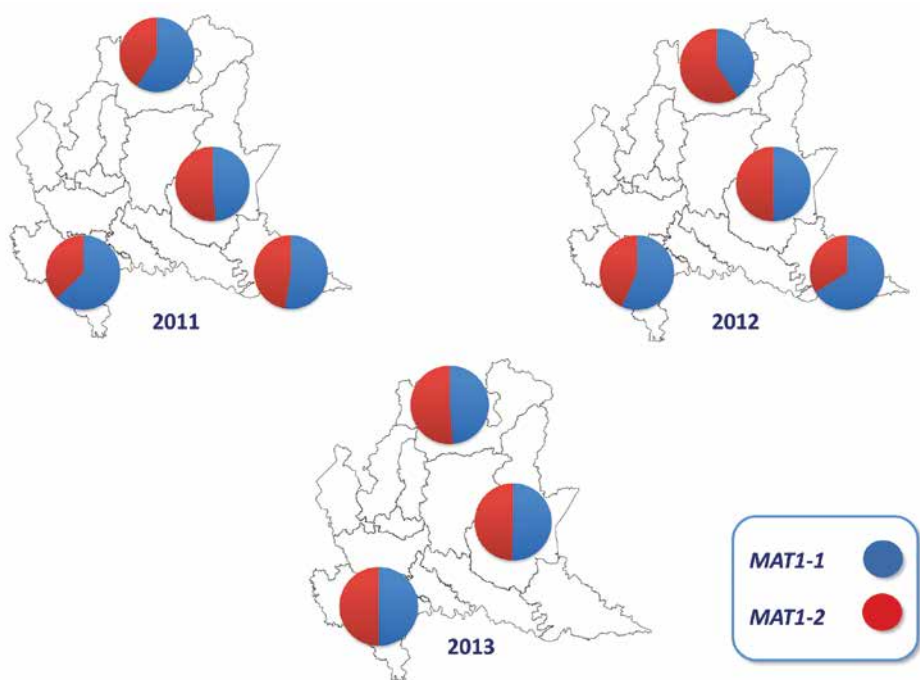


Figura 2.14. Percentuali di ceppi resistenti (FR > 10) a boscalid, cyprodinil, fenhexamid e fludioxonil appartenenti alle classi molecolari *Boty*, *transposa* e *vacuma*.

Per quanto concerne, invece, la polarità sessuale dei ceppi di *B. cinerea*, è stato possibile rilevare un significativo equilibrio (1:1) nelle frequenze dei due mating types, *MAT1-1* e *MAT1-2* (**Figura 2.15**) a livello delle singole province nei tre anni di indagine. Le uniche eccezioni sono costituite dalla provincia di Pavia nel 2011 e dalla provincia di Mantova nel 2012, dove si è assistito ad una maggior presenza di individui *MAT1-1* rispetto ai *MAT1-2* secondo il test statistico impiegato ( $\chi^2 = 0,9$ ;  $df=1$ ;  $P=0,02$ ). Nel 2013 non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra le distribuzioni delle due polarità sessuali ( $\chi^2=0,007$ ;  $P=0,932$ ;  $df=1$ ). In generale, quindi, il rapporto *MAT1-1*:*MAT1-2* coincide esattamente con il teorico 1:1 tipico di una popolazione che si riproduce in modo sessuato e casuale. Gli stessi risultati sono stati ottenuti considerando le popolazioni a livello di vigneto: anche in questo caso il rapporto *MAT1-1*:*MAT1-2* è risultato statisticamente simile all'atteso 1:1.



**Figura 2.15.** Frequenza dei ceppi *MAT1-1* e *MAT1-2* nelle diverse province lombarde nel 2011-2013



In conclusione, le popolazioni di *B. cinerea* analizzate nel corso della presente attività di monitoraggio hanno mostrato una buona sensibilità nei confronti di fenhexamid, boscalid, cyprodinil e fludioxonil. Per quanto riguarda le ultime tre sostanze attive, è stato possibile rilevare, in percentuale ridotta, individui resistenti, probabilmente in conseguenza del largo impiego delle classi di appartenenza di tali sostanze attive nei vigneti lombardi nel corso degli anni. In generale i ceppi sono risultati resistenti ad un'unica sostanza attiva, ad eccezione di 5 individui isolati nel 2011 e di 1 nel 2013. Tali ceppi sono risultati sempre resistenti ( $FR > 10$ ) o moderatamente resistenti ( $5 < FR < 10$ ) a boscalid e contemporaneamente resistenti a cyprodinil (4 ceppi), fludioxonil (1 ceppo) e fenhexamid (1 ceppo). Inoltre, la quasi totalità dei ceppi resistenti è caratterizzata dalla presenza di entrambi gli elementi trasponibili (*transposa*) o da *Boty*. Tuttavia, poichè isolati con le medesime caratteristiche sono risultati, in generale, sensibili alle sostanze attive saggiate, non si può affermare che gli elementi trasponibili siano direttamente coinvolti nella resistenza ai fungicidi. Molto interessante, infine, è la frequenza dei mating type riscontrata nelle diverse province lombarde: poichè frequenze prossime al 50% dei due tipi sessuali indicano un'elevata probabilità che il fungo si riproduca sessualmente e casualmente, dai dati ottenuti emerge la concreta possibilità che le popolazioni di *B. cinerea* siano sessualmente ricombinanti, quindi le strutture riproduttive sessuate, gli apoteci, si possano ritrovare nei vigneti lombardi. Le popolazioni di *B. cinerea* lombarde presentano caratteristiche, come l'elevata presenza di individui con elementi trasponibili ed il sistema riproduttivo misto (sessuato e asessuato), tipiche di patogeni ad elevato rischio di resistenza (Mc Donald e Linde, 2002). Lo stato di sensibilità nei confronti dei fungicidi in tali popolazioni andrebbe pertanto tenuto sotto attento monitoraggio, anche alla luce dello scostamento dei valori di  $EC_{50}$  degli individui sensibili a cyprodinil verso valori più tipici di ceppi ritenuti mediamente resistenti da altri Autori (Weber e Hahn, 2011).

### 3. VENTURIA INAEQUALIS (COOKE) G. WINTER

La ticchiolatura è la più grave malattia del melo negli areali caratterizzati da temperature miti e frequenti precipitazioni nel periodo primaverile-estivo. Essa è causata dall'ascomicete *V. inaequalis*, un patogeno emi-biotrofico e policiclico in grado di infettare diversi organi della pianta. I danni più gravi sono a carico dei giovani frutti, molto suscettibili alla malattia, i quali presentano aree scure che negli stadi avanzati suberificano, e vengono deformati (**Figura 3.1**). Su foglia si osservano macchie inizialmente di colore giallastro che diventano più scure con il progredire dell'infezione (**Figura 3.1**). Le perdite di produzione possono essere sia dirette, a seguito dell'infezione di piccioli fiorali e giovani frutti, sia indirette, in caso di intensa defoliazione della pianta (Jones e Aldwinckle, 1990). *V. inaequalis* sverna prevalentemente sotto forma di pseudoteci, corpi fruttiferi differenziati sulle foglie cadute a terra. A fine inverno-inizio primavera all'interno di essi si differenziano aschi contenenti ascospore, spore di origine sessuata, le quali, rilasciate dagli pseudoteci durante le piogge e disperse dal vento, danno origine alle infezioni primarie che assumono un'importanza molto rilevante ai fini dell'andamento epidemico (Belli, 2012). Le ascospore germinano formando un tubetto germinativo che penetra attraverso la cuticola, direttamente o a seguito della formazione dell'appressorio, dando origine ad una struttura parenchimatosa multistratificata (stroma) tra la cuticola e lo spazio sottocuticolare (Bowen *et al.*, 2011). Il patogeno non penetra all'interno della cellula vegetale ma forma un micelio intercellulare traendo il nutrimento a seguito della lisi della parete dell'ospite. *V. inaequalis* emette gli organi di riproduzione agamica, i conidi, che daranno origine a nuovi cicli di infezione a seguito della rottura della cuticola.



Frutto



Foglia



**Figura 3.1.** Sintomi di ticchiolatura

La difesa nei confronti del patogeno non può prescindere dall'applicazione di buone pratiche agronomiche, volte alla riduzione delle condizioni che maggiormente favoriscono le infezioni, come il ristagno di umidità e la presenza di foglie infette sul suolo. La scelta di cv di melo meno suscettibili alla malattia costituisce una valida strategia, ma di fatto le preferenze dei consumatori esigono verso la coltivazione di cv che, purtroppo, risultano molto sensibili nei confronti del patogeno. La difesa chimica è la pratica più comune nelle zone ad alto rischio di infezione. Essa si può avvalere di diverse sostanze attive, multisito come il rame, che viene utilizzato in agricoltura biologica, e monosito sistemici e citotropici. Per quanto riguarda la seconda categoria, i formulati maggiormente utilizzati nei confronti di *V. inaequalis* in Lombardia contengono le sostanze attive appartenenti alla classe di resistenza dei Qol (trifloxystrobin), gli inibitori della biosintesi degli steroli DMI (myclobutanil), le anilino pirimidine AP (cyprodinil e pyrimethanil), le carbossamidi (boscalid) e la guanidina dodina. Ad eccezione di boscalid, è stata riscontrata resistenza nei confronti di tutte le sostanze attive monosito sopracitate in diverse nazioni quali Stati Uniti, Nuova Zelanda e Italia (Beresford *et al.*, 2012; Fiaccadori *et al.*, 2011; Köller *et al.*, 1997; Köller *et al.*, 2004; Köller *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2013). Nel corso del presente studio è stata intrapresa un'attività volta a saggiare la sensibilità nei confronti di tali sostanze attive mediante l'esecuzione di saggi di crescita su terreno agarizzato a seguito di isolamento di singoli ceppi di *V. inaequalis*.

### 3A. MATERIALI E METODI

#### SITI E MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO

Nei mesi di settembre e ottobre 2011, 2012 e 2013, sono state raccolte foglie di melo che mostravano sintomi di ticchiolatura in meleti situati nella provincia di Sondrio e Pavia (**Tabella 3.1**). Per ogni meleto sono state raccolte almeno 50 foglie, avendo cura di effettuare prelievi casuali su tutto l'appezzamento considerato. Due isolati caratterizzati da sensibilità nei confronti di tutte le sostanze attive saggate, i numeri 5 e 6, provengono da meleti incolti della Svizzera e, insieme all'isolato 261, prelevato in un meleto mai trattato con fungicidi in provincia di Como, costituiscono i campioni sensibili di riferimento per tutte le sostanze attive in esame. I trattamenti effettuati in meleto sono riportati in **Tabella 3.1**.

**Tabella 3.1.** Elenco degli isolati di *V. inaequalis* e dei meleti campionati tra il 2011 ed il 2013 e trattamenti con fungicidi monosito effettuati in campo.

Meleto	Anno	Isolato	Comune	rattamenti effettuati con le classi/sostanze attive oggetto di indagine
0	2011	5,6	-	Mai trattato
1		102	Poggiridenti (SO)	3 Qol, 1 dodina, 2-3 DMI
2		151,154	Ponte in Valtellina (SO)	2 Qol, 2 dodina, 2-3 DMI
3		165, 168, 170, 178, 180	Castellanica (SO)	1 Qol, 1 dodina, 2-3 DMI
4	2012	261	Caslino al Piano (CO)	Mai trattato
5		266	Chiuro (SO)	2 Qol, 1 dodina, 1 AP, 2-3 DMI
6		275, 276, 278, 280, 284	Tresivio (SO)	2-3 DMI
7		293, 294, 298, 299, 301	Chiuro, loc. Tassera (SO)	2 Qol, 1 dodina, 1 AP, 2-3 DMI
8		302	Poggiridenti, via Ciurasca (SO)	2 Qol, 1 dodina, 1 AP, 2-3 DMI
9		313, 316, 321, 322	Poggiridenti, via Surana (SO)	2 Qol, 1 dodina, 1 AP, 2-3 DMI
10		326, 327, 328	Teglio (SO)	Nessuno
11		329	Lanzada (SO)	Nessuno
12	2013	355, 357, 359	S. Cristina (SO)	Nessuno
13		361, 364	S. Cristina (SO)	2-3 DMI, 2 pyrimethanil
14		366, 370	Ponte in Valtellina (SO)	2 Qol, 6 DMI, 7 dodina, 2 boscalid, 3 AP
15		371, 373	Valdidentro, fraz. S. Carlo (SO)	1 Qol, 3 dodina, 2-3 DMI, 3 AP
16		375	Ponte Nizza (PV)	Qol, dodina, boscalid, AP, DMI
17		376, 378	Ponte Crenna (PV)	Qol, DMI
18		379, 380	Bagnaria (PV)	Nessuno
19		381	Bagnaria fraz. Zerbo (PV)	Qol, DMI
20		383	Bagnaria (PV)	1 dodina, DMI, AP

### ISOLAMENTO DEI CEPPI MONOSPORIALI

I campioni, posti in sacchetti di carta, sono stati conservati in una borsa frigorifera, portati in laboratorio e sottoposti immediatamente alle procedure di isolamento (**Figura 3.2**). Le aree fogliari contenenti singole lesioni sono state ritagliate mediante bisturi e strisciate su un substrato sterile costituito da agar-acqua all'1,5 % contenente tetraciclina (0,005 %), cloramfenicolo (0,01 %) e dichloran (0,002%) e posto in piastre Petri del diametro di 9 cm (Smith *et al.*, 1991). Le piastre sono state incubate per una notte alla temperatura di 20 °C. Il giorno successivo, al microscopio ottico (PrimoVert, Zeiss), singole spore in fase di germinazione sono state prelevate mediante un bisturi sterile e poste in piastre Petri contenenti il terreno di coltura PDA. Tutti i materiali culturali sono stati sterilizzati in autoclave a 1 atm, 121 °C per 20'. Le colture di *V. inaequalis* sono state poste a incubare ad una temperatura di 20 °C per almeno 4 settimane per favorire la crescita della colonia.



**Figura 3.2.** Schema della procedura di isolamento

### CONSERVAZIONE DEI CEPPI

La conservazione dei ceppi è avvenuta prelevando, mediante un foratappi di 6 mm di diametro sterilizzato alla fiamma, 20 tasselli di colonia cresciuta su PDA. Tali tasselli sono stati quindi trasferiti in provette Eppendorf da 2 ml contenenti una soluzione di acqua distillata e glicerolo al 15 %. Per ogni ceppo sono state allestite due provette distinte, ciascuna contenente 10 tasselli, che sono state conservate a -20 °C.

### CRESCITA DEI CEPPI DI *V. inaequalis* IN PRESENZA DEI FUNGICIDI

Per l'esecuzione dei saggi di sensibilità ai fungicidi, da ogni ceppo sono stati ricavati 69 tasselli (Ø 6 mm) da colonie in attiva crescita su PDA i quali sono stati utilizzati nelle prove di crescita su PDA addizionato con i fungicidi. Le sostanze attive (technical grade) sono state saggiate secondo le concentrazioni riportate in **Tabella 3.2**.

Sostanza attiva	Concentrazione (mg/L)				
Myclobutanil	0	0,005	0,05	0,5	5
Dodina	0	0,005	0,05	0,5	5
Trifloxystrobin	0	0,005	0,05	0,5	5
Boscalid	0	0,01	0,1	1	10
Cyprodinil	0	0,01	0,1	1	10

**Tabella 3.2.** Sostanze attive e relative concentrazioni finali saggiate espresse in mg/L

Trifloxystrobin, myclobutanil e cyprodinil sono stati disciolti in dimetil-solfossido (DMSO), dodina in n-butanolo e boscalid in acetone fino alla concentrazione di 10 g/L. Nel caso di trifloxystrobin è stato necessario aggiungere al terreno l'inibitore dell'ossidasi alternativa (SHAM) alla concentrazione di 100 mg/L per evitare falsi positivi, poiché ceppi sensibili alla sostanza attiva sono in grado, *in vitro*, di crescere utilizzando un meccanismo metabolico alternativo a quello inibito. I saggi di crescita sono stati eseguiti in terreno di coltura PDA contenuto in piastre Petri del diametro di 9 cm, tranne nel caso di cyprodinil per il quale, come per *B. cinerea*, è stato preparato un terreno specifico privo dell'aminoacido metionina addizionato con 15 g/L di agar bacto. Le sostanze attive sono state addizionate al terreno sterile ad una temperatura pari a 55 °C. Per ciascuna concentrazione di sostanza attiva sono stati inoculati 3 tasselli di micelio.

Dopo 4 settimane di incubazione a 20 °C al buio, è stato misurato il diametro di crescita delle colonie, prendendo 3 misurazioni per ognuna (**Figura 3.4**). Per ogni concentrazione di fungicida è stata calcolata la percentuale di inibizione della crescita in funzione del diametro della colonia in assenza del fungicida secondo la formula  $IC=(D_{sa}/D_0) \times 100$

dove:

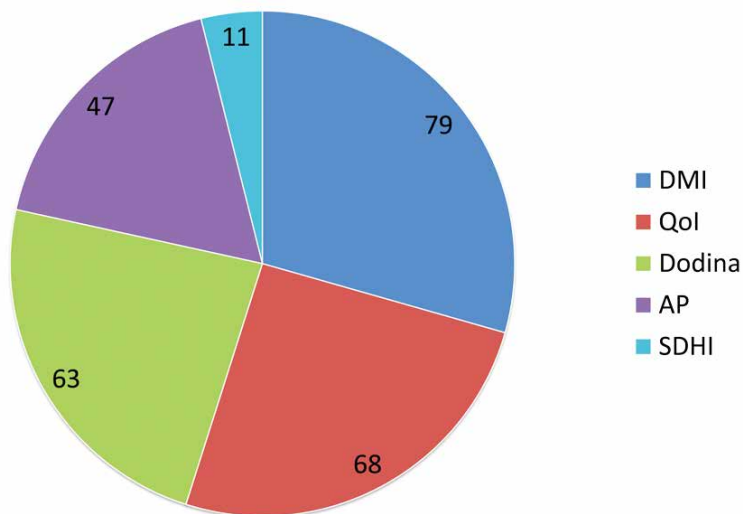
- $D_{sa}$ : diametro medio di crescita sul terreno contenente la sostanza attiva fungicida;
- $D_0$ : diametro medio di crescita sul terreno privo del fungicida.

L'inibizione della crescita è stata utilizzata per calcolare l' $EC_{50}$  mediante l'analisi dei probit, come precedentemente descritto. I valori di  $EC_{50}$  sono stati utilizzati per calcolare il fattore di resistenza degli isolati dividendo l' $EC_{50}$  calcolata per il singolo isolato per il valore derivante dalla media delle  $EC_{50}$  dei tre ceppi di riferimento (5, 6 e 261). Fattori di resistenza pari o superiori a 10 indicano un possibile rischio di resistenza.

### 3B. RISULTATI E CONCLUSIONI

Le sostanze attive più frequentemente impiegate nei 19 meleti oggetto di monitoraggio sono costituite per la maggior parte dai DMI (79 %), Qol (68%) e dalla dodina (63 %) (**Figura 3.3**). Le anilinoipirimidine (AP) sono state utilizzate in poco meno della metà degli appezzamenti, mentre boscalid, appartenente alla classe degli SDHI, è stato impiegato solo nell'11 % dei casi, ovvero 2 meleti, siti l'uno in provincia di Sondrio e l'altro in provincia di Pavia. In generale, le sostanze attive considerate sono state applicate per un numero inferiore a 3 trattamenti per stagione, ad eccezione

del meleto 14 dove la dodina è stata utilizzata per ben 7 volte nella stagione 2013. La crescita del micelio in presenza di concentrazioni crescenti di fungicida ha mostrato un andamento decrescente, con il completo annullamento dello sviluppo del micete, nel caso di sensibilità nei confronti della sostanza attiva addizionata al terreno (**Figura 3.4**). Al contrario, nessuna inibizione della crescita è stata osservabile nel caso di resistenza nei confronti della sostanza attiva saggiata.



**Figura 3.3.** Percentuali di utilizzo in vigneto dei fungicidi saggiati nel corso dei tre anni di sperimentazione.

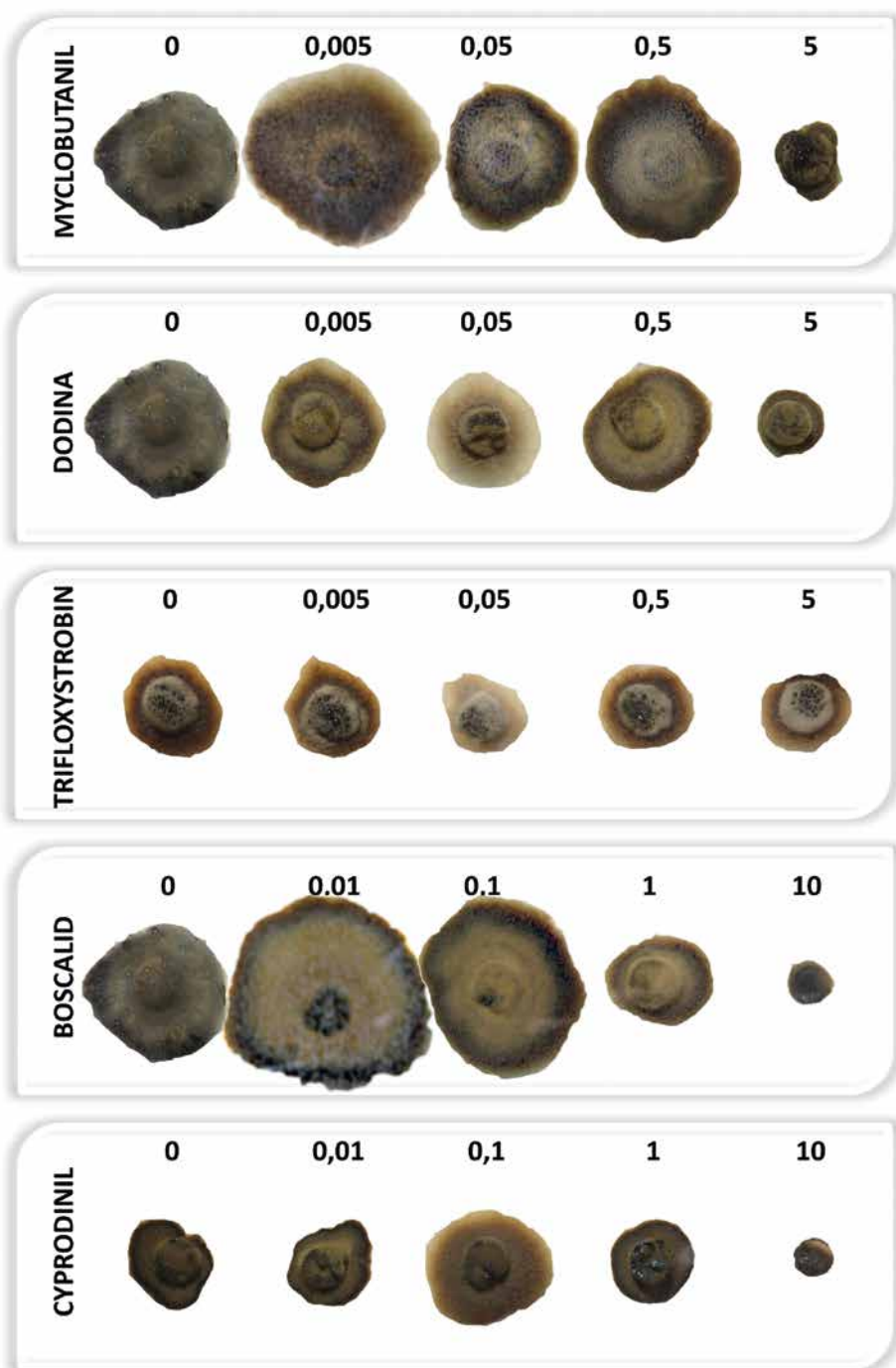
### Qol-TRIFLOXYSTROBIN

Le strobilurine, appartenenti alla classe dei Qol, sono presenti sul mercato europeo dalla seconda metà del 1990, ma trascorsi solo pochi anni dal loro utilizzo sono stati segnalati i primi casi di ridotta sensibilità nei loro confronti. Nel nord Italia, in particolare, sono stati recentemente riportati problemi nel contenimento della malattia, associati a popolazioni resistenti e alla presenza della mutazione G143A che conferisce il carattere della resistenza ai ceppi di *V. inaequalis* (Fiaccadori *et al.*, 2011).

Nel corso del presente studio, il valore medio di  $EC_{50}$  stimato per i tre ceppi di riferimento ottenuti da meleto mai trattati nei confronti di trifloxystrobin è risultato pari a 0,01 mg/L, un valore ampiamente superato dalla maggior parte degli isolati analizzati, che hanno raggiunto spesso valori superiori a 10 mg/L (**Figura 3.5a**). Ad eccezione di 13 isolati (25 % del totale), gli individui analizzati presentano un fattore di resistenza superiore a 10 (**Figura 3.5b**) e possono essere quindi considerati resistenti. Questo risultato è in linea con quanto ritrovato da altri Autori, i quali reputano gli individui resistenti se caratterizzati da una  $EC_{50}$  superiore a 2 (**Tabella 3.3**).

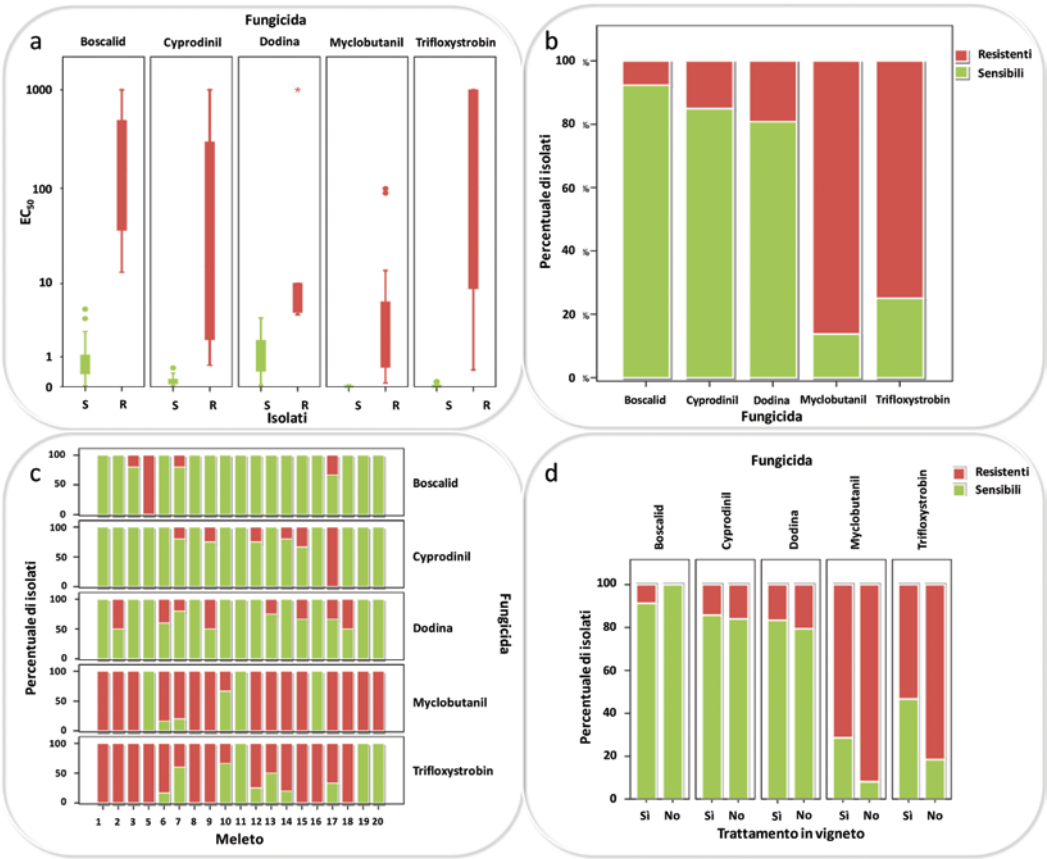
Individui resistenti sono stati ritrovati in tutti i meleto, ad eccezione di tre, i meleto 11, 19 e 20 (**Figura 3.5c**). Sebbene isolati resistenti siano stati rilevati anche in campioni prelevati da meleto non trattati con i Qol, è evidente come i ceppi prelevati dai meleto sottoposti all'applicazione dei Qol si caratterizzino per i valori di  $EC_{50}$  più elevati (**Figura 3.5d**).

Il ritrovamento del 75 % dei ceppi di *V. inaequalis* analizzati caratterizzato da una ridotta sensibilità nei confronti trifloxystrobin testimonia l'elevata pressione di selezione esercitata sulle popolazioni del patogeno dall'ampio utilizzo della categoria dei Qol in campo. È pertanto di fondamentale importanza l'applicazione delle strategie antiresistenza.



**Figura 3.4.** Crescita di un isolato di *V. inaequalis* sensibile a dodina e boscalid e resistente a myclobutanil, trifloxystrobin e cyprodinil sui substrati addizionati con le sostanze attive in esame. Nella prima riga è riportata la concentrazione saggiata in mg/L.

**Figura 3.5.** Risultati relativi agli isolati di *V. inaequalis* sensibili S (FR<10) e resistenti R (FR>10) nei confronti di boscalid, cyprodinil, dodina, myclobutanil e trifloxystrobin: distribuzione box-plot dei valori di EC<sub>50</sub> espressi in mg/L di sostanza attiva (a); percentuale di isolati sensibili o resistenti alle sostanze attive in generale (b), nel singolo meeto (c) e in funzione dell'utilizzo del fungicida o della sua classe di resistenza in meeto (d).



**Tabella 3.3.** Valori di EC<sub>50</sub>(mg/L) relativi a isolati di *V. inaequalis* sensibili (S) o resistenti (R) a trifloxystrobin, myclobutanil, dodina e cyprodinil secondo quanto riportato in studi sulla crescita del micelio su substrato agarizzato e valori rilevati nel presente studio

Autori	Classe	EC50 (mg/L)				
		Trifloxystrobin	Myclobutanil	Dodina	Boscalid	Cyprodinil
Whelan <i>et al.</i> , 1992	S	-	0,16	-	-	-
Bakker <i>et al.</i> , 1995	S	-	0,43	0,85	-	-
Bakker, 1999	S	-	-	0,527	-	-
Beresford <i>et al.</i> , 2012	S	-	0,07-0,3	0,24	-	-
	R	-	1,28-11,35	-	-	-
Fiaccadori <i>et al.</i> , 2011	S	0,003-0,0075	-	-	-	-
	R	>2	-	-	-	-
Larsen <i>et al.</i> , 2013	S	-	-	-	-	<0,05
	R	-	-	-	-	>0,5
Presente studio	S	0,003 ± 0,026*	0,01 ± 0,014*	1,23 ± 0,3*	0,85 ± 0,28	0,13 ± 0,03*
	R	>34	7,6 ± 6*	>3,9	>12	>0,6

\*valore medio ± intervallo di confidenza per P=0,05

## DMI - MYCLOBUTANIL

Le prime segnalazioni di resistenza ai fungicidi DMI in Italia risalgono al 1987, con il ritrovamento di individui all'interno delle popolazioni di *V. inaequalis* isolati da meleti trattati con bitertantol caratterizzati da  $EC_{50}$  4-5 volte superiori rispetto ad individui provenienti da meleti nei quali i DMI non erano stati utilizzati (Fiaccadori *et al.*, 1987).

I risultati ottenuti tra il 2011 ed il 2013 in Lombardia consentono di osservare evidenti scostamenti tra i valori di  $EC_{50}$  stimati nel caso dei tre ceppi di riferimento (0,006 mg/L di sostanza attiva) rispetto a quelli degli isolati provenienti da meleti trattati. Ad eccezione di 8 ceppi, gli individui monitorati si sono caratterizzati per fattori di resistenza ampiamente superiori a 10 (**Figura 3.5b**), mostrando valori di  $EC_{50}$  tra 0,1 e 99,5 mg/L di sostanza attiva (**Figura 3.5a**). Considerando quanto rilevato in altri studi (**Tabella 3.3**), nei quali l' $EC_{50}$  dei ceppi sensibili era pari a 0,16-0,43 mg/L di sostanza attiva, sui 51 isolati analizzati, 34 risultano caratterizzati da una ridotta sensibilità nei confronti di myclobutanil. L' $EC_{50}$  media dei ceppi provenienti da meleti non trattati con DMI è risultata pari a 2,4 mg/L, mentre quella degli individui provenienti da meleti trattati con DMI è risultata pari a 7,5 mg/L. Inoltre, se si considera la percentuale di individui resistenti in funzione dei trattamenti effettuati in frutteto (**Figura 3.5d**) si nota come l'utilizzo dei DMI determini la quasi totale assenza di individui sensibili. Tuttavia, la frequenza di individui caratterizzati da riduzione della sensibilità è notevole anche nel caso in cui nell'annata di isolamento tali sostanze attive non siano state utilizzate.

In conclusione, la crescita del micelio di *V. inaequalis* in presenza di myclobutanil è stata inibita solamente nel 33 % dei ceppi isolati nei 3 anni di indagine, evidenziando una situazione di criticità per quanto riguarda l'intera classe dei fungicidi DMI. Ciò può essere messo in relazione con il fatto che sostanze attive appartenenti al gruppo sono sul mercato dal 1973 (Kuck *et al.*, 2012) e sono largamente e frequentemente impiegate nei confronti dell'agente della ticchiolatura del melo, portando alla selezione di individui resistenti.

## DODINA

I primi casi di resistenza ai fungicidi in popolazioni di *V. inaequalis* riguardano proprio la dodina: nel 1969, infatti, sono stati ritrovati in meleti statunitensi ceppi del patogeno caratterizzati da una sensibilità inferiore a quelli di ceppi provenienti da frutteti nei quali la sostanza attiva non era stata impiegata (MacHardy, 1996). La resistenza nei confronti di tale sostanza attiva, pertanto, rappresenta un problema di lunga data e numerosi sono gli studi effettuati a tale riguardo.

Per quanto concerne la presente attività di monitoraggio, è stato possibile rilevare valori di  $EC_{50}$  relativi a dodina dei tre ceppi di riferimento si sono attestati nell'intervallo 0,0011-0,9 mg/L (**Figura 3.5a**), in linea con quanto riportato per i ceppi sensibili da altri autori (**Tabella 3.3**). Fattori di resistenza superiori a 10 sono stati rilevati solamente nel 25 % degli isolati (**Figura 3.5b**), i quali si sono caratterizzati per  $EC_{50}$  superiori a 3,9 mg/L. I valori più elevati, superiori a 100 mg/L di sostanza attiva, sono stati riscontrati nei campioni dei meleti 17 e 18, i quali non hanno subito trattamenti a base di dodina nell'annata di campionamento (**Figura 3.5c**). Non sembra esserci differenza tra le  $EC_{50}$  associate all'esecuzione di trattamenti in meleto (**Figura 3.5d**): la frequenza di ceppi sensibili e resistenti, infatti, sembra simile nei meleti trattati o non trattati con dodina. Come evidenziato in studi effettuati in passato, la resistenza alla dodina è risultata correlata alla resistenza nei confronti del DMI myclobutanil (de Waard *et al.*, 2006). Nonostante la sostanza attiva sia stata utilizzata in più della metà dei meleti oggetto di campionamento, è stata riscontrata una percentuale di individui resistenti alla dodina ridotta, probabilmente in conseguenza del fatto che essa è generalmente impiegata una sola volta per stagione nei confronti di *V. inaequalis*.

## SDHI-BOSCALID

Per quanto riguarda boscalid, non sono presenti in letteratura metodi di monitoraggio specifici per il patogeno, né segnalazioni di resistenza, perciò i risultati ottenuti nel corso del presente studio rappresentano una prima importante tappa nello studio della resistenza nei confronti della sostanza attiva. L' $EC_{50}$  dei ceppi sensibili di riferimento si è attestata tra 0,1 e 3 mg/L di sostanza attiva (**Figura 3.5a**). Solamente 4 ceppi (168, 266, 294 e 378) hanno mostrato fattori di resistenza superiori a 10, con  $EC_{50}$  superiori a 13,3 mg/L. Il ceppo 378, caratterizzato dall' $EC_{50}$  più elevata (>100 mg/L), è stato isolato nel meleto 17 non trattato con boscalid (**Figura 3.5c**). I restanti ceppi hanno mostrato una  $EC_{50}$  media pari a 0,85 mg/L di sostanza attiva.



Non sembrano esserci differenze tra i meleti trattati e non trattati con boscalid, poiché individui resistenti sono stati isolati da vigneti non trattati con la sostanza attiva in esame (**Figura 3.5d**).

Pertanto si può concludere che per quanto riguarda boscalid, utilizzato sporadicamente nei meleti oggetto di campionamento, non si sollevano particolari criticità, tuttavia si segnala la presenza di almeno 4 individui capaci di crescere in presenza di elevate concentrazioni della sostanza attiva.

### AP-CYPRODINIL

Per quanto riguarda *V. inaequalis*, sono pochi gli studi relativi alla resistenza nei confronti delle anilino pirimidine. Monitoraggi effettuati in passato in meleti sperimentali tedeschi trattati o meno con la sostanza attiva hanno evidenziato una ridotta frequenza di ceppi resistenti, lasciando ritenere che il rischio di resistenza nei confronti della classe fosse basso (Kunz *et al.*, 1998). Tuttavia, variazioni nella sensibilità sono state evidenziate a seguito di trattamenti con le anilino pirimidine in altri studi (Köller *et al.*, 2005).

In Lombardia, per quanto concerne cyprodinil, le EC<sub>50</sub> relative ai ceppi sensibili di riferimento sono risultate comprese tra 0,03 e 0,12 mg/L di sostanza attiva (**Figura 3.5a**). La maggior parte degli isolati (85 %) è risultata sensibile, mostrando fattori di resistenza inferiori a 10 e un valore medio di EC<sub>50</sub> pari a 0,32 mg/L (**Figura 3.5a e b**). Solamente 8 ceppi, isolati nei meleti 7, 9, 12, 14, 15 e 17 (**Figura 3.5c**) sono stati caratterizzati da fattori di resistenza superiori a 10, a seguito di EC<sub>50</sub> pari o superiori a 0,6 mg/L di sostanza attiva, valore caratteristico dei ceppi resistenti secondo quanto riportato da altri Autori (**Tabella 3.3**). Le distribuzioni dei valori di EC<sub>50</sub> in relazione all'utilizzo di anilino pirimidine in meleto ha evidenziato l'assenza di particolari differenze tra appezzamenti trattati e non trattati (**Figura 3.5d**).

Lo sporadico ritrovamento di ceppi resistenti a cyprodinil potrebbe essere imputabile, come per quanto osservato per la dodina, alla limitazione dell'utilizzo delle anilino pirimidine, le quali sono generalmente applicate una sola volta per stagione.

In conclusione, il protocollo messo a punto nel corso del presente studio si è rivelato idoneo alla valutazione, in contemporanea, della sensibilità di numerosi ceppi di *V. inaequalis* nei confronti di diverse sostanze attive. I tempi di preparazione ed esecuzione di tale metodologia risultano purtroppo molto lunghi, poiché la crescita del micete su terreno agarizzato richiede almeno 4 settimane. Essa, pertanto, è poco funzionale all'esecuzione di un'attività di monitoraggio su ampia scala. Sarebbe pertanto opportuno valutare metodologie alternative in grado di fornire risultati più immediati, consentendo al contempo di valutare in termini quantitativi la composizione della popolazione presente in meleto.

Sebbene i risultati ottenuti non consentano una valutazione puntuale della resistenza a livello di singolo meleto, poiché riguardano individui isolati da più frutteti, essi evidenziano la presenza di un'elevata frequenza di ceppi resistenti a trifloxystrobin e myclobutanil, probabilmente in conseguenza del ripetuto utilizzo delle classi di resistenza dei Qol e DMI nel corso degli anni, che ha comportato un'elevata pressione di selezione all'interno delle popolazioni di *V. inaequalis*. Per le altre classi in esame si segnala una minore presenza di individui resistenti. Inoltre, per la prima volta si segnala il ritrovamento di ceppi resistenti a boscalid, anche se in bassa frequenza. Non sono state riscontrate differenze tra i ceppi isolati in Valtellina ed in Oltrepò Pavese, i quali mostrano comportamenti analoghi per quanto riguarda la resistenza ai fungicidi. Va inoltre segnalato che la stragrande maggioranza dei ceppi analizzati nel corso del presente studio manifesta resistenza contemporanea a più sostanze attive: il 55 % di essi è contemporaneamente resistente a 2 classi di fungicidi, generalmente DMI e Qol o DMI e dodina, il 15 % a 3 sostanze attive, il 4 % a 4 classi di resistenza e il 2 % a tutte le classi saggiate. In due frutteti, l'uno sito a Tresivio (SO) e campionato nel 2011 e l'altro sito a Ponte Crenna (PV) e campionato nel 2013, è stata rilevata la presenza di ceppi resistenti a tutte le classi di fungicida. Sarebbe interessante approfondire le analisi in questi meleti, per poter meglio comprendere la diffusione del fenomeno. In generale, non è stato possibile associare in maniera univoca il trattamento effettuato nel corso della singola stagione con la classe o la sostanza attiva oggetto di indagine con la presenza di ceppi resistenti: questo può indicare, ancora una volta, che la selezione di ceppi resistenti non è ristretta ad una singola annata, ma è legata alla storia fitoiatrica del meleto. I risultati ottenuti nel presente studio rendono evidente come il monitoraggio della resistenza ai fungicidi in *V. inaequalis* sia imprescindibile per l'impostazione di una razionale strategia di difesa nei confronti del patogeno.

## BIBLIOGRAFIA

- Agrios G.N. (2005). Plant Pathology, 5th Edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam NL, pp. 428-433.
- Anke T., Werle A., Bross M., Steglich W. (1990). Antibiotics from basidiomycetes. XXXIII. Oudemansin X, a new antifungal E-beta-methoxyacrylate from *Oudemansiella radicata* (Relhan ex Fr.) Sing. *J. Antibiot.*, 43: 1010-10.
- Bakker G.R. (1999). Sensitivity of *Venturia inaequalis* and *V. pirina* to dodine in New Zealand. *Proceedings of the 52nd New Zealand Plant Protection Conference*: 167-170.
- Bakker G.R., Butcher M.R., Gaunt R.E. (1995). Sensitivity of apple black spot to fenarimol, flusilazol, myclobutanil, penconazole and dodine in New Zealand. *Proceedings of the 48th New Zealand Plant Protection Conference*, pp. 7-11.
- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobranski (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.*, 58: 649-662.
- Belli G. (2012). Elementi di patologia vegetale, seconda edizione. Piccin, Padova, pp. 325-332.
- Beresford R.M., Wright P.J., Wood P.N., Park N.M. (2012). Sensitivity of *Venturia inaequalis* to myclobutanil, penconazole and dodine in relation to fungicide use in Hawke's Bay apple orchards. *New Zealand Plant Protection*, 65: 106-113.
- Bisiach M. (1977). La muffa grigia della vite danni e attuali vedute sui metodi di intervento. Atti del Convegno Regionale "Aspetti di Agronomia e Patologia della vite", Brescia 25-26 febbraio 1977: 17-38.
- Blum M., Waldner M., Gisi U. (2010). A single point mutation in the novel *PvCesA3* gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genet Biol.*, 47: 499-510.
- Blum M., Waldner M., Olaya G., Cohen Y., Gisi U., Sierotzki H. (2011). Resistance mechanism to carboxylic acid amide fungicides in the cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Pest Manag. Sci.* 67: 1211-1214.
- Bowen J.W., Mesarich C.H., Bus V.G.M., Beresford R.M., Plummer K.M., Templeton M.D. (2011). *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology*, 12: 105-122.
- Brent K.J., Hollomon D.W. (2007). Fungicide resistance: the assessment of risk, 2nd edition. FRAC Monograph n. 2, Croplife International, Brussels, Belgium.
- Brent K. (2012). Historical perspectives of fungicide resistance. In: Fungicide resistance in crop protection-risk and management, ed. T.S. Thind, CABI, Wallingford, UK, pp. 3-18.
- Campia P. (2014). Sensitivity to fungicides and genetic structure of *Botrytis cinerea* populations isolated in Lombardy. Tesi di dottorato, Università degli Studi di Milano.
- Corran A. (2007). Fungicides acting on signal transduction. In: Modern Crop Protection Compounds II, Kramert W., Schirmer U., Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 561-567.
- Davidse L.G., van der Berg-Valthuis G. C. M. (1989). Biochemical and molecular aspects of the phenylamide-receptor interaction in plant pathogenic *Phytophthora* spp. In: Lugtenberg B.J.J. (ed.) Signal molecules in plants and Plant microbe interactions. Springer,-Verlag, Berlin.
- de Waard M.A., Andrade A.C., Hayashi K., Schoonbeek H., Stergiopoulos I., Zwiers L.-H. (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag. Sci.*, 62: 195-207.
- Diolez A., Marches F., Fortini D., Brygoo Y. (1995). *Boty*, a long-terminal-repeat retro-element in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 103-108.
- Fiaccadori R., Gielink A.J., Dekker J. (1987). Sensitivity of inhibitors of sterol biosynthesis in isolates of *Venturia inaequalis* from Italian and Dutch orchards. *Neth. J. Plant Pathol.*, 93: 285-287.
- Fiaccadori R., Cicognani E., Alberoni G., Collina M., Brunelli A. (2011). Sensitivity to strobilurin fungicides of Italian *Venturia inaequalis* populations with different origin and scab control. *Pest Manag. Sci.*, 67: 535-540.
- Finney, D. J. (1952). Probit Analysis. Cambridge, England, Cambridge University Press.
- Forster B., Heye U., Pilonel C., Staub T. (1995). Modern Fungicides and Antifungal Compounds III., Russel P.E., Sisler H.D., Lyr H. Eds., Intercept, Andover.

- Fournier E. e Giraud T. (2008). Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology*, 21:122-132.
- Genet J.- L., Vincent O. (1999). Sensitivity of European *Plasmopara viticola* population to cymoxanil. *Pesticide Science*, 55: 129-136.
- Genet J.- L., Jaworska G. (2013). Characterization of European *Plasmopara viticola* isolates with reduced sensitivity to cymoxanil. *Eur. J. Plant Pathology*, 135: 383-393.
- Gisi U., Cohen Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 549-572.
- Gisi U., Sierotzki H. (2008). Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122: 157-167.
- Gisi U., Sierotzki H., Cook A., McCaffery A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qol inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci.*, 58: 859-867.
- Gisi U., Waldner M., Kraus N., Dubuis P.H., Sierotzki H. (2007). Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 56: 199-208.
- Gisi U., Chin K.M., Knapova G., Küng Färber R., Mohr U., Parisi S., Sierotzki H., Steinfeld U. (2000). Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection*, 19: 863-872.
- Gullino M.L., Mescalchin E., Mezzalama M. (1997). Sensitivity to cymoxanil in population of *Plasmopara viticola* in northern Italy. *Plant Pathology*, 46: 729-736.
- Hollomon D.W., Brent K.J. (2009). Combating plant diseases - the Darwin connection. *Pest Manag. Sci.*, 65: 1156-1163.
- Howard R. J., Ferrari M. A., Genet J.-L., Stidman M. (1998). Biology of Curzate action against *Plasmopara viticola* infection of grape. *Proc. AFPP, Sixième Conf. Int. sur les maladies des plantes*, Tours, France.
- Hsiang T., Yang L., Barton W. (1997). Baseline sensitivity and cross-resistance to demethylation-inhibiting fungicides in Ontario isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 409-416.
- Jones A.L., Aldwinckle H.S. (1990). Compendium of apple and pear diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Köller, W., Wilcox, W. F., Barnard, J., Jones, A. L., Braun, P. G. (1997). Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology*, 87:184-190.
- Köller W., Parker D. M., Turechek W. W., Avila-Adame C., Cronshaw, K. (2004). A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the Qol fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Dis.*, 88: 537-544.
- Köller, W., Wilcox, W. F., Parker, D. M. (2005). Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopyrimidine fungicides and their contribution to scab management in New York. *Plant Dis.* 89: 357-365.
- Kretschmer M., Leroux M., Mosbach A., Walker A.-S., Fillinger S., Mernke D., Schoonbeek H.-J., Pradier J.-M., Leroux P., De Waard M.A., Hahn M. (2009). Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.*, 5: e 1000696.
- Kuck K.H., Vors J.P. (2007). Sterol Biosynthesis Inhibitors. In: Modern Crop Protection Compounds II, Kramer W., Schirmer U Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 605-650.
- Kuck K.H., Stenzel K., Vors J.P. (2012). Sterol biosynthesis inhibitors. In: Modern Crop Protection Compounds 2nd edition, ed. Krämer W., Schirmer U., Jeschke P., Witschel M., Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, DE, pp.761-805.
- Kunz S., Lutz B., Deising H., Mendgen K. (1998). Assessment of sensitivities to Anilinopyrimidine and strobilurin fungicides in populations of the apple scab fungus *Venturia inaequalis*. *J. Phytopathology*, 146: 231-238.
- Larsen N.J., Beresford R.M., Wood P.N., Wright P.J., Fisher B.M. (2013). A synthetic agar assay for determining sensitivity of *Venturia inaequalis* to anilinopyrimidine fungicides in New Zealand apple orchards. *New Zealand Plant Protection*, 66: 293-302.

- Latorse M.- P., Holah D., Bardsley R. (2006). Fungicidal properties of fluopicolide-based products. *Pflanzen-schutz-Nachrichten Bayer*, 59: 185-200.
- Leroux P. (2004). Chemical control of *Botrytis cinerea* and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, pathology and control*, Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht: 195-222.
- Leroux P. (2007). Chemical control of *Botrytis cinerea* and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, pathology and control*, Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. Eds, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp. 195-222.
- Leroux P., Colas V., Fritz R., Lanen C. (1995). Modern Fungicides and Antifungal Compounds. Eds Lyr H., Russel P.E., Sisler H.D., Intercept, Andover.
- Leroux P., Chapland F., Desbrosses D., Gredt M. (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides on *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, 18: 687-697.
- Levis C., Fortini D., Brygoo Y. (1997). Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular and General Genetics*, 254: 674-680.
- Lorbeer J.W. (1980). Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. In: *The biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK.
- Lu X.H., Hausbeck M. K., Liu X. L., Hao J.J. (2011). Wild type and mutation analysis for resistance risk to fluo-picolide in *Phytophthora capsici*. *Plant Dis.*, 95: 1535-1541.
- Ma Z., Michailides T. J. (2005). Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Disease*, 89: 1083-1089.
- MacHardy W.E. (1996). Apple scab - biology, epidemiology and management. APS Press, St. Paul Minnesota, pp. 412-433.
- Masner P., Muster P., Schmid J. (1994). Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pestic. Sci.*, 42: 163-166.
- McCallan S. E. A. (1930). Studies of fungicides. II. Testing protective fungicides in the laboratory. *Cornell Agricultural Experimental Station Memoirs*, 128: 8-24.
- McDonald B.A., Linde C. (2002). The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, 124: 163-180.
- Mitani, S., Araki, S., Takii, Y., Ohshima, T., Matsuo, N. Miyoshi H. (2001). The biochemical mode of action of the novel selective fungicide cyazofamid: specific inhibition of mitochondrial complex III in *Phythium spinosum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71: 107-115.
- Muller U., Hubele A., Zondler H., Herzog J. (1998). Cyprodinil: A New Fungicide with Broad-Spectrum Activity. In: *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals V*, ACS- Symposium Series, 237-245.
- Musilek V., Cerna J., Sasek V., Semerdzieva M., Vondracek M. (1969). Antifungal antibiotic of the basidiomycete *Oudemansiella mucida*. I. Isolation and cultivation of a producing strain. *Folia Microbiol.*, 14: 377-387.
- Myresiotis C.K., Karaoglanidis G.K., Tzavella-Klonaris K. (2007). Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetables crops to anilinopyrimidine, hydroxyanilide, benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant disease*, 91: 407-413.
- Oliver R.P., Hewitt H.G. (2014). Fungicides in crop protection, 2nd edition. CABI, Wallingford, UK, pp.123-149.
- Papin R., Grenier A., Zech B. (1990). LS860263: A Triazole Fungicide With Novel Proprieties. *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Disease*, 2: 439-446.
- Raposo R., Colgan R., Delcan J., Melgarejo P. (1995). Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.*, 79: 294-296.
- Rho G., Zerbetto F., Sancassani G.P., Toffolatti S., Vercesi A. (2004). Verifica di diversi metodi di rilevamento di infezioni causate da *Plasmopara viticola* e *Uncinula necator* su vite. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 205-212.
- Ribéreau - Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2004). Trattato di enologia I, Microbiologia del vino - Vinificazioni. Edagricole, Bologna: 293-295; 465-467.
- Russel P.E. (2004). Sensitivity baselines in fungicide resistance-research and management. Croplife International, Brussels, Belgium.

- Schnabel G., Jones, A. L. (2001). The 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology*, 91:102-110.
- Sierotzki H., Wullschlegel J., Alt M., Bruyère T., Pillonel C., Parisi S., Gisi U. (2002). Modern fungicides and Antifungal Compounds III, Dehne H.W., Gisi U., Kuck K.H., Russel P.E., Lyr H. Eds. AgroConcept, Bonn: 141-148.
- Sierotzki H., Kraus N., Assemet P., Stanger C., Cleere S., Windass J., Gisi U. (2005). Evolution of resistance to Qol fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Europe. In: Modern fungicides and antifungal compounds IV, Ed. Dehne H. W., Gisi U., Kuck K. H., Russell P. E., Lyr H., British Crop Protection Council, Alton, UK, pp. 73-80.
- Smith F.D., Parker D.M., Köller W. (1991). Sensitivity distribution of *Venturia inaequalis* to the sterol demethylation inhibitor flusilazole: baseline sensitivity and implications for resistance monitoring. *Phytopathology*, 81: 392-396.
- Stammler G., Speakman J. (2006). Microtiter method to test the sensitivity of *B. cinerea* to boscalid. *J. Phytopathology*, 154: 508-510.
- This P., Lacombe T., Thomas M.R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22: 9.
- Tisdale, W. H. Williams, I. (1934). Disinfectant. U.S. patent 1,972,96.
- Toffolatti S.L., Vercesi A. (2012). Qol Resistance in *Plasmopara viticola* in Italy: Evolution and Management Strategies. In: Fungicide resistance in crop protection, risk and management, ed. Thind T.S., CABI, Wallingford, UK, pp.172-183.
- Toffolatti S.L., Serrati L., Vercesi A. (2011). CAA, Phenylamide and Qol resistance assessment in *Plasmopara viticola* oospores. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI, H.W. Dehne, H. B. Deising, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell, H. Lyr (EDS), DPG Spectrum Phytomedizin, Braunschweig (DE), pp. 267-272.
- Toffolatti S. L., Serrati L. Sierotzki H., Gisi U., Vercesi A. (2007). Assessment of Qol resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Management Science*, 63: 194-201.
- Toffolatti S.L., Venturini G., Campia P., Cirio L., Bellotto D., Vercesi A. (in corso di stampa). Sensitivity to cymoxanil in Italian populations of *Plasmopara viticola* oospores, DOI: 10.1002/ps.3906.
- Toquin V., Varja F., sirvan C., Gamet S., Latorse M.P., Zundel J. L., Schmitt F., Beffa R. (2006). A new mode of action for fluopicolide: modification of the cellular localization of spectrin-like protein. *Pflanzenschutz Nachr. Bayer*, 59: 171-184.
- Váczy K. Z., Sándor E., Karaffa L., Fekete E., Fekete E., Árnayasi M., Czeglédi L., Kövics G. J., Druzhinina I. S., Kubicek C. P. (2008). Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian Vineyards. *Phytopathology*, 98: 1312- 1319.
- Vercesi A., Piccolo V. (2007). Funghi tossinogeni e ocratossina A nelle uve lombarde. *Quaderni della Ricerca, Regione Lombardia*, 57.
- Vercesi A., Toffolatti S.L., Venturini G., Campia P. (2014). *Botrytis cinerea*: biologia, epidemiologia e difesa. *Informatore Agrario*, 70: 4-8.
- Wang W., Yan L., Meng R., Zhao J., Zhang X., Han X., Ma Z. (2014). Sensitivity to fluopicolide of wild type isolates and biological characteristics of fluopicolide-resistant mutants in *Pseudoperonospora cubensis*. *Crop Protection*, 55: 119 -126.
- Weber R.W.S., Hahn M. (2011). A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118: 17-25.
- Whelan H.G., Butcher M.R., Gaunt R.E. (1992). Sensitivity of *Venturia inaequalis* (black spot) on apples to DMI fungicides in New Zealand. *Proceedings of the 45th New Zealand Plant Protection Conference*, pp. 289-294.
- Ziogas B.N., Markoglou A.N., Spyropoulou V. (2005). Effect of phenylpyrrole-resistance mutations fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 83-100.

**Si ringraziano per la collaborazione:**

Eduardo Rizzi, Centro vitivinicolo provinciale di Brescia  
Nicola Parisi, CO.PRO.VI. Società Cooperativa Consorzio della Provincia di Pavia  
Martino Salvetti, Fondazione Dott. P. Fojanini di Studi Superiori di Sondrio

Grafica e impaginazione



**LOGOS MEDIA**



**RegioneLombardia**

Agricoltura

Il sito della ricerca in agricoltura  
[www.agricoltura.regione.lombardia.it](http://www.agricoltura.regione.lombardia.it)