

## SENSIBILITÀ DI ISOLATI DI *VENTURIA INAEQUALIS* AI PRINCIPALI FUNGICIDI UTILIZZATI SU MELO IN LOMBARDIA

S. L. TOFFOLATTI, G. VENTURINI, A. VERCESI

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia (DISAA),  
Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano, silvia.toffolatti@unimi.it

### RIASSUNTO

Isolati di *Venturia inaequalis*, agente della ticchiolatura del melo, sono stati caratterizzati per il livello di sensibilità nei confronti delle classi di sostanze attive più comunemente usate in Lombardia. I saggi hanno previsto la valutazione della crescita del micete su terreno agarizzato addizionato con il fungicida (myclobutanil, trifloxystrobin, dodina, cyprodinil e boscalid) a concentrazioni crescenti. I valori di EC<sub>50</sub> (concentrazione di sostanza attiva in grado di inibire la crescita nella misura del 50% rispetto a quanto osservato in assenza del fungicida) sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura e con quelli di tre ceppi sensibili di riferimento allo scopo di calcolare il fattore di resistenza del singolo ceppo. Dei 56 isolati analizzati, il 75% è risultato resistente a trifloxystrobin, il 67% a myclobutanil, il 25% a dodina, il 14% a cyprodinil e il 7% a boscalid. E' inoltre stata rilevata la presenza di isolati resistenti a più sostanze attive contemporaneamente. I risultati ottenuti rendono evidente come il monitoraggio della resistenza ai fungicidi in *V. inaequalis* sia di notevole importanza per l'impostazione delle strategie di difesa nei confronti del patogeno.

**Parole chiave:** resistenza, ticchiolatura del melo

### SUMMARY

#### SENSITIVITY OF *VENTURIA INAEQUALIS* ISOLATES TO THE MOST COMMON FUNGICIDES APPLIED IN LOMBARDY ORCHARDS

*Venturia inaequalis* strains were isolated from Northern Italian orchards (Lombardy) in order to evaluate the sensitivity levels to the most common fungicide classes used to control apple scab. The mycelium growth at increasing concentration of several fungicides (myclobutanil, trifloxystrobin, dodine, cyprodinil and boscalid) was evaluated. The EC<sub>50</sub> values of the isolates were compared to those described in the literature and to the values of three sensitive strains to calculate the resistance factors. Fifty-six isolates were tested, 75% were resistant to trifloxystrobin, 67% to myclobutanil, 25% to dodine, 14% to cyprodinil and 7% to boscalid. Some strains were characterized by multidrug resistance, usually to trifloxystrobin and myclobutanil. These results highlight the need of an accurate monitoring activity to avoid field resistance problems.

**Keywords:** resistance, apple scab

### INTRODUZIONE

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* (Cooke) G. Winter, 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.

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 coltivazione di cultivar di melo meno suscettibili alla malattia è limitatamente diffusa, poiché le preferenze

dei consumatori indirizzano le scelte verso varietà che, purtroppo, sono molto suscettibili al 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, monosito sistemiche e citotropiche. Per quanto riguarda la seconda categoria, i formulati maggiormente utilizzati nei confronti di *V. inaequalis* in Lombardia comprendono sostanze attive appartenenti alla classe di resistenza dei *Quinone outside Inhibitors* - QoI (trifloxystrobin), agli inibitori della biosintesi degli steroli o *DeMethylation Inhibitors* - DMI (myclobutanil), alle anilino-pirimidine - AP (cyprodinil), agli inibitori della succinato deidrogenasi o *Succinate dehydrogenase inhibitors* - SDHI (boscalid) e la guanidina dodina. Ad eccezione di boscalid, è stata riscontrata in passato resistenza da parte del micete 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 su ceppi di *V. inaequalis* isolati da mele lombardi.

## 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 meleli situati nelle province di Sondrio e Pavia (tabella 1). I trattamenti effettuati in campo sono riportati in tabella 1. Per ogni meleto sono state raccolte almeno 50 foglie in modo casuale nell'apezzamento.

### Isolamento dei ceppi

I campioni, posti in sacchetti di carta in una borsa frigorifera, sono stati portati in laboratorio e sottoposti immediatamente alle procedure di isolamento. Aree fogliari contenenti le lesioni sono state ritagliate mediante bisturi e strisciate su un substrato sterile costituito da agar-acqua all'1,5% addizionato con tetraciclina (0,005%), cloramfenicolo (0,01%) e dichloran (0,002%) contenuto 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 Potato Dextrose Agar-PDA (Difco®). Tutti i materiali colturali sono stati sterilizzati in autoclave a 1 atm, 121 °C per 20 minuti. Le colture di *V. inaequalis* sono state poste a incubare a una temperatura di 20 °C per almeno quattro settimane per favorire la crescita della colonia.

### Saggi di sensibilità alle sostanze attive

Le sostanze attive (principio attivo tecnico) sono state saggiate secondo le concentrazioni riportate in Tabella 2. 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. I saggi di crescita sono stati eseguiti su terreno di coltura PDA contenuto in piastre Petri (Ø 9 cm), tranne nel caso di cyprodinil per il quale è stato preparato un terreno specifico (Minimal Medium) privo dell'aminoacido metionina (De Miccolis *et al.*, 2014). Nel caso di trifloxystrobin è stato necessario aggiungere al PDA l'inibitore dell'ossidasi alternativa SHAM (Salicylhydroxamic acid) alla concentrazione di 100 mg/L. Le sostanze attive sono state addizionate al terreno sterile a una temperatura pari a 55 °C. Per ciascuna concentrazione di sostanza attiva sono stati inoculati tre tasselli di micelio (Ø 6 mm) da colonie in crescita su PDA. Per ogni terreno è stata predisposta una piastra di controllo priva del fungicida. In totale sono stati analizzati 56 isolati (tabella 1).

Tabella 1. Elenco degli isolati di *V. inaequalis*, dei meleti campionati tra il 2011 e il 2013 e numero di trattamenti con fungicidi monosito effettuati in campo.

Meleto	Anno	Isolato n.	Comune	Numero di trattamenti effettuati
0	2011	5, 6	-	Mai trattato
1		102	Poggiridenti (SO)	3 QoI, 1 dodina, 2-3 DMI
2		151, 154	Ponte in Valtellina (SO)	2 QoI, 2 dodina, 2-3 DMI
3		165, 168, 170, 178, 180	Castellanica (SO)	1 QoI, 1 dodina, 2-3 DMI
4	2012	261	Caslino al Piano (CO)	Mai trattato
5		266	Chiuro (SO)	2 QoI, 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 QoI, 1 dodina, 1 AP, 2-3 DMI
8		302	Poggiridenti (SO)	2 QoI, 1 dodina, 1 AP, 2-3 DMI
9		313, 316, 321, 322	Poggiridenti (SO)	2 QoI, 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 QoI, 6 DMI, 7 dodina, 2 boscalid, 3 AP
15		371-373	Valdidentro, fraz. S. Carlo (SO)	1 QoI, 3 dodina, 2-3 DMI, 3 AP
16		375	Ponte Nizza (PV)	QoI, dodina, boscalid, AP, DMI
17		376-378	Ponte Crenna (PV)	QoI, DMI
18		379, 380	Bagnaria (PV)	Nessuno
19		381	Bagnaria fraz. Zerbo (PV)	QoI, DMI
20		383	Bagnaria (PV)	1 dodina, DMI, AP

Tabella 2. Sostanze attive e relative concentrazioni finali nel terreno

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

Dopo quattro settimane di incubazione a 20 °C al buio, è stato misurato il diametro di crescita delle colonie, prendendo tre misurazioni per ognuna. Per ogni concentrazione di fungicida è stata calcolata la percentuale di inibizione della crescita (IC) 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, mediante l'analisi dei probit, l' $EC_{50}$  (o  $CE_{50}$ , Concentrazione Efficace mediana), intesa come la concentrazione di fungicida in grado di inibire la crescita del micete nella misura del 50 % rispetto al testimone non trattato. I valori di  $EC_{50}$  sono stati utilizzati per calcolare il fattore di resistenza (FR) degli isolati dividendo l' $EC_{50}$  calcolata per il singolo isolato per il valore derivante dalla media delle  $EC_{50}$  di tre ceppi sensibili di riferimento (5, 6 e 261). Fattori di resistenza pari o superiori a 10

indicano un possibile rischio di resistenza (Oliver e Hewitt, 2014). I risultati relativi ai fattori di resistenza (FR) dei ceppi sono visualizzati mediante *box-plot*, una tipologia di grafico che consente di valutare la distribuzione dei dati attraverso i valori minimi e massimi (tratti) ed i quartili (scatola), che suddividono l'insieme di dati in quattro parti, ciascuna contenente il 25 % delle osservazioni. Cerchi e asterischi indicano valori anomali che fuoriescono dalla distribuzione.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Le sostanze attive più frequentemente impiegate nei 19 meleti oggetto di monitoraggio sono costituite per la maggior parte dai DMI (79%), QoI (68%) e dalla dodina (63%). Le anilinopirimidine (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 due meleti, siti l'uno in provincia di Sondrio e l'altro in provincia di Pavia. In generale, le classi di sostanze attive considerate sono state applicate per un numero inferiore a 3 trattamenti per stagione, a eccezione del meleto 14 dove la dodina è stata utilizzata per sette volte nella stagione 2013. La crescita degli isolati sensibili di riferimento in presenza di concentrazioni crescenti dei diversi fungicidi ha mostrato un andamento decrescente, con il completo annullamento dello sviluppo del micete alle concentrazioni più elevate. Al contrario, una ridotta inibizione della crescita è stata osservata nel caso di resistenza nei confronti della sostanza attiva saggiata. Di seguito vengono illustrati i risultati ottenuti per le singole sostanze attive raggruppate per classe.

### 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. Solamente quattro ceppi (168, 266, 294 e 378) hanno mostrato fattori di resistenza superiori a 10, con  $EC_{50}$  superiori a 13,3 mg/L (figura 1). Il ceppo 378, caratterizzato dall' $EC_{50}$  più elevata (>100 mg/L), è stato isolato nel meleto 17 non trattato con boscalid nell'anno di campionamento. 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. 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 quattro individui capaci di crescere in presenza di elevate concentrazioni della sostanza attiva.

### AP-Cyprodinil

Per quanto concerne *V. inaequalis*, sono pochi gli studi relativi alla resistenza nei confronti delle anilinopirimidine. 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 anilinopirimidine in altri studi (Köller *et al.*, 2005). Nel presente studio, le  $EC_{50}$  relative a cyprodinil dei ceppi sensibili di riferimento sono risultate comprese tra 0,03 e 0,12 mg/L di sostanza attiva. La maggior parte degli isolati (85%) è risultata sensibile, mostrando fattori di resistenza inferiori a 10 e un valore medio di  $EC_{50}$  pari a 0,32 mg/L (figura 1). Solamente otto ceppi, isolati nei meleti 7, 9, 12, 14, 15 e 17, sono stati caratterizzati da fattori di resistenza superiori a 10, a seguito di  $EC_{50}$  pari o superiori a 0,6 mg/L di sostanza

attiva, valore caratteristico dei ceppi resistenti secondo quanto riportato da altri autori (tabella 3). Le distribuzioni dei valori di EC<sub>50</sub> in relazione all'utilizzo di anilinopirimidine in meleto ha evidenziato l'assenza di particolari differenze tra appezzamenti trattati e non trattati. Lo sporadico ritrovamento di ceppi resistenti a cyprodinil potrebbe essere imputabile al limitato utilizzo delle anilinopirimidine, le quali sono generalmente applicate una sola volta per stagione.

Figura 1. Distribuzione *box-plot* dei fattori di resistenza (FR) relativi a boscalid, cyprodinil, dodina, myclobutanil e trifloxystrobin negli isolati di *V. inaequalis*

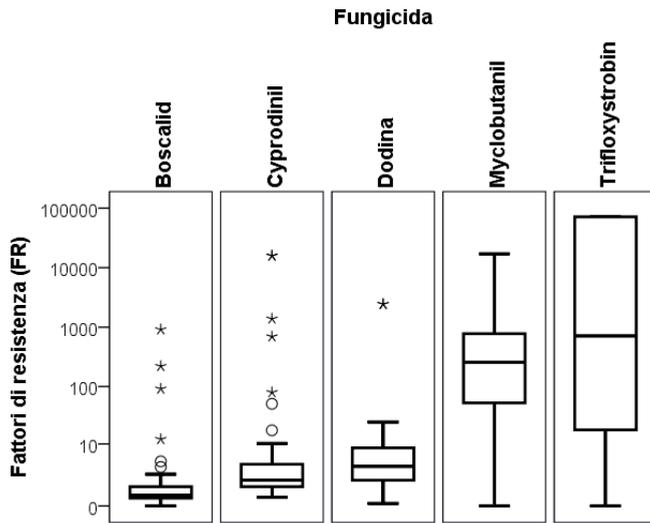


Tabella 3. Valori di EC<sub>50</sub> (mg/L) relativi a isolati di *V. inaequalis* sensibili (S) o resistenti (R) a boscalid, cyprodinil, dodina, myclobutanil e trifloxystrobin riportati in studi sulla crescita del micelio su substrato agarizzato e valori rilevati nel presente studio

Autori	Classe	EC <sub>50</sub> (mg/L)				
		Boscalid	Cyprodinil	Dodina	Myclobutanil	Trifloxystrobin
Koller <i>et al.</i> , 2004	R	-	-	-	<0,1	-
Whelan <i>et al.</i> , 1992	S	-	-	-	0,16	-
Bakker <i>et al.</i> , 1995	S	-	-	0,85	0,43	-
Bakker, 1999	S	-	-	0,527	-	-
Beresford <i>et al.</i> , 2012	S	-	-	0,24	0,07-0,3	-
	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	0,85±0,3*	0,13±0,03*	1,23±0,3*	0,01 ± 0,01*	0,003 ± 0,026*
	R	>12	>0,6	>3,9	7,6 ± 6*	>34

\*valore medio ± intervallo di confidenza al 95 %

### Dodina

I primi casi di resistenza ai fungicidi in popolazioni di *V. inaequalis* riguardano proprio la dodina: nel 1969, infatti, sono stati ritrovati in meleto 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, i valori di EC<sub>50</sub> relativi a dodina dei tre ceppi di riferimento sono risultati inferiori a 0,9 mg/L, in linea con quanto riportato per i ceppi sensibili da altri autori (tabella 3). Fattori di resistenza superiori a 10 sono stati rilevati nel 25% degli isolati (figura 1), i quali si sono caratterizzati per EC<sub>50</sub> 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. 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*.

### **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 bitertanol caratterizzati da EC<sub>50</sub> quattro-cinque volte superiori rispetto a quelle di 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<sub>50</sub> 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 otto ceppi, gli individui monitorati si sono caratterizzati per fattori di resistenza ampiamente superiori a 10 (figura 1), mostrando valori di EC<sub>50</sub> tra 0,1 e 99,5 mg/L di sostanza attiva. Considerando quanto rilevato in altri studi (tabella 3), nei quali l'EC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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, 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. 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 frequentemente impiegate nei confronti dell'agente della ticchiolatura del melo, portando alla selezione di individui resistenti.

### **QoI- Trifloxystrobin**

Il valore medio di EC<sub>50</sub> stimato per i tre ceppi sensibili di riferimento è risultato pari a 0,01 mg/L, valore ampiamente superato dalla maggior parte degli isolati analizzati, che hanno raggiunto spesso valori superiori a 10 mg/L (figura 1). Ad eccezione di tredici isolati (25% del totale), gli individui analizzati presentano un fattore di resistenza superiore a 10 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<sub>50</sub> superiore a 2 (tabella 3). Individui resistenti sono stati ritrovati in tutti i meleti, a eccezione di tre, ovvero i numeri 11, 19 e 20. Sebbene isolati resistenti siano stati rilevati anche in campioni prelevati da meleti non trattati con i QoI nella stagione corrente, i ceppi prelevati dai meleti sottoposti all'applicazione dei QoI hanno mostrato i valori di EC<sub>50</sub> più elevati. 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 QoI in campo. In effetti, le strobilurine, appartenenti alla classe dei QoI, 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). E' pertanto di fondamentale importanza l'applicazione delle strategie antiresistenza.

## CONCLUSIONI

In conclusione, il protocollo messo a punto nel corso del presente studio si è rivelato idoneo alla valutazione della sensibilità di ceppi di *V. inaequalis* nei confronti di diverse sostanze attive contemporaneamente. I tempi di preparazione ed esecuzione di tale metodologia risultano purtroppo molto lunghi, poiché la crescita del micete su terreno agarizzato richiede quattro 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 ma che permettano, 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 tuttavia evidenziano la frequente presenza di ceppi resistenti a trifloxystrobin e myclobutanil, probabilmente in conseguenza del ripetuto utilizzo delle classi di resistenza dei QoI 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 e in Oltrepo Pavese, i quali mostrano comportamenti analoghi per quanto riguarda la resistenza ai fungicidi.

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 che la selezione di ceppi resistenti non è ristretta a 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.

## Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare per la preziosa collaborazione Rossana Tonesi della Direzione Generale Agricoltura Regione Lombardia, Martino Salvetti della Fondazione Dott. P. Fojanini di Studi Superiori di Sondrio e Nicola Parisi della CO.PRO.VI. Società Cooperativa Consorzio della Provincia di Pavia.

## LAVORI CITATI

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 GR, Butcher MR, Gaunt RE, 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*, 7-11.
- Beresford R.M., Wright P.J., Wood P.N., ParkN.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.
- De Miccolis Angelini R.M., Rotolo C., Masiello M., Gerin D., Pollastro S., Faretra F., 2014. Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. *Pest Manag. Sci.*, 70, 1785–1796.
- 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.
- 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.
- 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 QoI 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.
- Kuck K.H., Stenzel K., Vors J.P., 2012. Sterol biosynthesis inhibitors. In: *Modern Crop Protection Compounds 2nd edition* (Krämer W., Schirmer U., Jeschke P., Witschel M. ed.). Wiley-VCH Verlag & Co. KgaA, Weinheim, DE, 761-805.
- Kunz S., Lutz B., Deiasing 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.
- MacHardy W.E., 1996. Apple scab – biology, epidemiology and management, APS Press, St. Paul Minnesota, 412-433.
- Oliver R.P., Hewitt H.G., 2014. Fungicides in crop protection, 2nd edition, CABI, Wallingford, UK, 123-149.
- 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.
- 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*, 289-294.