

RESISTENZA AI FUNGICIDI IN CEPPI DI *BOTRYTIS CINEREA* ISOLATI IN VIGNETI LOMBARDI

D. MARCIANÒ, F. MASSI, P. A. BIANCO, G. MADDALENA, S. L. TOFFOLATTI
Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2, 20133 Milano
silvia.toffolatti@unimi.it

RIASSUNTO

La difesa della vite nei confronti di *Botrytis cinerea*, agente eziologico della muffa grigia, si basa principalmente sull'impiego di fungicidi monosito. Per gestire al meglio la resistenza ai fungicidi è importante conoscere sia l'entità del problema che la sua origine. Nel presente lavoro sono stati isolati in Lombardia 720 ceppi di *B. cinerea* per la valutazione del profilo di sensibilità nei confronti di boscalid, fenhexamid, cyprodinil e fludioxonil e per il meccanismo genetico di resistenza. La resistenza a boscalid, presente nel 3% dei ceppi, è risultata principalmente associata alla mutazione H272R/Y del gene *sdhB*. La resistenza a fenhexamid (0,1% dei ceppi), è risultata associata alla mutazione P238S nel gene *erg27*. Il 4 e il 5% dei ceppi sono risultati resistenti rispettivamente a cyprodinil e fludioxonil. Questi ultimi si sono concentrati principalmente nella provincia di Sondrio. Nessuna mutazione a livello del fattore trascrizionale *mrr1* è stata riscontrata nei ceppi resistenti a fludioxonil né in quelli resistenti a più classi di fungicidi. In conclusione, nonostante la ridotta frequenza dei ceppi resistenti, i meccanismi di resistenza e la localizzazione geografica dei ceppi resistenti suggeriscono la necessità di implementare le strategie antiresistenza a livello locale, non solo regionale.

Parole chiave: botrite, strategie antiresistenza, monitoraggio della resistenza, sensibilità ai fungicidi

SUMMARY

FUNGICIDE RESISTANCE IN *BOTRYTIS CINEREA* STRAINS ISOLATED IN LOMBARDY VINEYARDS

Grey mold, caused by *Botrytis cinerea*, is mainly controlled by applying single-site fungicides in vineyard. Monitoring fungicide resistance and investigating the mechanisms of resistance are key factors for a rational management of resistance in open field. In this study, 720 *B. cinerea* strains were isolated in vineyards of northern Italy (Lombardy region) for the characterization of sensitivity to boscalid, fenhexamid, cyprodinil and fludioxonil and for the point mutations associated with resistance. Resistance to boscalid (3% of the strains) was mainly due to H272R/Y mutations at *sdhB* gene, while resistance to fenhexamid (0.1% of the strains) was due to P238S mutation in *erg27* gene. Resistance to cyprodinil and fludioxonil was found in 4 and 5% of the strains, respectively. Neither strains resistant to fludioxonil nor multidrug resistant strains showed mutations at *mrr1* transcription factor. In conclusion, field populations of *B. cinerea* showed relatively low frequency of resistance, but the genetic mechanisms of resistance and the geographic localization of resistant strains suggest that resistance management should be implemented both at local and regional levels.

Keywords: grey mold, disease management, anti-resistance strategy, fungicide sensitivity

INTRODUZIONE

Botrytis cinerea Pers., agente eziologico della muffa grigia, è un fungo fitopatogeno in grado di attaccare un elevato numero di ospiti, tra cui la vite. I gravi danni che il patogeno può causare alla vite vengono contenuti, negli areali a rischio di infezione, mediante adeguate

pratiche agronomiche e con l'impiego di fungicidi antibotritici a meccanismo d'azione monosito. Questi ultimi si rivelano spesso l'unico mezzo di controllo veramente efficace per contrastare il patogeno. Tuttavia il loro utilizzo, se non razionalmente effettuato, comporta la selezione di ceppi resistenti la cui diffusione incontrollata può condurre a cali di efficacia del prodotto in pieno campo. Per gestire al meglio la difesa della coltura e preservare l'efficacia dei prodotti è importante conoscere sia l'entità del problema che la sua origine. La caratterizzazione di una popolazione di miceti fitopatogeni risulta importante per comprenderne le dinamiche di evoluzione, che possono influenzare la difesa stessa.

La presenza di ceppi resistenti ai fungicidi impiegati in viticoltura è stata ampiamente dimostrata in Italia (De Miccolis Angelini et al., 2014; Vercesi et al., 2014; Panebianco et al., 2015; Campia et al., 2017; Bertetti et al., 2019). La resistenza ai fungicidi in *B. cinerea* è associata a mutazioni puntiformi nei geni che codificano per il *target* del fungicida o alla sovraespressione dei trasportatori ABC, in grado di espellere il fungicida dalla struttura fungina, rendendolo di fatto inefficace. Mutazioni nei geni *sdhB*, *sdhC* e *sdhD*, codificanti per le subunità B, C e D dell'enzima succinato deidrogenasi, sono state riportate per quanto riguarda ceppi resistenti a boscalid (Grabke et al., 2015), mentre mutazioni nel gene *erg27* codificante la C3-cheto-riduttasi sono state riscontrate in ceppi resistenti a fenhexamid (Grabke et al., 2015). Inoltre, mutazioni a livello del fattore trascrizionale *mrr1*, associato alla sovraespressione di geni coinvolti nell'espulsione del fungicida, sono state descritte per i ceppi che hanno dimostrato di essere resistenti a fludioxonil e a più sostanze attive contemporaneamente (Leroch et al., 2013). La presenza di mutazioni nel genoma, stabili ed ereditabili, è uno dei meccanismi più importanti di resistenza (De Miccolis Angelini et al., 2015).

Nell'ambito di un progetto di monitoraggio triennale, numerosi ceppi di *B. cinerea*, isolati da vigneti ubicati in diverse province lombarde, sono stati caratterizzati per quanto concerne il profilo di sensibilità a quattro sostanze attive antibotritiche (boscalid, fenhexamid, cyprodinil e fludioxonil) appartenenti alle classi attualmente utilizzate nel contesto viticolo. I ceppi risultati resistenti a boscalid, fenhexamid, fludioxonil e più in generale a più classi di fungicidi contemporaneamente sono stati sottoposti ad analisi genetica per identificare la presenza delle mutazioni associate alla resistenza riportate in letteratura (Grabke et al., 2015; Leroch et al., 2013).

MATERIALI E METODI

Isolamento e caratterizzazione dei ceppi per la sensibilità ai fungicidi

Ceppi mono-conidici di *B. cinerea* sono stati isolati da campioni di grappoli infetti raccolti durante il periodo di vendemmia in 36 diversi vigneti situati nelle principali aree viticole lombarde, tra le province di Brescia, Mantova, Pavia e Sondrio. In totale sono stati isolati 720 ceppi, 640 dei quali sono stati caratterizzati per la resistenza a boscalid e fenhexamid, 618 a cyprodinil e 639 a fludioxonil secondo il metodo descritto da Campia et al. (2017). L' EC_{50} (concentrazione di fungicida in grado di inibire la crescita miceliare nella misura del 50% rispetto al controllo) è stata calcolata per ciascun ceppo e fungicida. Il fattore di resistenza (FR) è stato calcolato per ciascun fungicida dividendo il valore di EC_{50} del ceppo per quello di ceppi sensibili di riferimento. Ceppi con $FR > 10$ sono stati considerati resistenti al fungicida (Campia et al., 2017; Oliver and Hewitt, 2014).

Caratterizzazione molecolare della resistenza

La caratterizzazione molecolare della resistenza è stata effettuata mediante amplificazione e sequenziamento delle seguenti regioni geniche: geni *sdhB*, *sdhC* e *sdhD*, per quanto riguarda i ceppi resistenti a boscalid; gene *erg27* per quanto concerne i ceppi resistenti a fenhexamid; fattore trascrizionale *mrr1* per i ceppi che hanno dimostrato di essere resistenti a fludioxonil e a cyprodinil fludioxonil contemporaneamente.

In totale sono stati analizzati 18 ceppi resistenti a boscalid, 3 a fenhexamid (uno proveniente da questo studio, 2 da uno studio precedente svolto da Vercesi et al., 2014), 5 a fludioxonil e 2 a cyprodinil e fludioxonil, oltre a due ceppi sensibili. Il DNA è stato estratto dai ceppi di *B. cinerea* attraverso il metodo sviluppato da De Miccolis et al. (2010), quantificato allo spettrofotometro (Nanodrop, ND1000) e diluito fino alla concentrazione di 50 ng/μL. Le reazioni di PCR sono state effettuate in termociclatore (Eppendorf Mastercycler Ep, Eppendorf, Milano) in un volume di reazione di 50 μL contenente 1x Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo-Fisher Scientific), 0,5 μM di ciascun *primer* (tabella 1) e 200 ng di DNA secondo le seguenti condizioni di amplificazione: 1 ciclo di denaturazione a 95 °C per 2 minuti; 35 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, appaiamento alle temperature di annealing riportate in tabella 1 per 30 secondi ed estensione a 72 °C per 1 minuto; 1 ciclo di estensione finale a 72 °C per 5 minuti. I prodotti di PCR sono stati purificati e sequenziati secondo metodo Sanger da Eurofins Genomics (Vimodrone, Milano). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle di riferimento mediante i *software* blastn e blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabella 1. Elenco dei *primer* impiegati nella genotipizzazione della resistenza a boscalid, fludioxonil e fenhexamid e temperature di *annealing* (T_a)

Fungicida	Target	Primer	Sequenza (5'-3')	T _a (°C)
Boscalid	<i>sdhB</i>	KES429-f	ATGGCTGCTCTCCGCACAG	56
		KES167-r	TGCTATCTCATCAAGCCCCCT	
	<i>sdhC</i>	KES622-f	ATGTTTTACAGAGAGCAACTCAAC	54
		KES623-r	CTACAAGAAAGCAACCAACGC	
	<i>sdhD</i>	KES667-f	ATGGCTTCATTCATCAAAACCATC	52
		KES668-r	TTATGCGCGCCAAATCTTTTG	
Fludioxonil	<i>mrr1</i>	Mrr1-spez-f	TATCGGTCTTGCAGTCCGC	55
		Mrr1-Pira-r	CCACCACAATCTTGGATCATTGGGATCAGAACCTGC	
Fenhexamid	<i>erg27</i>	KES2004-f	TGCTCCCTATAGTTTCAACC	55
		KES2005-r	AGCAAAAGAGTTTGAACAGG	
		<i>erg27</i> Beg-f	TGGGATTACCACCATGGGAGACAAGTG	55
		<i>erg2000up-r</i>	TCGGAGGGTTTGGCTTGTTTTG	

Analisi statistica

Il test di Kruskal-Wallis è stato impiegato per valutare l'esistenza di differenze significative nelle distribuzioni della percentuale di ceppi resistenti nelle quattro province.

RISULTATI

Sensibilità ai fungicidi

La maggior parte dei ceppi analizzati (>95%) è risultata sensibile ai quattro fungicidi in esame (tabella 2) a livello regionale e provinciale, se si eccettua la provincia di Sondrio dove la percentuale di ceppi sensibili a fludioxonil scende all'89%. A livello provinciale, la percentuale di ceppi resistenti ha oscillato tra 1 e 6% per quanto riguarda boscalid, tra il 3 ed il 5% per cyprodinil, tra 2 e 11% per fludioxonil e tra 0 e 0,4% per fenhexamid. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella distribuzione dei valori dei ceppi resistenti delle diverse province per quanto concerne boscalid, cyprodinil e fenhexamid ($1,2 < \chi^2 < 5,3$; $df=3$; $P>0,15$). Al contrario, sono state riscontrate differenze significative tra province per quanto riguarda la percentuale di ceppi resistenti a fludioxonil, che è risultata significativamente maggiore ($\chi^2=27,7$; $df=3$; $P<0,0001$) nella provincia di Sondrio (11%). La maggior parte dei ceppi resistenti è risultata insensibile ad una singola sostanza attiva, solamente 5 ceppi hanno mostrato resistenza a due sostanze attive contemporaneamente: tre ceppi insensibili a cyprodinil e boscalid e due a cyprodinil e fludioxonil.

Tabella 2. Percentuali di ceppi sensibili e resistenti a boscalid, cyprodinil, fludioxonil e fenhexamid nelle quattro province lombarde e nella regione

Fungicida	Fenotipo	Brescia	Mantova	Pavia	Sondrio	Regione
Boscalid	Sensibile	94	98	97	99	97
	Resistente	6	2	3	1	3
Cyprodinil	Sensibile	95	96	96	97	96
	Resistente	5	4	4	3	4
Fludioxonil	Sensibile	98	98	96	89	95
	Resistente	2	2	4	11	5
Fenhexamid	Sensibile	99,6	100	100	100	99,9
	Resistente	0,4	0	0	0	0,1

Caratterizzazione molecolare della resistenza

Le mutazioni associate alla resistenza riscontrate in questo studio sono riportate in tabella 3.

Gli isolati di *B. cinerea* resistenti a boscalid si sono caratterizzati per due mutazioni a livello del codone 272 del gene *sdhB*: H272Y e H272R. La prima mutazione è stata rilevata nel 17% dei ceppi analizzati, la seconda nel 44 %. Due mutazioni non sinonime a carico dei geni *sdhC* (A187F) e *sdhD* (I189L) sono state riscontrate nei ceppi resistenti ma non in quelli sensibili a boscalid. In particolare, il ceppo 632 si è caratterizzato per la contemporanea presenza di tre mutazioni: H272R per quanto concerne il gene *sdhB*, A187F per *sdhC* e I189L per *sdhD*.

Gli isolati resistenti a fenhexamid hanno mostrato o la mutazione P238S (due ceppi) o la I232M (un ceppo) a livello del gene *erg27* (tabella 3).

Nessuno dei ceppi resistenti a fludioxonil da solo o in combinazione con cyprodinil ha mostrato la delezione dell'aminoacido leucina a livello del codone 497 del fattore di trascrizione *mrr1*.

Tabella 3. Elenco dei ceppi e delle mutazioni riscontrate a carico dei geni associati alla resistenza a boscalid e fenhexamid

Ceppo*	Fungicida	Gene	Mutazione
361, 362, 719	Boscalid	<i>sdhB</i>	H272Y
363, 377, 379, 576, <u>632</u> , 636, 668, <u>674</u>	Boscalid	<i>sdhB</i>	H272R
<u>632</u>	Boscalid	<i>sdhC</i>	A187F
614, <u>632</u> , <u>674</u>	Boscalid	<i>sdhD</i>	I189L
135, 167	Fenhexamid	<i>erg27</i>	P238S
<u>278</u>	Fenhexamid	<i>erg27</i>	I232M

*Ceppi con più mutazioni sono evidenziati dalla sottolineatura

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sulla caratterizzazione dei ceppi per il profilo di sensibilità a boscalid, cyprodinil, fenhexamid e fludioxonil hanno consentito di rilevare una bassa frequenza di ceppi resistenti all'interno della regione (0,1-5%). Tale risultato potrebbe essere attribuito al limitato numero di trattamenti (1-2 per stagione) eseguiti nei vigneti (Campia et al., 2017). L'emergenza dei ceppi resistenti all'interno di una popolazione è, infatti, il risultato di un fenomeno evolutivo che si verifica laddove si eserciti un'elevata pressione di selezione nei confronti dei ceppi resistenti con il frequente e ripetuto uso del fungicida o della classe di fungicidi (Walker et al., 2013). La limitazione del numero di applicazioni di fungicida può, in effetti, contribuire a ridurre la selezione di ceppi resistenti (Li et al., 2014). A livello provinciale, è stato possibile rilevare differenze significative nella distribuzione dei ceppi resistenti a fludioxonil, che si sono concentrati principalmente nei vigneti analizzati nella provincia di Sondrio. Tale risultato potrebbe essere imputabile al diverso utilizzo di formulati a base di fenilpirroli effettuato nelle diverse province: mentre a Sondrio il 44% dei vigneti è stato sottoposto a trattamenti con fludioxonil, nelle altre province la percentuale è risultata pari al 30%.

La maggior parte dei ceppi resistenti riscontrati nelle analisi è risultata insensibile a un'unica sostanza attiva, solamente cinque ceppi sono risultati insensibili a due sostanze attive contemporaneamente (cyprodinil e fludioxonil o cyprodinil e boscalid). La resistenza a più sostanze attive in ceppi di *B. cinerea* (*multidrug resistance*) è un fenomeno ampiamente riportato in letteratura (Walker et al., 2013) che può comportare seri problemi nella gestione della malattia. Per quanto riguarda la Lombardia questo problema potrebbe assumere importanza poiché formulati a base di cyprodinil, fludioxonil e boscalid sono ampiamente impiegati in campo.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi ha consentito di rilevare la presenza di mutazioni genetiche già note in letteratura a carico dei geni che codificano per le proteine *target* di boscalid (H272R/Y nel gene *sdhB*) e fenhexamid (P238S e I232M nel gene *erg27*). L'effettivo coinvolgimento delle due mutazioni riscontrate nei ceppi resistenti a boscalid (A187F nel gene *sdhC* e I189L nel gene *sdhD*) nel fenomeno della resistenza andrebbe ulteriormente verificato analizzando un numero maggiore di ceppi. Ulteriori approfondimenti sono, inoltre, necessari per chiarire la natura della resistenza a fludioxonil e ai ceppi *multidrug* che non hanno mostrato mutazioni a carico del fattore trascrizionale *mrr1* come riportato in letteratura.

CONCLUSIONI

In conclusione, il monitoraggio della resistenza ha consentito di riscontrare una bassa frequenza di ceppi resistenti, generalmente caratterizzati da mutazioni genetiche associate alla resistenza, nelle popolazioni lombarde di *B. cinerea*. Ulteriori indagini vanno svolte per monitorare attentamente l'evoluzione delle popolazioni e per implementare le strategie antiresistenza a livello locale e regionale.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Nicola Parisi, Martino Salvetti, Eduardo Rizzi e Matteo Pinzetta per l'aiuto nei campionamenti e Paola Campia per i saggi di sensibilità ai fungicidi.

LAVORI CITATI

- Bertetti D., Monchiero M., Garibaldi A., Gullino M.L., 2019. Monitoring activities on fungicide resistance in *Botrytis cinerea* carried out in vineyards in North- West Italy in 2018. *Journal of Plant Diseases and Protection* DOI: 10.1007/s41348-019-00263-3.
- Campia P., Venturini G., Moreno-Sanz P., Casati P., Toffolatti S.L., 2017. Genetic structure and fungicide sensitivity of *Botrytis cinerea* populations isolated from grapevine in northern Italy. *Plant Pathology*, 66, 890-899.
- De Miccolis Angelini R. M., Pollastro S., Faretra F., 2015. Genetics of Fungicide Resistance. *In: Fungicide Resistance in Plant Pathogens* (Ishii H., Hollomon D.W. coord.). Cap. 2, Springer, Japan, 13-34.
- De Miccolis Angelini R. M., Habib W., Rotolo C., Pollastro S., Faretra F., 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *B. fuckeliana* resistant to the fungicide boscalid. *Eur. J. Plant Pathol.*, 128, 185–199.
- 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.
- Grabke A., Stammler G., 2015. A *Botrytis cinerea* population from a single strawberry field in Germany has a complex fungicide resistance pattern. *Plant Dis.*, 99, 1078-1086.
- Leroch M., Plesken C., Weber R. W. S., Kauff F., Scalliet G., Hahn M., 2013. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (1), 159-167.
- Li X., Fernández-Ortuño D., Chen S., Grabke A., Luo C. X., Bridges W. C., Schnabel G., 2014. Location-specific fungicide resistance profiles and evidence for stepwise accumulation of resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.*, 98, 1066-1074.
- Oliver R. P., Hewitt H. G., 2014. Fungicides in Crop Protection, 2nd Edition, CABI, Wallingford UK, 200 pp.
- Panebianco A., Castello I., Cirvilleri G., Perrone G., Epifani F., Ferrara M., Polizzi G., Walters D. R., Vitale A., 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection*, 77, 65-73.
- Vercesi A., Toffolatti S. L., Venturini G., Campia P., Scagnelli S., 2014. Characterization of *Botrytis cinerea* populations associated with treated and untreated cv. Moscato vineyards. *Phytopathologia mediterranea*, 53 (1), 108-123.
- Walker A.S., Micoud A., Rémuson F., Grosman J., Gredt M., Leroux P., 2013. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Manag. Sci.*, 69, 667–678.