

## SENSIBILITÀ VERSO FUNGICIDI IBS IN POPOLAZIONI DI *CERCOSPORA BETICOLA* RACCOLTE IN VAL PADANA

L. LANGUASCO <sup>(1)</sup>, P. MERIGGI <sup>(2)</sup>, V. ROSSI <sup>(1)</sup>, S. GIOSUE' <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Istituto di Entomologia e Patologia vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore  
Via E. Parmense, 84 – 29100 Piacenza - vittorio.rossi@unicatt.it

<sup>(2)</sup> Agronomica, Ricerca e Sviluppo Terremerse, Via S. Alberto, 327 – 48100 Ravenna

### RIASSUNTO

Nel periodo 1998-2001 è stata effettuata un'indagine in varie aree bieticole della Valle Padana, sul livello di sensibilità nei confronti di fungicidi appartenenti alla classe degli IBS di popolazioni di *Cercospora beticola*. In laboratorio, lo studio ha evidenziato cali nel livello di sensibilità all'interno delle popolazioni studiate. Nonostante l'elevato numero di isolati fungini saggiati (1550), non è possibile trarre conclusioni definitive circa la reale consistenza del fenomeno; nondimeno, l'evolversi della situazione deve essere ulteriormente studiato e, nel contempo, non devono essere trascurate le strategie anti-resistenza.

**Parole chiave:** *Cercospora beticola*, fungicidi IBS, sensibilità.

### SUMMARY

#### SENSIBILITY TO SBIs FUNGICIDES WITHIN POPULATIONS OF *CERCOSPORA BETICOLA* COLLECTED IN THE PO VALLEY

In the period 1998-2001 a study was carried out in several sugar beet fields of northern Italy to determine the distribution of sensitivity to SBIs fungicides within populations of *Cercospora beticola* from the Po Valley. The study showed a decrease in the sensitivity level of some fungal strains grown on fungicide amended medium. In spite of the high number of tested fungal strains (1550), it was not possible to draw final conclusions about the real magnitude of this phenomenon; however, the progress of the situation has to be studied further and, in the meantime, the anti-resistance strategies must not be neglected.

**Key words:** *Cercospora beticola*, SBIs, sensitivity.

### INTRODUZIONE

Gli inibitori della biosintesi degli steroli (IBS), impiegati in Italia su barbabietola da zucchero a partire dagli anni '80 per la lotta a *Cercospora beticola* Sacc., rappresentano uno dei più importanti gruppi di fungicidi per il contenimento del patogeno, specialmente in quelle zone in cui si è già manifestata una perdita di efficacia dei composti benzimidazolici e stannorganici (Byford, 1996). Da più di quindici anni, però, sono stati segnalati casi di resistenza agli IBS in diversi patogeni (Stanis e Jones, 1985; Hildebrand *et al.*, 1988; Smith F.D. *et al.*, 1991; Kendall *et al.*, 1993; Erickson e Wilcox, 1997; Hsiang *et al.*, 1997; Romero e Sutton, 1997), inclusa *C. beticola* (Stähle-Csech e Gisi, 1991; Karaoglanidis *et al.*, 1996; Karaoglanidis *et al.*, 2000). In una popolazione del patogeno mai esposta all'azione degli IBS, la distribuzione della sensibilità individuale ad uno di tali principi attivi risulta continua, essendo possibile trovare isolati altamente sensibili ed altri contraddistinti da una sensibilità notevolmente minore (Köller e Scheinpflug, 1987; Smith F.D. *et al.*, 1991). L'impiego degli IBS tende a spostare la distribuzione della sensibilità della popolazione patogena verso la resistenza e, col perdurare della pressione selettiva esercitata dal ripetuto uso della stessa molecola, il fenomeno prosegue fino all'instaurarsi di una "resistenza pratica", quando la frequenza dei ceppi non adeguatamente contenuti avrà raggiunto livelli tali da rendere

insoddisfacente il contenimento della malattia in campo (Köller e Scheinpflug, 1987; EPPO, 1988). Sin dalla metà degli anni '90, in diversi campi di barbabietola da zucchero localizzati nell'Italia settentrionale, sono stati segnalati agli autori di questo lavoro, ed anche direttamente osservati, casi di diminuita efficacia dei fungicidi IBS. Questo lavoro rappresenta un primo contributo allo studio del livello di sensibilità agli IBS in popolazioni di *C. beticola* provenienti da campi di barbabietola da zucchero in Pianura Padana.

### MATERIALI E METODI

Nei tre anni 1998, 1999 e 2001, sono stati considerati 29 campi di barbabietola da zucchero distribuiti nelle principali aree di coltivazione della Pianura Padana (figura 1). In questi campi, nonostante le applicazioni di IBS, le piante mostravano le tipiche macchie necrotiche provocate da *C. beticola*. Nel mese di settembre, sono stati raccolti campioni di giovani foglie (FAO, 1982b), ognuno composto da almeno cinque foglie (Stähle-Csech e Gisi, 1991). Per ciascun campo sono state acquisite tutte le informazioni relative alle applicazioni di fungicidi nel corso dell'annata, ma anche negli anni precedenti, come pure l'eventuale uso di varietà di bietola resistenti. In laboratorio, si è proceduto ad isolare il patogeno da singole macchie necrotiche e, attraverso semine monoconidiche, sono state ottenuti isolati monosporici, in numero di 50 per campione di foglie.

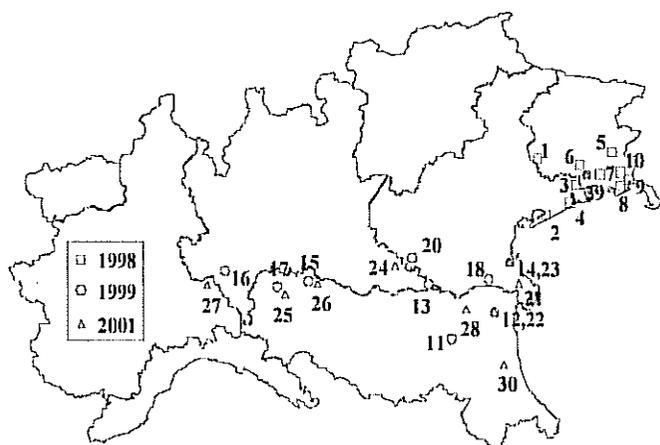


Figura 1 – Distribuzione dei campi di barbabietola oggetto del campionamento nei tre anni di studio.

Il grado di sensibilità degli isolati fungini ai principi attivi saggianti è stato determinato tramite il metodo della crescita radiale su substrato avvelenato (Smith C.M. *et al.*, 1991), considerato il più adatto per i fungicidi appartenenti alla categoria

degli IBS (Smith F.D. *et al.*, 1991); come substrato di crescita è stato usato lo Czapek Agar. Ciascun isolato di *C. beticola* è stato saggiato nei confronti del p.a. utilizzato, in prevalenza, nel campo di provenienza. Per il campione 2, oltre al flutriafol, è stato messo in prova anche il propiconazole, in quanto impiegato solo in quella azienda, mentre per il campione 29 sono stati saggianti sia il cyproconazole che il difenoconazole, in quanto utilizzati sempre in miscela fra loro. Per le prove *in vitro*, sono stati utilizzati campioni tecnici dell'appropriato p.a. (FAO, 1982a), forniti da Labservice Analytica S.r.l. I principi attivi saggianti sono stati: cyproconazole, difenoconazole, flusilazole, flutriafol, propiconazole e tetraconazole, ciascuno alle seguenti concentrazioni: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 e 10 ppm. In ciascuna prova, insieme agli isolati di *C. beticola* provenienti dai campioni di foglie, ne è stato testato uno appartenente alla collezione dell'Istituto (denominato MPVP063), raccolto negli anni '80 in Marocco, che non era mai stato sottoposto in precedenza all'azione di fungicidi IBS. In accordo a quanto

stabilito da Smith C. *et al.* (1991), è stato considerato a ridotta sensibilità nei riguardi di una data concentrazione di p.a. ogni isolato le cui colonie mostravano, sul substrato avvelenato, un diametro medio  $\geq 50\%$  di quello raggiunto sul substrato privo di fungicida.

Successivamente, utilizzando la stessa metodica, sono state ricercate eventuali resistenze incrociate al difenoconazole, saggiando, per ciascun campione, gli isolati che avevano mostrato il minor livello di sensibilità verso gli altri principi attivi.

### RISULTATI

Le indagini hanno interessato 29 campi di barbabietola da zucchero, per un totale di 1550 isolati di *C. beticola*. Sono state individuate differenze di comportamento delle popolazioni fungine campionate in Pianura Padana rispetto all'isolato di riferimento, il quale non era stato mai sottoposto a pressione selettiva da parte dei fungicidi IBS. Tali differenze, però, sono risultate influenzate dal p.a. utilizzato in azienda per la difesa anticercosporica (tabella 1).

Tabella 1 – Numero di isolati di *C. beticola* saggiati per la capacità di crescita miceliare in presenza di fungicidi IBS e frequenza percentuale di quelli risultati a sensibilità ridotta (con crescita  $\geq 50\%$  rispetto al testimone cresciuto su substrato tal quale) alle diverse dosi. I segni + e - indicano il comportamento resistente e suscettibile, rispettivamente, dell'isolato di riferimento.

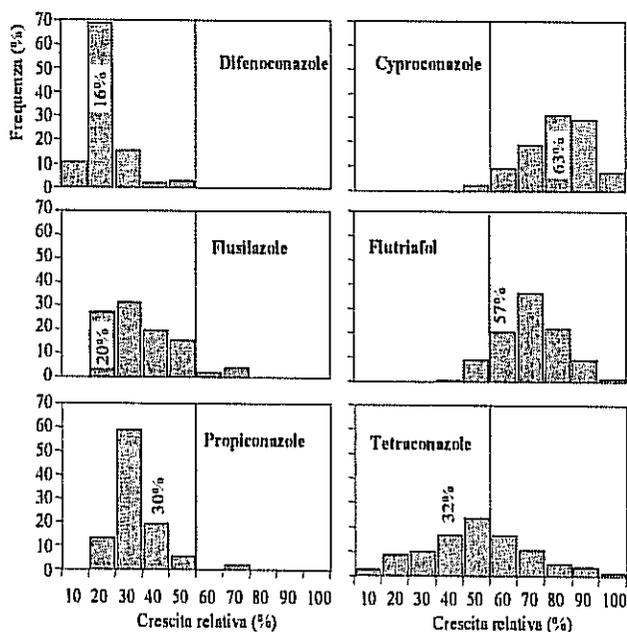
Principio attivo	Numero		Dosi (ppm)					
	Aziende	Isolati	0,1	0,5	1	3	5	10
Cyproconazole	5	250	98,0 +	39,2 -	3,2 -	0 -	0 -	0 -
Difenoconazole	2	100	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
Flusilazole	1	50	6,0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
Flutriafol	3	150	90,7 +	27,3 -	4,7 -	0 -	0 -	0 -
Propiconazole	1	50	2,0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
Tetraconazole	19	950	39,1 -	1,2 -	0,2 -	0,1 -	0,1 -	0 -
Totale		1550	36,9	7,39	0,89	0,05	0,05	0

Nessun isolato di *C. beticola*, sui 100 considerati nel complesso delle due aziende campionate, ha mostrato ridotta sensibilità nei confronti del difenoconazole, anche alla più bassa concentrazione utilizzata, pari a 0,1 ppm; anche l'isolato di riferimento è risultato sensibile a questa dose. Propiconazole e flusilazole sono stati saggiati, ciascuno, su soli 50 isolati; di questi, solo 1 e 3 (pari al 2% e 6%) hanno mostrato crescita miceliare in presenza di 0,1 ppm di propiconazole e flusilazole, rispettivamente; questi isolati sono risultati differenti rispetto all'isolato di riferimento che già a 0,1 ppm è risultato sensibile. Per questi due principi attivi tutti gli isolati sono cresciuti normalmente alla dose successiva di 0,5 ppm. I dati riferiti a flutriafol (150 isolati) e cyproconazole (250 isolati) hanno mostrato alta frequenza di isolati

capaci di crescere a 0,1 ppm (91% e 98% rispettivamente); l'isolato di riferimento ha mostrato comportamento analogo. Anche a 0,5 ppm, però, le popolazioni fungine hanno spesso mostrato una ridotta sensibilità nei confronti di questi due principi attivi, con valori medi del 27% e 39% di isolati rispettivamente. In alcune aziende il fenomeno è risultato particolarmente evidente. Ad esempio, nelle aziende 5 e 6, monitorate nel 1998, la frequenza di isolati a ridotta sensibilità al cyproconazole è stata superiore al 60%, mentre nell'azienda 2 (anno 1998), il fenomeno nei confronti del flutriafol ha interessato più del 50% degli isolati. Frazioni inferiori delle popolazioni fungine (3% per cyproconazole e 5% per flutriafol) sono risultate capaci di crescere anche a 1 ppm. Il tetraconazole è stato il p.a. saggiato sulla popolazione fungina più ampia, pari a 950 isolati. Mentre l'isolato di riferimento è risultato sensibile già a 0,1 ppm di p.a., il 39% della popolazione è risultata capace di crescere a questa concentrazione. A 0,5 ppm la frequenza di isolati a ridotta sensibilità è notevolmente calata, raggiungendo in media l'1%, pur con una punta massima del 16% nell'azienda 10 (anno 1998). E' stato reperito, nell'azienda 12 (anno 1999), un isolato con capacità di crescita in presenza di 5 ppm di tetraconazole.

Per un'analisi della variabilità entro popolazione del comportamento dei singoli isolati nei confronti dei principi attivi IBS, è stata considerata la distribuzione di frequenza a 0,1 ppm rispetto alla classe di crescita miceliare relativa, espressa in % della crescita in assenza del p.a. (figura 2).

Figura 2 – Distribuzione di frequenza della crescita miceliare degli isolati di *C. beticola* in presenza di 0,1 ppm di p.a., espressa in classi di crescita relativa (%) rispetto al testimone cresciuto su substrato tal quale. Sull'asse delle ascisse sono riportati i limiti superiori dell'intervallo considerato (per esempio, la classe 50 raggruppa tutti gli individui con crescita relativa compresa fra 40,1 e 50%). Le percentuali all'interno di ciascun grafico indicano il livello di crescita relativa dell'isolato di riferimento.



È stato possibile evidenziare come per difenoconazole, flusilazole e propiconazole la distribuzione degli isolati in funzione delle classi di crescita relativa delle colonie sia nettamente spostata verso livelli elevati di sensibilità; il confronto con la crescita dell'isolato di riferimento mostra che, comunque, vi sono individui caratterizzati da un minor livello di sensibilità, in modo particolare per flusilazole. Nel caso di cyproconazole e flutriafol, la popolazione studiata è risultata spostata verso livelli elevati di crescita miceliare in presenza del p.a.; anche l'isolato di riferimento si è però comportato in modo analogo, con crescite del 63% e del 57% rispetto al test non trattato, rispettivamente. Il tetraconazole ha mostrato una distribuzione molto ampia intorno alla classe intermedia, del tutto assimilabile ad una distribuzione normale; ciò può essere stato determinato dall'elevata numerosità campionaria. La frequenza di isolati con crescita superiore a quella dell'isolato di riferimento è comunque risultata elevata. L'analisi delle popolazioni raccolte in anni diversi ha anche evidenziato una progressiva diminuzione nel tempo del livello di sensibilità (dati non riportati). Per esempio, nelle aziende 4 e 9 (anno 1998) la moda della distribuzione di frequenza della crescita miceliare relativa si è attestata intorno al 30-40%, nelle aziende 15 e 16 (anno 1999) è aumentata al 40-50% e nelle aziende 21 e 27 (anno 2001) è salita ulteriormente al 60-80%.

Le prove relative alla presenza di fenomeni di resistenza incrociata al difenoconazole sono sempre risultate negative, ad eccezione di un isolato reperito nel campione 12 che ha mostrato resistenza a 5 ppm di tetraconazole ed a 0,5 ppm di difenoconazole.

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dal comportamento degli isolati fungini reperiti nel corso della prova e dal confronto con l'isolato di riferimento, è stato possibile trarre alcune indicazioni circa il livello di sensibilità di popolazioni di *C. beticola* raccolte in Pianura Padana nei confronti dei principali principi attivi IBS. Per quanto concerne difenoconazole, flusilazole e propiconazole, il grado di sensibilità si è rivelato elevato, con l'indicazione di una possibile lieve deriva verso livelli di minor sensibilità per flusilazole. La sensibilità verso cyproconazole e flutriafol è risultata inferiore, anche nell'isolato di riferimento che non era mai stato sottoposto a pressione selettiva da parte di fungicidi IBS. Ciò sembra suggerire una minore sensibilità di base del fungo nelle condizioni di laboratorio. Nel caso del tetraconazole, la distribuzione degli isolati nelle diverse classi di crescita relativa ha ben illustrato il fenomeno della variabilità continua del livello di sensibilità agli IBS all'interno delle popolazioni di *C. beticola* (Köller e Scheinpflug, 1987; Smith F.D. *et al.*, 1991). Il comportamento dell'isolato di riferimento ha permesso comunque di intravedere, anche per questo p.a., un possibile scivolamento verso una condizione di minor sensibilità della popolazione autoctona di *C. beticola*. Per lo stesso p.a. è stato anche possibile evidenziare il fenomeno, già rilevato per questo patogeno (Karaoglanidis *et al.*, 2002), del graduale aumento, nel corso degli anni, del livello di resistenza di base della popolazione del fungo.

In termini generali, il calo di sensibilità mostrato dalle popolazioni di *C. beticola* in condizioni di laboratorio può comunque considerarsi di lieve entità; solo l'1 % degli isolati saggati è risultato resistente a 1 ppm del p.a. impiegato per la difesa della coltura. La dimensione della popolazione fungina saggiata, pur consistente (1550 isolati in totale), non è comunque sufficiente a trarre conclusioni; nondimeno, i risultati ottenuti, unitamente alle ripetute segnalazioni relative al verificarsi di casi concreti in cui alcuni dei principi attivi saggati hanno contenuto in modo insoddisfacente la malattia, indicano chiaramente che il fenomeno deve essere ulteriormente studiato e che, nel contempo, non devono essere trascurate le strategie per evitare l'insorgenza dei fenomeni di resistenza (Brent, 1995).

## LAVORI CITATI

- BRENT K.J., 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph No. 1, 48 pp.
- BYFORD W.J., 1996. A survey of foliar diseases of sugar beet and their control in Europe. *Proceedings of the 59<sup>th</sup> IIRB Congress*, Bruxelles, Belgium, 13-15 February 1996, 1-10.
- EPPO, 1988. Fungicide resistance: definition and use of terms. *EPPO Bulletin*, 18, 569-574.
- ERICKSON E.O., WILCOX W.F., 1997. Distribution of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of *Uncinula necator* sensitive and resistant to triadimefon. *Phytopathology*, 87, 784-791.
- FAO, 1982a. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of plant pathogens to fungicides. General principles - FAO Method No. 24. *FAO Plant Protection Bulletin*, 30, 39-42.
- FAO, 1982b. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of plant pathogens to fungicides. General principles - FAO Method No. 28. *FAO Plant Protection Bulletin*, 30, 63-65.
- HILDEBRAND P.D., LOCKHART C.L., NEWBERY R.G., ROSS R.G., 1988. Resistance of *Venturia inaequalis* to bitertanol and other demethylation.inhibiting fungicides. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10, 311-316.
- 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.
- KARAOGLANIDIS G.S., IOANNIDIS P.M., THANASSOULOPOULOS C.C., 1996. Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* to EBIs fungicides. *Summaries of Invited and Research Papers of the 8<sup>th</sup> National Phytopathological Congress*, Heraklion, Crete. HPS 132.
- KARAOGLANIDIS G.S., IOANNIDIS P.M., THANASSOULOPOULOS C.C., 2000. Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. *Plant Pathology*, 49, 567-572.
- KARAOGLANIDIS G.S., IOANNIDIS P.M., THANASSOULOPOULOS C.C., 2002. Changes in sensitivity of *Cercospora beticola* populations to sterol-demethylation.inhibiting fungicides during a 4-year period in northern Greece. *Plant Pathology*, 51, 55-62.
- KENDALL S.J., HOLLOMON D.W., COOKE L.R. JONES D.R., 1993. Changes in sensitivity to DMI fungicides in *Rhynchosporium secalis*. *Crop Protection*, 12, 357-362.
- KÖLLER W., SCHEINPFLUG H., 1987. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant Disease*, 71, 1066-1074.
- ROMERO R.A., SUTTON T.B., 1997. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology*, 87, 96-100.
- SMITH F.D., PARKER D.M., KÖLLER W., 1991. Sensitivity distribution of *Venturia inaequalis* to the sterol demethylation inhibitor flusilazole: baseline sensitivity and implication for resistance monitoring. *Phytopathology*, 81, 392-396.
- SMITH C.M., TRIVELLAS A.E., JOHNSON L.E.B., JOSHI M.M., 1991. Methods for monitoring the sensitivity of a range of fungal pathogens to benzimidazole fungicides. *EPPO Bulletin*, 21, 336-341.
- STÄHLE-CSECH U., GISI U., 1991. Determination of the sensitivity to DMI fungicides of *Cercospora beticola* on sugarbeet. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 21, 321-323.
- STANIS V.F., JONES A.L., 1985. Reduced sensitivity to sterol-inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 75, 1098-1101.