

SENSIBILITÀ DI *STEMPHYLIUM VESICARIUM*, AGENTE DELLA MACULATURA BRUNA DEL PERO, AI FUNGICIDI DICARBOSSIMIDICI E ANALOGHI DELLE STROBILURINE

G. ALBERONI, M. COLLINA, A. BRUNELLI

Centro di Fitofarmacia - Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare
Università degli Studi - Viale G. Fanin, 46, 40127 Bologna alberoni@agrsci.unibo.it

RIASSUNTO

L'analisi della sensibilità ai dicarbossimidici di 872 isolati di *Stemphylium vesicarium*, prelevati nel biennio 2004-2005 da frutti di diversi pereti della Pianura padana, ha permesso di rilevare come, fra i fenotipi a diversa sensibilità nei confronti dei dicarbossimidici precedentemente individuati, siano quelli sensibili e gli altamente resistenti al procymidone a prevalere in termini di frequenza e distribuzione spaziale. Si è inoltre seguita l'evoluzione nel tempo della resistenza notando come essa sia legata al diverso utilizzo dei dicarbossimidici nei frutteti. Attraverso l'analisi di 161 campioni isolati nel triennio 2002-2004 si è invece confermata la normale sensibilità di tale patogeno nei confronti degli analoghi delle strobilurine tramite prove *in vitro* di germinazione conidica.

Parole chiave: *Stemphylium vesicarium*, pero, difesa, dicarbossimidici, analoghi delle strobilurine

SUMMARY

***STEMPHYLIUM VESICARIUM* SENSITIVITY TO DICARBOXIMIDE AND STROBILURIN FUNGICIDES**

Pear Brown Spot, caused by *Stemphylium vesicarium* (Wall.) Simm., is the most important disease on pear in Northern Italy. It can cause consistent yield losses and its management is difficult, also because of the occurrence of resistance to dicarboximides, the main products in the control of this pathogen. In 2004-2005 a monitoring work on 872 isolates collected in Pianura Padana orchards let to evaluate frequency and spatial distribution of the three resistant phenotypes (previously identified) compared to sensitive one. Sensitive and procymidone highly resistant isolates resulted as the most widespread. Time evolution of dicarboximide resistance phenomenon according to different treatment schedules was pointed out. Therefore the introduction of new compounds such as strobilurin fungicides has been very important to support traditional preventative applications. *S. vesicarium* sensitivity to strobilurin fungicides was confirmed through the analysis of 161 isolates between 2002 and 2004.

Keywords: *Stemphylium vesicarium*, pear, control, dicarboximides, strobilurin fungicides

INTRODUZIONE

La difesa del pero dalla maculatura bruna, causata da *S. vesicarium* (Wall.) Simm., è divenuta ancora più complessa dagli inizi degli anni '90, quando è stata segnalata per la prima volta la resistenza del patogeno nei confronti dei fungicidi dicarbossimidici (Brunelli *et al.*, 1997). Un ampio lavoro di monitoraggio è stato quindi intrapreso dal Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare dell'Università di Bologna in collaborazione con alcuni enti regionali per valutare la diffusione e l'intensità di tale fenomeno nella Pianura padana. Lo studio, svolto su isolati collezionati dal 1995 al 2003 in varie province, ha

L'attività sopra riportata è stata condotta nell'ambito di programmi finanziati dalla Regione Emilia Romagna (L.R. 28/98, coordinamento del CRPV progetto "Studio della resistenza di alcuni importanti patogeni nei confronti dei fungicidi più utilizzati nella difesa delle colture") e dalla Regione Lombardia (Direzione Generale Agricoltura, Piano per la Ricerca e lo Sviluppo 2004, progetto "Studio del fenomeno della resistenza di alcuni importanti patogeni delle piante da frutto e della vite nei confronti dei fungicidi").

portato a individuare quattro fenotipi a diversa sensibilità nei confronti dei dicarbossimidici (procymidone, iprodione, vinclozolin e chlozolate): sensibili (S) che presentano valori di DE_{50} intorno all'unità; fenotipo S+ che è lievemente resistente (Fattori di Resistenza=3) nei confronti di procymidone e iprodione; fenotipo R_1 che è altamente resistente al procymidone ($FR > 100$) ma solo moderatamente resistente agli altri dicarbossimidici ($3 < FR < 100$); fenotipo R_2 che si mostra altamente resistente ($FR > 100$) nei confronti di tutti i dicarbossimidici. Tali fenotipi sono distribuiti in tutte le aree studiate anche se con diverse frequenze (Brunelli *et al.*, 2000; Alberoni *et al.*, 2005).

Si è pertanto ritenuto opportuno proseguire le indagini considerando un maggior numero di isolati soprattutto all'interno del medesimo frutteto per valutare l'eventuale coesistenza di ceppi di *S. vesicarium* a diversa sensibilità nei confronti dei dicarbossimidici. Si è, inoltre, considerata la sensibilità agli analoghi delle strobilurine, che sono stati recentemente inseriti nella difesa del pero dalla maculatura bruna (Brunelli *et al.*, 2004) e, come noto, presentano un alto rischio di resistenza come già dimostrato per svariati altri patogeni (Heaney *et al.*, 2000).

MATERIALI E METODI

Origine degli isolati

Gli isolati di *Stemphylium vesicarium* analizzati nel presente lavoro sono stati prelevati, durante le stagioni 2004 e 2005 in diverse province della Pianura padana, sia in frutteti dove erano stati segnalati problemi di contenimento sia dove la difesa si era mostrata efficace. L'isolamento è avvenuto, per ogni frutteto, su circa 15 frutti sintomatici appartenenti a diverse cultivar, principalmente Abate Fétel e Conference ma anche Decana, Kaiser e Passa Crassana. I frammenti di frutto, dopo disinfezione in ipoclorito di sodio (2%) per 1 minuto, vengono posti in piastre di Agar V8 costituito da 20% V8 (succo vegetale, Campbell's Grocery Ltd), 1,5% Agar tecnico (Agar Grade A, Becton Dickinson), 0,4% carbonato di calcio (Fluka) in acqua distillata con l'aggiunta di 50 mg/l di solfato di streptomina dopo la sterilizzazione. Le piastre vengono quindi poste a 23°C e 12 ore di fotoperiodo sotto luce fluorescente per 3 giorni e successivamente esposte a 12 ore di fotoperiodo sotto luce NUV (TL 40W/05 Philips) con spettro di emissione tra 300 e 400 nm e un picco a 365 nm per stimolare la conidificazione, in modo da facilitarne il riconoscimento. Gli isolati vengono quindi trasferiti in nuove piastre di Agar V8 per l'ottenimento di colonie pure.

Sensibilità ai dicarbossimidici

Tutti gli isolati ottenuti dal monitoraggio, per un totale di 872, sono stati sottoposti a un saggio con diverse concentrazioni discriminanti. Questo consente di individuare il fenotipo a cui appartengono gli isolati: sensibili S e resistenti S+, R_1 e R_2 . Si sono stabilite tre diverse concentrazioni discriminanti: 10 mg/l di procymidone (Sumisclex, 50% WG), 50 mg/l di dicloran (prodotto tecnico, Sigma Aldrich) e 50 mg/l di iprodione (Rovral, 50% PB). A tali concentrazioni si osserva un accrescimento nullo nel caso di isolati sensibili, mentre i resistenti S+ sono in grado di svilupparsi su dicloran, gli R_1 su dicloran e procymidone e gli R_2 su tutte le piastre trattate, anche in quella con iprodione.

I prodotti vengono aggiunti all'Agar V8 sterilizzato prelevandoli da soluzioni madri preparate in acqua per i formulati commerciali e in acetone per dicloran. Si procede quindi al riempimento di capsule Petri di 9 cm di diametro. Una volta che il substrato si è solidificato si inoculano le piastre con frammenti di micelio e dopo 3 giorni si procede al rilievo dove si valuta lo sviluppo fungino nelle diverse tesi trattate, permettendo così di identificare il fenotipo di appartenenza.

Sensibilità agli analoghi delle strobilurine

Nel caso della sensibilità agli analoghi delle strobilurine la metodologia di saggio prevede l'osservazione della germinazione conidica su piastre di Agar Acqua (1,5%) avvelenato. Le

concentrazioni di principio attivo utilizzate variano da 0,005 a 0,5 mg/l sia nel caso di kresoxim-methyl sia di trifloxystrobin. Queste concentrazioni vengono saggiate anche con l'aggiunta di 100 mg/l di SHAM (acido salicilidrossamico), in grado di inibire la respirazione alternativa. I solventi utilizzati sono l'acetone per i principi attivi tecnici kresoxim-methyl e trifloxystrobin (Sigma Aldrich), mentre metanolo per lo SHAM (Sigma Aldrich), sempre con concentrazioni inferiori all' 1% (v/v) anche nel controllo non avvelenato. Vengono quindi preparate sospensioni conidiche (circa $1,2 \times 10^5$ conidi/ml) dei vari isolati da piastre di 7 giorni dopo un periodo di 2 giorni sotto le luci NUV. Gocce di 20 µl vengono deposte nelle piastre avvelenate le quali vengono poi incubate a 23° C sotto luce fluorescente. Il rilievo della germinazione viene effettuato dopo 5 ore di contatto dei conidi con i prodotti valutando la percentuale dei germinati su un totale di 100 rispetto ad un controllo non avvelenato. La sensibilità è stata espressa attraverso la DE₅₀ ed anche la DE₉₅ ottenute tramite la regressione lineare della trasformazione in probits del grado d'azione e il logaritmo delle concentrazioni. E' stata stabilita inoltre la Concentrazione Minima Inibitoria (CMI).

RISULTATI

Sensibilità ai dicarbossimidici

Tramite i saggi con le tre concentrazioni discriminanti è stato possibile risalire al fenotipo degli 872 isolati presi in esame tra il 2004 e il 2005. La maggior parte si è dimostrata sensibile in entrambi gli anni considerati, 67,7% e 74,3% rispettivamente. Il restante è costituito da isolati resistenti, che sono però rappresentati per la maggioranza da resistenti di tipo R₁ (30% e 21,1% del totale rispettivamente per il 2004 e il 2005). Il fenotipo R₂ è stato rilevato raramente, complessivamente solo nel 2,6% dei casi ed ancora più sporadici sono i resistenti di tipo S+, rinvenuti soltanto in 6 casi su 872 (tabella 1).

Tabella 1 - Sensibilità ai dicarbossimidici degli isolati di *S. vesicarium* considerati nel biennio 2004-2005

Anno	N° di isolati considerati	Isolati sensibili		Isolati Resistenti S+		Isolati Resistenti R ₁		Isolati Resistenti R ₂	
		N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
2004	483	327	67,7	2	0,4	145	30	9	1,9
2005	389	289	74,3	4	1,0	82	21,1	14	3,6
Totale	872	616	70,7	6	0,7	227	26	23	2,6

Tabella 2 - Sensibilità ai dicarbossimidici delle popolazioni di *S. vesicarium* prelevate in frutteti considerando da 2 a 15 isolati per ogni frutteto negli anni 2004-2005

Anno	N° di frutteti considerati	Popolazioni totalmente sensibili		Popolazioni totalmente resistenti (tipo R ₁)		Popolazioni miste	
		N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
2004	97	52	53,6	16	16,5	29	29,9
2005	82	50	61,0	9	11,0	23	28,0
Totale	179	102	57	25	14	52	29

Grazie alla conoscenza del livello di sensibilità di diversi isolati prelevati per ciascun frutteto è stato possibile avere indicazioni sul tipo di popolazione presente. Dei 179 pereti presi in esame la maggioranza ha evidenziato una popolazione di *S. vesicarium* costituita interamente da individui sensibili ai dicarbossimidici, sia nel 2004 che nel 2005. Popolazioni

costituite completamente da individui resistenti sono state rinvenute nella minoranza dei casi (14% nel biennio considerato), mentre in 52 frutteti su 179 sono state individuate popolazioni miste, costituite cioè da individui a diversa sensibilità nei confronti dei dicarbossimidici. Interessante risulta anche osservare che i fenotipi resistenti di tipo S+ e R₂ sono sempre stati rinvenuti all'interno di popolazioni miste, mentre solo il resistente R₁ è stato in grado di insediarsi come unico fenotipo (tabella 2).

Tabella 3 – Sensibilità ai dicarbossimidici al primo anno di analisi e nel 2004-2005 di popolazioni di *S. vesicarium* prelevate in frutteti di riferimento. E' riportato anche il numero di trattamenti con dicarbossimidici effettuati negli anni precedenti al primo saggio e in quelli successivi fino al 2005

Frutteto	Provincia	1° anno di analisi	Sensibilità popolazione al 1° anno	trattamenti precedenti al 1° anno di analisi		trattamenti successivi al 1° anno di analisi		Sensibilità popolazione nel 2004	Sensibilità popolazione nel 2005
				N°/anno	N° anni	N°/anno	N° anni		
A	Ferrara	2001	R	9	>3	0	4	MR	S
B	Bologna	2002	R	5	>5	0	3	R	MR
C	Bologna	2002	R	4	>5	0	3	R	R
D	Ravenna	2003	R	4-12	>7	1	1	R	-
E	Ferrara	1998	S	5-6	>4	5-6	6	MS	-
F	Ferrara	1999	R	3-4	>2	0-1	5	MS	-
G	Ferrara	2000	R	3-4	>3	1	4	S	-
H	Ferrara	2000	R	3	>3	2	4	MS	-
I	Ferrara	2000	MS	3	>2	0	5	S	S
L	Ferrara	2003	S	3	>4	1	2	S	S
M	Ravenna	2003	S	2-3	>4	2-3	2	S	S

MR: popolazione mista a prevalenza di individui resistenti R: totalità di individui resistenti
MS: popolazione mista a prevalenza di individui sensibili S: totalità di individui sensibili

Tra i frutteti presi in esame nel biennio 2004 e 2005 erano presenti alcuni casi particolari, ovvero pereti monitorati già in annate precedenti con lo scopo di osservare variazioni della sensibilità nel tempo in seguito a diverse strategie di difesa adottate che prevedono o meno il ricorso ai dicarbossimidici. Come si può osservare in tabella 3, un elevato numero di trattamenti (4-12) con dicarbossimidici porta a selezionare una popolazione con un'alta frequenza di individui resistenti (caso A, B, C, D) che non riesce a tornare ad una prevalenza di individui sensibili in seguito all'interruzione dei trattamenti per 3 anni (casi A, B, C) o ad una loro riduzione (caso D). D'altra parte si è potuto osservare che 5-6 trattamenti, effettuati per un lungo periodo, conducono in un caso (E) alla comparsa di isolati resistenti anche se all'interno di una popolazione a prevalenza sensibile. Stesso comportamento si osserva per un uso più ridotto dei dicarbossimidici (casi F, G, H, I), dove si giunge a selezionare, con un contenuto uso di tali prodotti individui resistenti, con una bassa frequenza. In questo caso un'interruzione o una riduzione dei trattamenti porta anche al ripristino di una completa sensibilità (caso G, I). Esistono d'altra parte situazioni (casi L, M) nelle quali in seguito all'utilizzo di 2-3 trattamenti con dicarbossimidici per stagione si sia mantenuta per 6 anni una condizione di completa sensibilità.

Sensibilità agli analoghi delle strobilurine

L'analisi della sensibilità agli analoghi delle strobilurine è stata realizzata inizialmente su 24 popolazioni presenti in collezione e risalenti agli anni 1993-1997, ovvero a prima dell'introduzione di tali principi attivi in Italia su pero. In questo modo si è valutata la naturale sensibilità di *S. vesicarium*, prima che iniziassero processi di selezione esercitati dai prodotti. I valori di DE₅₀ nei confronti di kresoxim-methyl si sono mostrati compresi tra 0,01 e 0,03 mg/l, quelli di DE₉₅ tra 0,04 e 0,12 mg/l mentre la CMI si è sempre mantenuta sotto 0,5 mg/l (tabella 4). L'analisi di un più ampio numero di isolati (161) prelevati tra il 2002 e il 2004 in aziende sia dove gli analoghi delle strobilurine erano stati introdotti nella difesa del pero, sia dove ancora non erano mai stati impiegati, ha mostrato livelli di sensibilità non molto diversi da quelli osservati prima del 1998. La DE₅₀ nei confronti di kresoxim-methyl risulta infatti compresa tra 0,006-0,06 mg/l, così come la DE₉₅ tra 0,03 e 0,33 mg/l. Anche in questo caso la CMI si è mantenuta inferiore a 0,5 mg/l. Nelle annate 2003 e 2004 l'analisi della sensibilità è stata estesa anche ad un'altro analogo delle strobilurine impiegato nella difesa del pero dalla maculatura bruna, il trifloxystrobin. Anche in questo caso complessivamente i valori non si discostano da quanto già osservato per kresoxim-methyl, la DE₅₀ è compresa tra 0,005 e 0,06 mg/l, la DE₉₅ tra 0,03 e 0,17 e la CMI sempre inferiore a 0,5 mg/l (tabella 4).

Tabella 4 - Sensibilità alle strobilurine kresoxim-methyl e trifloxystrobin di popolazioni di *S. vesicarium* prelevate prima dell'introduzione in campo di tali fungicidi (1993-1997) e di popolazioni raccolte nel triennio 2002-2004

Anno	N° di isolati considerati	kresoxim-methyl			trifloxystrobin		
		DE ₅₀	DE ₉₅	CMI	DE ₅₀	DE ₉₅	CMI
1993/1997	24	0,01-0,03	0,04-0,12	< 0,5	-	-	-
2002	64	0,006-0,06	0,03-0,15	< 0,5	-	-	-
2003	53	0,02-0,06	0,06-0,33	< 0,5	0,01-0,06	0,05-0,17	< 0,5
2004	44	0,009-0,06	0,04-0,14	< 0,5	0,005-0,06	0,03-0,14	< 0,5
Totale 2002/2004	161	0,006-0,06	0,03-0,33	< 0,5	0,005-0,06	0,03-0,17	< 0,5

I valori di DE₅₀, DE₉₅ e CMI sono espressi in mg/l

CONCLUSIONI

Nel biennio di analisi 2004-2005 i quattro fenotipi di *S. vesicarium* a diversa sensibilità nei confronti dei dicarbossimidici, precedentemente identificati attraverso una pluriennale indagine su un ampio territorio (Alberoni *et al.*, 2005), sono apparsi omogeneamente distribuiti nelle aree esaminate seppure con una frequenza reciproca molto diversa. La maggioranza degli isolati è risultata appartenere alla categoria dei sensibili (S). Il fenotipo resistente più diffuso è costituito da quello R₁, che si mostra altamente resistente nei confronti di procymidone ma solo mediamente resistente nei confronti degli altri dicarbossimidici. In questi casi vengono segnalate in campo consistenti cali di efficacia in seguito all'uso di procymidone. Molto rari sono gli isolati del fenotipo R₂ che presentano un'elevata resistenza nei confronti di tutti i dicarbossimidici. Ancora più sporadica è stata l'individuazione del fenotipo S+, che si mostra lievemente resistente nei confronti sia di procymidone che di iprodione. Si può quindi osservare che la selezione esercitata da questi fungicidi fa prevalere individui altamente resistenti al procymidone e mediamente resistenti agli altri dicarbossimidici (tipo R₁), probabilmente in seguito al preponderante uso in campo di procymidone rispetto ad iprodione. Si è potuto inoltre constatare che questo fenotipo può arrivare a predominare completamente in una popolazione all'interno di un frutteto, mentre gli

altri fenotipi resistenti sono sempre stati rinvenuti in popolazioni miste, dove cioè erano presenti isolati sensibili o di altre categorie resistenti. Da studi realizzati per valutare la diversa fitness di tale fenotipi è emerso che in effetti i fenotipi resistenti non presentano delle penalizzazioni ma continuano ad essere competitivi come quelli sensibili (Alberoni *et al.*, 2006).

La maggior percentuale di popolazioni miste rispetto a popolazioni costituite interamente da individui resistenti porta a supporre che nei frutteti sia probabilmente necessaria una massiccia e prolungata pressione selettiva esercitata dai dicarbossimidici per far scomparire il fenotipo sensibile. La comparsa di fenotipi resistenti, invece può avvenire in seguito all'utilizzo anche moderato ma costante di tali prodotti, in questo caso però la maggior prevalenza di individui sensibili riesce, anche in breve tempo, a riportare una situazione di completa sensibilità in seguito alla sospensione dei trattamenti. La grande variabilità di anni necessari per un ritorno alla sensibilità, che è stata osservata nei vari pereti, è quindi da imputarsi sia a differenze pedoclimatiche e agronomiche dei frutteti sia al diverso grado di selezione di individui resistenti a cui si è giunti in seguito alla più o meno intensa pressione selettiva esercitata dai dicarbossimidici.

Alla luce di questi risultati, per contenere il fenomeno della resistenza di *S. vesicarium* ai dicarbossimidici si consiglia di ricorrere all'utilizzo di tali prodotti seguendo le normali precauzioni antiresistenza ed in particolare di ridurre il numero dei trattamenti concentrandoli nei periodi di maggior rischio lasciando lunghi periodi dove essi non vengono applicati. Nel caso in cui invece sia stata rilevata la presenza della resistenza bisogna interrompere l'utilizzo di tali prodotti mantenendo monitorata la popolazione per individuare il ritorno ad una situazione di sensibilità. Diventa quindi importante la disponibilità di un'ampia gamma di principi attivi ad azione diversa in modo da minimizzare il rischio di resistenza di *S. vesicarium* nei confronti dei fungicidi, visto l'elevato numero di trattamenti che richiede il suo contenimento. Interessante risulta il persistere della sensibilità nei confronti degli analoghi delle strobilurine a otto anni dalla loro introduzione nella difesa del pero contro la maculatura bruna. I valori di sensibilità di *S. vesicarium* nei confronti sia di kresoxim-methyl che di trifloxystrobin si mantengono bassi e relativamente uniformi, confrontabili con quelli ottenuti su popolazioni prelevate prima dell'introduzione di tali prodotti in campo. Non sono inoltre riscontrabili differenze tra i due principi attivi.

LAVORI CITATI

- Alberoni G., Collina M., Pancaldi D., Brunelli A., 2005. Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology* 113: 211-219.
- Alberoni G., Collina M., Brunelli A., 2006. Biological characteristics of dicarboximides resistant isolates of *Stemphylium vesicarium* from Italian pear orchards. *Bulletin OEPP/EPPPO Bulletin*. In stampa.
- Brunelli A., Gherardi I., Adani N. 1997. Ridotta sensibilità di *Stemphylium vesicarium*, agente della maculatura bruna del pero, ai fungicidi dicarbossimidici. *Informatore Fitopatologico* 47: 44-48.
- Brunelli A., Gherardi I., Collina M., Adani N., 2000. Resistenza di *Stemphylium vesicarium* (agente della maculatura bruna del pero) al procymidone. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 53-54.
- Heaney S.P., Hall A.A., Davies S.A., Olaya G. 2000. Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. *Proceedings Brighthon Crop Protection Conference Pests and Diseases*. BCPC, Farnham, Surrey, UK pp. 755-762.