

INDAGINI SULLA PRESENZA DI CEPPI DI *PLASMOPARA VITICOLA* RESISTENTI AI FUNGICIDI QoI IN VIGNETI DELL'ITALIA SETTENTRIONALE

S.L. TOFFOLATTI¹, M. PRANDATO¹, L. SERRATI², A. VERCESI¹

¹ Istituto di Patologia Vegetale - Via Caloria, 2, 20133 Milano

² Development & Technical Support - Syngenta Crop Protection SpA

Via Gallarate 139, 20151 Milano

silvia.toffolatti@unimi.it

RIASSUNTO

Le percentuali di oospore di *Plasmopara viticola* resistenti ai fungicidi QoI (POR) e di alleli presentanti la mutazione G143A (PAM), determinata su popolazioni di strutture svernanti del patogeno raccolte in Italia settentrionale in vigneti mai o ripetutamente trattati con tali fungicidi e in appezzamenti nei quali l'applicazione di QoI è stata sospesa a causa dell'elevato livello di resistenza riscontrato, sono risultate simili tra di loro. Le POR e le PAM dei campioni prelevati dai vigneti mai trattati si sono attestate su valori variabili tra lo 0,2 ed il 20 %. La sospensione dei trattamenti con QoI ha determinato il rapido decremento di POR e PAM a livelli del tutto simili a quelli rilevati nelle popolazioni provenienti da vigneti mai trattati. I numerosi interventi preventivi effettuati ogni stagione da almeno cinque anni in due vigneti siti in Piemonte e Lombardia non hanno determinato alcun incremento significativo di POR e PAM.

Parole chiave: *Plasmopara viticola*, QoI, resistenza, oospore

SUMMARY

INVESTIGATIONS ON THE *PLASMOPARA VITICOLA* STRAINS RESISTANT TO QoIs IN NORTHERN ITALY

The percentages of oospores of *Plasmopara viticola* resistant to QoI fungicides (ROP) and of alleles containing the G143A mutation (MAP), assessed on oospore populations collected in Northern Italy either in vineyards never or repeatedly treated with QoI or in vineyards where QoI application was suspended because of the high resistance level, were statistically similar. POR and PAM observed in samples collected in untreated vineyards varied from 0.2 and 20 %. Suspension of QoI treatments caused the rapid decrease of both parameters: their values were similar to those assessed in the untreated vineyards. The numerous preventative treatments carried out every year in two vineyards located in Piedmont and Lombardy did not induce any significant increase in POR and PAM.

Keywords: *Plasmopara viticola*, QoI, resistance, oospores

INTRODUZIONE

La disponibilità di sostanze attive dotate di diverso meccanismo d'azione e localizzazione su/nell'ospite è di notevole aiuto nell'impostazione di una corretta strategia antiperonosporica in vigneto. In quest'ambito, particolare attenzione deve essere posta nell'utilizzo di sostanze attive dotate di meccanismo d'azione uni o oligosito che possono esercitare una pressione di selezione sulla popolazione di *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et De Toni, con la conseguente diffusione preferenziale di ceppi resistenti del patogeno (Kuch e Gisi, 2007). L'introduzione, a partire dalla seconda metà degli anni 90, dei fungicidi QoI (Qo Inhibitor) che inibiscono la respirazione mitocondriale legandosi al sito di ossidazione Qo (quinone outside) del citocromo b, appartenente al complesso enzimatico bc₁, ha permesso di inserire tra i fungicidi antiperonosporici sostanze attive dotate di un meccanismo d'azione innovativo e

di elevata efficacia (Bartlett *et al.*, 2002). Nel giro di pochi anni, a causa di strategie di intervento poco opportune e dell'uso talvolta sconsiderato di tali fungicidi applicati ripetutamente in vigneto nel corso della stessa stagione vegetativa, è stata segnalata la presenza di ceppi resistenti di *P. viticola* in vigneto dapprima in Francia ed in seguito in Italia ed in particolare in Emilia Romagna (Brunelli *et al.*, 2002; Collina *et al.*, 2005). In *P. viticola* la resistenza ai fungicidi QoI è determinata principalmente da una mutazione puntiforme nel gene che codifica per il citocromo b a livello del codone 143. L'identificazione di tale mutazione che comporta la sostituzione di una glicina con un'alanina (G143A) ha consentito di mettere a punto di metodi molecolari per la quantificazione degli alleli mutati nell'ambito delle popolazioni del patogeno, solitamente abbinati a metodi biologici (Gisi *et al.*, 2002). La caratterizzazione delle popolazioni di *P. viticola*, effettuata con entrambe le metodologie sia sugli sporangi sia sulle oospore di *P. viticola*, ha evidenziato la presenza di livelli di resistenza variabili in funzione del numero dei trattamenti eseguiti e dei formulati utilizzati (Collina *et al.*, 2006; Toffolatti *et al.*, 2007a, 2007b).

Scopo di questa indagine è stato quello di valutare l'evoluzione temporale della frequenza di individui resistenti e alleli mutati nelle popolazioni di oospore di *P. viticola* differenziate in vigneti dell'Italia settentrionale nei quali le applicazioni di fungicidi QoI sono state sospese in tempi successivi e in appezzamenti mai o ripetutamente trattati con tali formulati.

MATERIALI E METODI

Raccolta e trattamento dei campioni di foglie infette

Nell'ottobre 2005 e 2006 campioni di foglie mostranti i tipici sintomi di peronospora a mosaico sono stati raccolti in diversi vigneti dell'Italia settentrionale. Le caratteristiche di tali vigneti ed il numero dei trattamenti effettuati con fungicidi QoI sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Localizzazione dei vigneti sottoposti a campionamento, cv, numero dei trattamenti effettuati con fungicidi QoI, incidenza della malattia e sigla del corrispondente campione

Sito	Varietà	Numero trattamenti con QoI	Incidenza della malattia	Sigla
2005 e 2006				
Calosso (AT)	Chardonnay	5 per anno dal 1997	elevata	CA
Due Carrare (PD)	Merlot	Non trattato	moderata	MS
Lavezzola (RA)	Trebbiano	Non trattato	moderata	LAV
Cotignola (RA)	Trebbiano	Non trattato dal 2001	moderata	SG
Cotignola (RA)	Trebbiano	Non trattato dal 2002	moderata	SGT
Cotignola (RA)	Trebbiano	Non trattato dal 2002	moderata	4P
Cotignola (RA)	Trebbiano	Non trattato dal 2003	moderata	4PT
2005				
Zenevredo (PV)	Barbera	3	elevata	ZE
Sona (VR)	Corvina	Non trattato	ridotta	MT
Lavezzola (RA)	Trebbiano	QoI 1998-2000: in miscela con folpet 2001-2004	moderata	LAVT
2006				
S. Maria Versa (PV)	Pinot grigio	Non trattato	ridotta	BE
Fiorenza (SO)	Nebbiolo	2 per anno dal 1999	elevata	SO
Soave (VR)	Corvina	Non trattato	ridotta	CO

I campioni LAV e LAVT sono stati raccolti a Lavezzola (RA) in uno stesso vigneto sperimentale nel quale venivano effettuate prove sperimentali parcellari, rispettivamente dalla parcella non trattata e dalla parcella sottoposta dal 1996 al 2001 a 3 trattamenti annuali con fungicidi QoI.

Le foglie raccolte in ogni appezzamento sono state esaminate al microscopio allo scopo di individuare le aree a maggior concentrazione di oospore. Per ogni sito sottoposto a prelievo sono stati allestiti 4 campioni, ognuno dei quali costituito da 50 frammenti fogliari contenenti numerose oospore, posti in sacchetti di nylon con pori del diametro di 100 µm. I campioni sono stati posti a svernare per tre mesi in condizioni controllate, a 5°C, su substrato sabbioso mantenuto costantemente umettato.

Saggi di germinazione delle oospore di *P. viticola*

Trascorso il periodo di svernamento, i frammenti fogliari sono stati sospesi in pochi ml di acqua distillata sterile e finemente sminuzzati in potter di vetro allo scopo di isolare le oospore di *P. viticola*. La sospensione è stata sottoposta a due filtrazioni successive, attraverso filtri con pori del diametro di 100 e 45 µm. Le oospore sono state quindi inoculate su agar acqua contenente l'1 % di Agar Noble, Difco e su agar acqua addizionato di azoxystrobin alla concentrazione di 10 mg/l. Per ogni campione e per entrambi i terreni considerati sono state prese in considerazione tre ripetizioni costituite da 400 oospore ciascuna.

Le oospore sono state incubate al buio a 20 °C ed esaminate giornalmente per 14 giorni allo scopo di individuare le oospore germinate. Per ogni ripetizione di ciascun campione è stata calcolata la percentuale di germinazione su agar acqua (G), la percentuale di germinazione su agar acqua addizionato con azoxystrobin (Gaz) e la percentuale di oospore resistenti (POR). Dai valori di tali parametri calcolati per ciascuna ripetizione dei 4 campioni analizzati sono stati ricavati i valori medi di G, Gaz e POR relativi ad ogni sito di campionamento.

Valutazione della percentuale di alleli mutati

Dalle oospore contenute nella sospensione ricavata da ciascun campione è stato estratto il DNA secondo la procedura messa a punto da Toffolatti *et al.* (2007a). L'individuazione e la quantificazione degli alleli caratterizzati dalla mutazione G143A è stata effettuata mediante l'utilizzo di primer specifici per gli alleli mutati e wild type in Real Time-PCR (Sierotzki *et al.*, 2005). Per ogni sito è stata calcolata la percentuale media degli alleli mutati, PAM.

Analisi statistica

Le percentuali di oospore resistenti POR e di alleli mutati PAM, sono stati sottoposti all'analisi della varianza ed al test di Tukey per l'individuazione delle differenze significative fra i risultati ottenuti mediante l'applicazione delle due metodologie di monitoraggio.

RISULTATI

Le oospore di *P. viticola* isolate dai campioni raccolti nel 2005 e svernate in condizioni controllate di temperatura e disponibilità idrica, hanno mostrato, come riportato in tabella 2, valori medi di G simili tra di loro, ad eccezione di quelle differenziate nei vigneti SG e SGT, la cui germinabilità è risultata maggiore rispetto a quella delle strutture sessuate del patogeno ritrovate nelle altre località. Le Gaz di minore entità sono apparse associate ai due vigneti che non sono mai stati trattati con QoI, siti a Sona (VR) e a Due Carrare (PD). Analoghi valori di POR sono stati rilevati nei campioni di oospore raccolti nei vigneti di Calosso (trattato per cinque volte ogni stagione dal 1997 con tali fungicidi) e di Zenevredo (PV), in cui nel corso del 2005 sono stati effettuati tre interventi con QoI, ed in appezzamenti nei quali la distribuzione di tali sostanze attive è stata sospesa tra il 2001 ed il 2003. Le POR di maggiore entità sono state riscontrate nei campioni raccolti a Lavezzola. Le PAM sono risultate analoghe alle POR: solo nel caso del campione 4PT la PAM è stata decisamente superiore alla

POR. In nessun sito sono state individuate differenze statisticamente significative tra i valori di POR e di PAM.

Tabella 2. Percentuale di germinazione su agar acqua (G), su agar acqua addizionato con azoxystrobin (Gaz) e valori percentuali di oospore resistenti (POR) e di alleli mutati (PAM) delle oospore di *P. viticola* differenziate nel 2005

Località	Sigla	G	Gaz	POR	PAM
Calosso (AT)	CA	6,68	0,74	11	11,4
Zenevredo (PV)	ZE	9,63	1,08	11	10,4
Sona (VR)	CO	8,68	0,02	0,2	0,5
Due Carrare (PD)	MS	8,04	0,43	5	8,4
Lavezzola (RA)	LAV	5,29	1,2	23	26,1
Lavezzola (RA)	LAVT	6,6	1,47	37	31
Cotignola (RA)	SG	13,01	2,15	17	17
Cotignola (RA)	SGT	16,45	2,2	13	24,6
Cotignola (RA)	4P	6,28	1,19	19	18
Cotignola (RA)	4PT	8,99	1,34	15	26,6

I valori di G relativi alle oospore differenziate nel 2006 sono stati inferiori a quelli rilevati nel corso dell'annata precedente (tabella 3): solo le oospore raccolte a Calosso (AT) non hanno mostrato alcuna variazione nella germinabilità. Valori molto contenuti di POR hanno caratterizzato le oospore provenienti dai due vigneti dove non si è mai fatto ricorso ai fungicidi QoI, Santa Maria della Versa (PV), Soave (VR) e Due Carrare (PD). A Fiorenza (SO), a seguito dell'applicazione di tre trattamenti con formulati contenenti QoI, è stata rilevata una POR pari al 32 %. POR piuttosto contenute, comprese tra il 7 ed il 19 %, sono state evidenziate per i campioni raccolti in provincia di Ravenna.

Tabella 3. Percentuale di germinazione su agar acqua (G), su agar acqua addizionato con azoxystrobin (Gaz) e valori percentuali di oospore resistenti (POR) e di alleli mutati (PAM) delle oospore di *P. viticola* differenziate nel 2006

Località	Sigla	G	Gaz	POR	PAM
Calosso (AT)	CA	6,19	0	0	0,5
S. Maria Versa (PV)	BE	2,27	0,02	0,9	3,5
Fiorenza (SO)	SO	3,15	1,1	32	35,6
Soave (VR)	CO	1,51	0,08	5	20
Due Carrare (PD)	MS	5,11	0,41	8	11,1
Lavezzola (RA)	LAV	2,87	0,43	15	35,5
Cotignola (RA)	SG	4,11	0,79	19	24,1
Cotignola (RA)	SGT	3,36	0,24	7	14,5
Cotignola (RA)	4P	1,05	0,2	19	26,9
Cotignola (RA)	4PT	2,58	0,2	8	17,9

Per contro nessuna oospora resistente è stata riscontrata nei campioni provenienti dal vigneto di Calosso (AT), trattato cinque volte all'anno con fungicidi contenenti QoI. I valori di PAM sono nelle maggior parte dei casi simili a quelli assunti da POR: solo nei campioni CO, LAV e 4PT si è registrato una PAM nettamente superiore a POR. Anche in questo secondo anno di indagini i valori di POR e di PAM non sono risultati significativamente diversi tra di loro.

CONCLUSIONI

La determinazione delle percentuali di individui resistenti e di alleli mutati nelle popolazioni di oospore di *P. viticola* consente di acquisire informazioni sull'inoculo svernante che possono essere utilizzate per definire più oculatamente la strategia antiperonosporica da applicare in vigneto nella stagione successiva. Il riscontro di elevate percentuali di oospore resistenti e di alleli mutati comporta infatti la scelta di intervenire con sostanze a diverso meccanismo d'azione rispetto ai QoI o di applicare QoI in miscela con fungicidi multisito di superficie. Ciò si è reso necessario nei vigneti dell'Emilia Romagna siti a Cotignola (RA), nei quali alla fine della stagione precedente la sospensione dei fungicidi QoI sia sulla porzione non trattata sia sulla quella trattata sono state rilevate percentuali di oospore resistenti e di alleli mutati variabili tra il 70 ed il 100 % (Toffolatti *et al.*, 2007a). La mancata distribuzione di fungicidi QoI ha determinato una progressiva riduzione del livello di resistenza, avvenuta peraltro più rapidamente nel vigneto SG e SGT rispetto a quanto riscontrato nel vigneto 4P. Nel vigneto di Lavezzola, l'entità della resistenza si è mantenuta nel tempo su valori abbastanza contenuti e pressoché stabili dal 2004 in avanti.

Nei vigneti mai sottoposti ad alcuna applicazione di fungicidi QoI, la percentuale di oospore resistenti ed alleli mutati è generalmente ridotta: in un solo caso, relativo al campione prelevato a Sona (VR), il valore relativo agli alleli mutati è risultato pari al 20 %. Per contro, in due dei vigneti trattati con QoI, siti a Calosso (AT) e Zenevredo (PV), il livello di resistenza è del tutto analogo a quello riscontrato nei vigneti non trattati. Tale risultato è particolarmente significativo a Calosso (AT) dove fungicidi QoI vengono distribuiti in un elevato numero di trattamenti per anno da quasi un decennio. Le POR e la PAM rilevati a Calosso (AT) sono del tutto analoghe a quelle individuate a Fiorenza (SO) nel vigneto di cv Nebbiolo, sottoposto anch'esso ad applicazione di QoI dal 1999.

I risultati ottenuti fanno ritenere che ceppi di *P. viticola* resistenti ai QoI siano presenti nelle popolazioni del patogeno mai sottoposte a pressione di selezione e che la percentuale di tali ceppi sia variabile a seconda delle località considerate, ma rappresenti una parte minoritaria sulla totalità degli individui che caratterizzano un dato areale. La pressione di selezione determinatasi a seguito dell'applicazione di trattamenti a base di QoI può avere esiti decisamente diversi: è possibile infatti che in alcuni casi i ceppi resistenti diventino la stragrande maggioranza della popolazione del patogeno e che, in altri contesti, nonostante l'uso ripetuto sia nel corso della stessa stagione sia in anni successivi di tali sostanze attive, l'incidenza percentuale degli individui resistenti rimanga sostanzialmente invariata. In questi ultimi casi, i fungicidi QoI sono stati utilizzati con finalità preventive, evitandone l'impiego nella parte iniziale e finale della stagione vegetativa della vite e soprattutto in presenza di macchie d'olio ormai sporulate. Il rapido incremento del livello di resistenza a QoI, che nel corso di un'unica stagione ha riguardato il 100 % della popolazione di *P. viticola*, è stato in numerosi casi osservato a seguito di ripetuti interventi effettuati quando ormai la peronospora era presente in vigneto e esercitando quindi una pressione di selezione molto spiccata. Per contro, nei vigneti nei quali è stata sospesa l'applicazione dei QoI, epidemie di notevole

gravità sono associate ad un'altrettanto rapida contrazione di POR e PAM, probabilmente a causa della ridotta competitività dei ceppi resistenti (Genet *et al.*, 2006).

I valori di POR e PAM sono risultati statisticamente analoghi: pertanto la maggior consistenza di PAM rispetto al corrispondente valore di POR non è significativa ed entrambi i saggi possono essere indifferentemente utilizzati per stimare correttamente il livello di resistenza di *P. viticola* in vigneto.

In conclusione, i dati relativi a POR e PAM concernenti diversi siti dell'Italia settentrionale dimostrano che la resistenza ai QoI è presente a livelli contenuti sia in vigneti nei quali i trattamenti con tali fungicidi non vengono applicati da almeno 2 anni, sia negli appezzamenti o non trattati o trattati con criteri esclusivamente preventivi ed indicano nella sospensione dei trattamenti un mezzo abbastanza rapido per il ripristino della sensibilità ai QoI nelle popolazioni di *P. viticola*.

LAVORI CITATI

- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobranski B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.*, 58, 649-662.
- Brunelli A., Collina M., Guerrini P., Gianati P., 2002. Ridotta sensibilità di *Plasmopara viticola* ai fungicidi QoI in Emilia Romagna. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 279-288.
- Collina M., Landi L., Branzanti M.B., Brunelli A., 2006. Sensitivity of *Plasmopara viticola* Italian populations to QoI fungicides. *Proceedings 5th International Workshop on grapevine downy and powdery mildew*, (ed. by Pertot I., Gessler C., Gadoury, Gubler W., Kassemayer H.-H., Magarey), 97-98.
- Collina M., Landi L., Guerrini P., Branzanti M.B., Brunelli A., 2005. QoI resistance of *Plasmopara viticola* in Italy: biological and quantitative Real-Time PCR approaches. *In: Modern fungicides and antifungal compounds IV*, (ed. by Dehne H.W, Gisi U., Kuck K.H., Russel P.E., Lyr H.), BCPC, 81-88.
- Genet J. L., Jaworska G., Deparis F., 2006. Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pest Manag. Sci.*, 62, 188-194.
- Gisi U., Sierotzki H., Cook A., McCaffery A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to QoI inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.*, 58, 859-867.
- Kuch K.H., Gisi U., 2007. FRAC mode of action classification and resistance risk of fungicides. *In: Modern crop protection compounds*, vol. 2, (ed. by Krämer W., Schirmer U.), 415-432.
- Sierotzki H., Kraus N., Assemat P., Stanger C., Cleere S., Windass J., Gisi U., 2005. Evolution of resistance to QoI fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Europe. *In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*, (ed. by Dehne H.W, Gisi U., Kuck K.H., Russel P.E., Lyr H.), BCPC, 73-80.
- Toffolatti S.L., Serrati L., Sierotzki H., Gisi U., Vercesi A., 2007a. Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Manag. Sci.*, 63, 194-201.
- Toffolatti S.L., Prandato M., Serrati L., Sierotzki H., Gisi U., Vercesi A., 2007b. Monitoring QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospore populations. *In: Modern fungicides and antifungal compounds V*, in press.