

## **SENSIBILITÀ DI *STEMPHYLIUM VESICARIUM*, AGENTE DELLA MACULATURA BRUNA DEL PERO, A BOSCALID**

G. ALBERONI, D. CAVALLINI\*, A. CIRIANI, M. BANORRI,  
M. COLLINA, A. BRUNELLI

Centro di Fitofarmacia - Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare  
Università di Bologna - V.le G. Fanin, 46, 40127, Bologna  
mcollina@agrsci.unibo.it

### **RIASSUNTO**

Boscalid è stato recentemente registrato (luglio 2006) in Italia su pero per la difesa dalla maculatura bruna (*Stemphylium vesicarium*). Visto l'elevato numero di trattamenti necessari per il contenimento di questa malattia, dalla fioritura alla raccolta, l'introduzione di nuovi prodotti a diverso meccanismo d'azione risulta molto interessante, soprattutto nei casi di accertata resistenza a dicarbossimidici e strobilurine, che sono, insieme ai ditiocarbammati, i prodotti chiave nella difesa dalla maculatura. In questo lavoro si è valutata la sensibilità a boscalid di 232 isolati di *S. vesicarium*, raccolti nelle principali aree pericole della Pianura Padana dal 2007 al 2009, evidenziando come non vi siano variazioni rispetto alla sensibilità naturale (baseline) anche in frutteti dove questo prodotto è stato utilizzato da più di tre anni cioè subito dopo la sua registrazione in Italia. Non si osservano differenze nella sensibilità a boscalid anche in isolati resistenti a dicarbossimidici e strobilurine, confermando in questi casi l'attività di questo prodotto a diverso meccanismo d'azione.

**Parole chiave:** *Stemphylium vesicarium*, maculatura bruna, pero, boscalid, sensibilità

### **SUMMARY**

#### **SENSITIVITY TO BOSCALID OF *STEMPHYLIUM VESICARIUM* ISOLATES COLLECTED IN ITALIAN PEAR ORCHARDS**

Boscalid was recently (July 2006) introduced in pear brown spot control. This disease, caused by *Stemphylium vesicarium*, requires many treatments from petal fall to fruit ripening, thus new compounds with different mechanisms of action are welcome, especially when dicarboximide and/or strobilurin resistance occurred. This study showed that boscalid sensitivity of 232 *S. vesicarium* isolates was still comparable with baseline values even after 3 years of its use in the field. No differences were observed also in isolates resistant to dicarboximides and strobilurins, confirming the activity of boscalid, which has a different mechanism of action

**Keywords:** *Stemphylium vesicarium*, pear brown spot, boscalid, sensitivity

### **INTRODUZIONE**

Nel luglio 2006 è stato registrato in Italia per l'impiego contro la maculatura bruna del pero un nuovo principio attivo, il boscalid, sia da solo (Cantus) che in miscela con pyraclostrobin (Bellis). Questo prodotto, appartenente alla famiglia delle carbosammidi, presenta un meccanismo d'azione diverso dagli altri prodotti autorizzati su pero. In particolare esso agisce bloccando la catena respiratoria a livello del complesso II agendo sull'enzima succinato-deidrogenasi (Stammler *et al.*, 2007). Tale aspetto risulta molto interessante nella difesa da *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simm., l'agente causale della maculatura bruna del pero, che

---

\* già collaboratore presso il Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare

richiede un elevato numero di trattamenti dalla fioritura alla raccolta (Ponti *et al.*, 1996; Brunelli *et al.*, 2004), e può presentare problemi di controllo legati all'insorgenza di fenomeni di resistenza ai fungicidi. In particolare le famiglie di fungicidi interessate sono i dicarbossimidici e le strobilurine. Per quanto riguarda i primi la resistenza (Brunelli *et al.*, 1997), ormai ampiamente diffusa e accompagnata da gravi perdite di produzione in campo, si è mostrata parzialmente incrociata all'interno della famiglia con 3 fenotipi resistenti: S+ lievemente resistenti a procymidone e iprodione, R1 altamente resistenti a procymidone e mediamente resistenti a iprodione e R2 altamente resistenti ad entrambi i principi attivi (Alberoni *et al.*, 2005). In particolare per il raro fenotipo R2 è stata osservata anche resistenza incrociata a fludioxonil (Alberoni *et al.*, 2008), come riportato anche in altri patogeni. Nel caso delle strobilurine i primi isolati di *S. vesicarium* con una resistenza di grado elevato sono comparsi nel 2006 accompagnati da una notevole perdita di efficacia in campo (Collina *et al.*, 2007). Negli anni successivi le segnalazioni di isolati resistenti all'interno delle popolazioni presenti nei frutteti sono andate aumentando, fortunatamente però solo raramente esse erano ricollegabili a riduzioni di contenimento in campo (Alberoni *et al.*, 2009).

Alla luce di questi fenomeni risulta quindi importante conoscere la sensibilità di *S. vesicarium* nei confronti di nuovi principi attivi che possono sostituire quelli per i quali si è osservata una riduzione di sensibilità ed essere utilizzati nelle strategie antiresistenza. Questo lavoro ha avuto appunto lo scopo di valutare la sensibilità di questo patogeno nei confronti di boscalid, e di seguire la sua evoluzione nel tempo in funzione dell'inserimento o meno nei programmi d'intervento e dell'eventuale presenza di resistenza incrociata con altre famiglie di fungicidi.

## MATERIALI E METODI

### Origine degli isolati

Per avere un quadro della sensibilità di *S. vesicarium* a boscalid sono stati presi in esame numerosi isolati ottenuti da campioni prelevati nelle principali province produttrici di pere della Pianura Padana (Bologna, Ravenna, Modena, Mantova, Ferrara, Rovigo), da diverse cultivar, principalmente Abate Fétel e Conference, che sono le più coltivate, ma anche Decana, Kaiser, S. Maria e Passa Crassana. In particolare sono stati considerati 67 isolati prelevati nel 2007, 85 nel 2008 e 80 nel 2009 provenienti da frutteti sia dove il boscalid era inserito nel calendario trattamenti, sia dove non lo era.

Gli isolamenti sono stati realizzati su 15-20 frutti sintomatici per ogni frutteto, disinfettando frammenti di frutto, prelevati al limite delle tacche necrotiche, in ipoclorito di sodio (2%) per 1 minuto e ponendoli poi 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, dopo la sterilizzazione, di 50 mg/L di solfato di streptomycin. Le colonie sono state quindi incubate a 23 °C e 12 ore di fotoperiodo sotto luce fluorescente per 3 giorni. Per stimolare la conidificazione in modo da facilitare il riconoscimento, le colonie sono state successivamente esposte per due giorni a 12 ore di fotoperiodo sotto luce NUV. Per ottenere in purezza gli isolati, questi vengono quindi trasferiti in nuove piastre di Agar V8.

### Saggi di sensibilità *in vitro*

Le prove di sensibilità al boscalid sono state realizzate osservando l'inibizione dell'accrescimento miceliare. Sono state preparate piastre Petri con 20 ml di YBA (10 g estratto di lievito, 10 g bacto peptone, 20 g acetato di sodio, 15 g agar in 1 L dH<sub>2</sub>O) contenente

diverse concentrazioni di boscalid (0-0,05-0,5-1-2,5-5 mg/L). Tali concentrazioni sono state ottenute preparando soluzioni madri del principio attivo puro (Sigma-Aldrich) in acetone. La percentuale finale del solvente nel substrato è di 0,1%, pertanto priva di effetto sul patogeno. Le piastre sono state quindi inoculate con dischetti di micelio di 5 mm di diametro prelevati dal margine di colonie di *S. vesicarium* fatte crescere per 7 giorni su Agar V8 in condizioni ottimali. Sono state effettuate 3 ripetizioni per ogni concentrazione per ogni isolato. Dopo 3 giorni di incubazione a 23 °C e 12 ore di fotoperiodo sotto luce fluorescente, i due diametri ortogonali di ogni colonia sono stati misurati e mediati. I valori di DE<sub>50</sub> (Dose Efficace 50: concentrazione che riduce del 50% l'accrescimento miceliare fungino rispetto ad un testimone non trattato) sono stati valutati considerando la regressione lineare tra il logaritmo delle concentrazioni e la trasformazione in probit dei rispettivi gradi d'azione.

### **Prove di resistenza incrociata**

La sensibilità nei confronti dei dicarbossimidici è stata valutata tramite l'osservazione della crescita miceliare su V8 alle concentrazioni discriminanti di 10 mg/L di procymidone (che permette di distinguere gli isolati sensibili da quelli resistenti) e 50 mg/L di iprodione (che permette di distinguere gli isolati resistenti in R1 e R2) dopo 3 giorni di incubazione alle condizioni ottimali.

La sensibilità alle strobilurine è stata valutata osservando al microscopio (100X) la germinazione di 100 conidi su agar acqua (1,5%) alla concentrazione di 0,5 mg/L di kresoxim-methyl, trifloxystrobin e pyraclostrobin in presenza di 100 mg/L di SHAM (salicylhydroxamic acid, inibitore della respirazione alternativa) dopo 5 ore di incubazione alle condizioni ottimali. In presenza di germinazione gli isolati sono stati classificati come resistenti.

## **RISULTATI**

I risultati delle prove miceliari hanno mostrato che i valori di DE<sub>50</sub> degli isolati di pereti mai trattati con boscalid sono compresi fra 0,07 e 0,97 mg/L mentre quelli degli isolati prelevati in frutteti, in cui il fungicida è stato impiegato con un numero di trattamenti variabile per 1-4 anni, tra 0,07 e 0,98 mg/L. Questi valori sono perfettamente paragonabili fra loro e con quelli della baseline (0,11 e 0,81 mg/L) (figura 1). Non è stata riscontrata, sinora, una relazione tra il numero dei trattamenti, che andava da 1 a 12 (in prove di efficacia prodotti) e i valori di DE<sub>50</sub>, così come con il numero di anni di utilizzo.

Relativamente all'indagine sulla presenza di resistenze multiple tra boscalid e altri principi attivi appartenenti a diverse famiglie, gli isolati sono stati suddivisi in base alla loro sensibilità a dicarbossimidici e strobilurine in 6 diversi fenotipi: dicS-strS, sensibili ad entrambe le famiglie di fungicidi; dicS-strR, sensibili ai dicarbossimidici e resistenti alle strobilurine; dicR1-strS, altamente resistenti a procymidone, mediamente resistenti a iprodione e sensibili alle strobilurine; dicR1-strR, altamente resistenti a procymidone, mediamente resistenti a iprodione e resistenti alle strobilurine; dicR2-strS altamente resistenti ai due dicarbossimidici e sensibili alle strobilurine e dicR2-strR, altamente resistenti ai dicarbossimidici e alle strobilurine. Fortunatamente il numero di isolati con resistenza doppia fra queste due famiglie è ancora molto bassa (7 su 154 isolati totali). Osservando i valori medi di DE<sub>50</sub> per boscalid, si può vedere che non si hanno differenze significative (test di Duncan con p=0,05) tra i diversi fenotipi. Confrontando anche gli intervalli dei valori di DE<sub>50</sub> (DE<sub>50</sub>Min- DE<sub>50</sub>Max) si può notare come essi siano simili tra il fenotipo completamente sensibile a tutti i fungicidi e quelli resistenti solo ai dicarbossimidici o solo alle strobilurine. Anche i valori dei 4 isolati appartenenti al fenotipo dicR1-strR, cioè con resistenza ad entrambe queste famiglie di fungicidi, sono compresi all'interno degli intervalli sopracitati, così come quello dell'unico

isolato del fenotipo dicR2-strR, che ha resistenza multipla a dicarbossimidici, fludioxonil e strobilurine (tabella 1). Anche in quest'ultimo caso quindi non si osservano variazioni di sensibilità al boscalid.

Figura 1. Distribuzione della sensibilità a boscalid (valori di DE<sub>50</sub> in mg/L) di 232 isolati di *S. vesicarium* raccolti tra il 2007 e il 2009 in frutteti trattati e non con questo principio attivo, paragonati ai valori di sensibilità della baseline, ovvero di isolati raccolti entro luglio 2006.

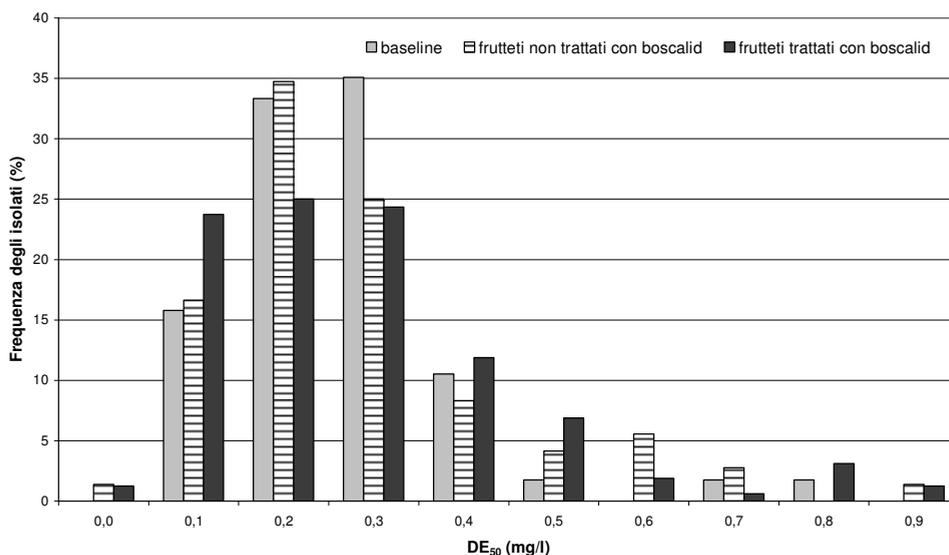


Tabella 1. Sensibilità a boscalid (DE<sub>50</sub> in mg/L) di 154 isolati di *S. vesicarium*, collezionati nel 2008-2009, con diversi livelli di sensibilità a dicarbossimidici e strobilurine

Fenotipo	N. isolati	DE <sub>50</sub> Min	DE <sub>50</sub> Max	DE <sub>50</sub> media
dicS-strS	84	0,08	0,98	0,29
dicS-strR	39	0,1	0,86	0,35
dicR1-strS	24	0,07	0,69	0,37
dicR1-strR	4	0,15	0,47	0,29
dicR2-strS	2	0,33	0,42	0,38
dicR2-strR	1	-	-	0,79*

\* valore unico

## CONCLUSIONI

La sensibilità di *S. vesicarium* a boscalid, dopo tre anni dall'inizio del suo impiego in Italia su pero, non è variata rispetto alla sensibilità naturale (baseline) negli isolati prelevati nelle principali aree pericole della Pianura Padana. Questo aspetto è di particolare rilevanza soprattutto negli isolati prelevati in frutteti dove l'utilizzo del boscalid è iniziato immediatamente dopo la sua registrazione (luglio 2006). Anche i valori di sensibilità di isolati prelevati all'interno di prove parcellari di un'azienda sperimentale dove sono stati effettuati 12 trattamenti consecutivi, non si discostano da quelli della baseline. Tuttavia in altri patogeni, come ad esempio *Alternaria alternata*, la resistenza a boscalid è comparsa dopo solo 2 anni di utilizzo, causando problemi di contenimento in campo (Avenot e Michailides, 2007). Boscalid è, infatti, considerato a rischio medio di resistenza dal FRAC a causa del suo meccanismo d'azione molto specifico (www.frac.info). Risulta quindi importante continuare il monitoraggio per la sensibilità a boscalid in *S. vesicarium*.

Nessuna differenza di sensibilità è stata, comunque, notata in isolati di questo patogeno resistenti a dicarbossimidici e strobilurine, confermando che in questi casi i meccanismi di resistenza (rispettivamente, presenza di mutazioni nel gene dell'istidina chinasi e della sostituzione G143A nel citocromo b) sono strettamente correlati ai diversi specifici siti d'azione, che differiscono da quello di boscalid. Ciò rende questo prodotto interessante nella difesa del pero dalla maculatura bruna, sia nei casi di resistenza accertata nei confronti di queste due famiglie di fungicidi sia come partner nelle miscele all'interno delle strategie antiresistenza.

## 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., Cavallini D., Brunelli A., 2008. *Stemphylium vesicarium* resistance to fungicides on pear in Italy. In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds V, eds. Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russell PE and Lyr H. Bonn, Germany pp. 167-172.
- Alberoni G., Cavallini D., Collina M., Brunelli A., 2009. Sensitivity of *Stemphylium vesicarium* to the most used fungicides to control pear brown spot in Italian orchards. *AFPP- 9th International Conference on Plant Diseases*. Tours, France, 8 and 9 December 2009, 612-620.
- Avenot H.F., Michailides T.J., 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease*, 91, 1345-1350.
- Brunelli A., Gherardi I., Adani N., 1997. Reduced sensitivity of *Stemphylium vesicarium*, causal agent of pear brown spot, to dicarboximide fungicides. *Informatore Fitopatologico*, 47, 44-48.
- Brunelli A., Gianati P., Berardi R., Flori P., Alberoni G., Pancaldi D., 2004. Activity of strobilurin fungicides on pear brown spot (*Stemphylium vesicarium*). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 109-114.
- Collina M., Alberoni G., Brunelli A., 2007. First occurrence of strobilurin-resistant isolates of *Stemphylium vesicarium* in an Italian pear orchard. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University*, 72, 735-738.
- Ponti I., Brunelli A., Tosi C., Cavallini G., Mazzini F., 1996. Chemical control trials on pear brown spot (*Stemphylium vesicarium*). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 165-172.

Stammler G., Brix H.D., Glättli A., Semar M., Schoefl U., 2007. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. *BCPC XVI International Plant Protection Congress*, 40-45.

---

Il lavoro è stato svolto all'interno di progetti finanziati dalla regione Emilia Romagna (L.R. 28/98) e da BASF Italia Srl - Divisione Agro