

## APPROFONDIMENTI

# La resistenza ai fungicidi in *Monilinia* spp. da pesche e nettarine e in *Venturia inaequalis* da mele

Davide Spadaro\* - Simona Prencipe\* - Luca Nari\*\*

\*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA) - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO).

\*\*AGRION, Fondazione per la ricerca, l'innovazione e lo sviluppo tecnologico dell'agricoltura piemontese - Manta (CN).

## Introduzione

L'Italia è il terzo produttore mondiale di pesche e nettarine, con circa 1,3 milioni di tonnellate prodotte all'anno, dopo Cina e Spagna, e al settimo posto per quanto riguarda la produzione di mele (2 milioni di tonnellate). I 18.000 ettari di frutteto piemontese sono concentrati per oltre il 70% in provincia di Cuneo e generano un fatturato annuo di oltre 400 milioni di Euro. Il melo è la coltura su cui punta maggiormente il territorio. Oltre al melo, notevole interesse rivestono pesco, nettarino, susino, albicocco, pero e ciliegio.

La ticchiolatura rappresenta da sempre la malattia più pericolosa per il melo in Piemonte, così come lo è la maculatura bruna per il pero e il marciume bruno per le drupacee. Si riportano nella presente nota, alcune caratteristiche relative alla lotta chimica nei confronti di marciume bruno e di ticchiolatura, così come alcuni risultati sulla resistenza ai fungicidi relativi a *Monilinia* spp. e a *Venturia inaequalis*.

## Il marciume bruno delle drupacee

Il marciume bruno è la più importante malattia fungina delle drupacee sia in frutteto sia in post-raccolta, il cui principale agente causale è rappresentato dal genere *Monilinia* spp.. Prima del 2008, le specie di *Monilinia* diffuse in Europa erano *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland, Honey 1945) e *Monilinia fructigena* (Honey ex Whetzel 1945). Una terza specie, *Monilinia fructicola* (G.Wint.) Honey 1928, già presente in Asia, Oceania, Nord e Sud America, è stata successivamente segnalata in Italia nel 2009 da Pellegrino *et al.* (2009). *M. fructicola* è un patogeno di quarantena inserito nella lista EPPO A2. Il patogeno è stato anche segnalato in Croazia, Francia, Germania, Grecia, Polonia, Romania, Serbia, Slovenia, Spagna, Svizzera e Ungheria (<https://gd.eppo.int/taxon/MONIFC/distribution>).

L'utilizzo di fungicidi in campo contro *Monilinia* spp. risulta essere efficace, ma non sempre risolutivo. Le pratiche agronomiche messe in campo dai produttori risultano determinanti nel prevenire il marciume bruno: potatura verde, ridotti apporti di azoto e irrigazioni razionali primo dello stacco dei frutti consentono di limitare al minimo i danni e migliorare l'azione della strategia di difesa realizzata. Risulta di fondamentale importanza la strategia di difesa pianificata, soprattutto negli anni in cui si verificano condizioni favorevoli allo sviluppo della malattia (Hrustic' *et al.*, 2012). Attualmente per il marciume bruno sono registrati diversi principi attivi i quali sono inseriti nei disciplinari di produzione nazionali/regionali con opportune limitazioni. Gli inibitori della biosintesi dell'ergosterolo (IBE), ed in particolare il tebuconazolo, sono i fungicidi più utilizzati nella difesa contro

questo patogeno. Oltre agli IBE, svolgono una soddisfacente azione anche altri fungicidi quali il boscalid+pyraclostrobyl, cyprodinil+fludioxonil, fenpyrazamine e i nuovi inibitori della succinato deidrogenasi (SDHI): fluopyram e penthiopyrad. Per quanto riguarda i fenomeni di resistenza agli IBE, essa è stata associata a mutazioni nel gene CYP51, alla sua sovraespressione ed alla presenza del trasposone *Mona* (Chen *et al.*, 2017). Tra differenti principi attivi, le strobilurine, quali azoxystrobin e pyraclostrobin, sono considerate la categoria con il più alto rischio di sviluppo di resistenza (Amiri *et al.*, 2010). Infatti, una ridotta sensibilità dei patogeni a questi gruppi di sostanze è stata registrata in numerosi meleti e vigneti (Gullino *et al.*, 2004) e per alcuni ceppi di *Monilinia* spp. responsabili del marciume bruno su drupacee (Miessner & Stammler, 2010). Sono stati inoltre segnalati ceppi di *Monilinia* spp. isolati da drupacee resistenti a benzimidazoli, dicarbossimidi e triazoli (Yoshimura *et al.*, 2004). La resistenza a fungicidi benzimidazolici è stata successivamente associata alla mutazione E198A nel gene che codifica per la beta-tubulina (Weger *et al.*, 2011).

## I RISULTATI DELLA RICERCA IN PIEMONTE

### Monitoraggio di *M. laxa* e *M. fructicola* e allestimento delle prove di sensibilità

Negli anni 2009-2012 in Piemonte è stato eseguito un monitoraggio su *M. laxa* e *M. fructicola*. Sono stati eseguiti isolamenti da pesche e nettarine e 136 ceppi sono stati scelti per la valutazione della sensibilità a differenti fungicidi: 68 ceppi di *M. fructicola* e 68 ceppi di *M. laxa*.

I saggi di sensibilità sono stati allestiti *in vitro* utilizzando dischetti di micelio, prelevati di colture cresciute per 7 giorni su terreno PDA, e substrati avvelenati contenenti diverse concentrazioni di fungicida. Le piastre sono state incubate a 25°C±1 al buio e i rilievi sono stati effettuati dopo 5 giorni. Per ogni colonia è stato misurato il diametro di crescita e successivamente è stata calcolata la crescita relativa. In tabella 1 sono riportati i principi attivi, il nome commerciale e la percentuale di principio attivo presente.

Le prove sono state allestite utilizzando il terreno PDA per il tiofanato di metile, il tebuconazolo, il fenexamid e il fludioxonil, mentre il PDA con l'aggiunta di SHAM (acido salicilidrossamico) è stato impiegato per le prove con utilizzo di strobilurine (pyraclostrobin e azoxystrobin). Il cyprodinil è stato addizionato ad un terreno contenente 10 g di glucosio, 12,5 g di agar, 1,5 g of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g di MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 l di acqua deionizzata (Fritz *et al.*, 2003).

I fungicidi sono stati saggati alle seguenti concentrazioni: 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 mg l<sup>-1</sup>. Per ogni

Tabella 1 – Fungicidi utilizzati per le prove di sensibilità di ceppi di *Monilinia* spp.  
 Table 1 – Fungicides used for testing the sensitivity of strains of *Monilinia* spp.

Principio attivo	Prodotto commerciale (% di principio attivo)	Classe chimica
Tiofanato di metile	Enovit metil FL® (p.a.: 41,7%), Sipcam Italia, Pero (MI)	benzimidazoli
Tebuconazolo	Folicur WG® (p.a.: 25%), Bayer CropScience, Milano	IBE (inibitori della demetilazione)
Fenexamid	Teldor® (p.a.: 50%), Bayer CropScience, Milano	IBE (inibitori di chetoriduttasi)
Fludioxonil	Scholar® (p.a.: 20,4%), Syngenta Italia, Milano	fenilpirroli
Cyprodinil	Chorus® 50 WG (p.a.: 50%), Syngenta Italia, Milano	anilinoipirimidine
Pyraclostrobin	Cabrio EC® (p.a.: 20%), BASF Agricultural Solutions, Cesano Maderno (MB)	Qol (inibitori della respirazione mitocondriale)
Azoxystrobin	Ortiva® (p.a.: 23%), Syngenta Italia, Milano	Qol (inibitori della respirazione mitocondriale)

prova è stata calcolata la concentrazione minima inibitoria (CMI) e la concentrazione in grado di produrre il 50% dell'inibizione ( $EC_{50}$ ) utilizzando una regressione lineare tra la percentuale di inibizione e il corrispettivo  $\log_{10}$  della concentrazione del fungicida (May-De Mio *et al.*, 2011).

### ***Monilinia fructicola***

Il 90% dei ceppi di *M. fructicola* ha mostrato resistenza al tiofanato di metile, con una  $EC_{50}$  media di 153,21 mg l<sup>-1</sup> per i ceppi isolati nel 2010, 854,80 per i ceppi isolati nel 2011 e 3.703,27 mg l<sup>-1</sup> per i ceppi isolati nel 2012. Alcuni ceppi hanno una  $EC_{50}$  maggiore di 10.000 mg l<sup>-1</sup>. Il saggio con fenexamid su ceppi di *M. fructicola* ha mostrato una  $EC_{50}$  media di 0,05 mg l<sup>-1</sup>, mentre per il saggio con il tebuconazolo l' $EC_{50}$  media registrata è compresa tra 0,03 e 0,17 mg l<sup>-1</sup>. I saggi con l'utilizzo di strobilurine hanno mostrato una  $EC_{50}$  media compresa tra 0,43 e 0,86 mg l<sup>-1</sup> per il pyraclostrobin e 0,32 a 1,12 mg l<sup>-1</sup> per l'azoxystrobin. L' $EC_{50}$  media per il saggio con cyprodinil è di 1,11 mg l<sup>-1</sup>. Fludioxonil ha mostrato una  $EC_{50}$  media compresa tra 0,03 e 0,26 mg l<sup>-1</sup>. La resistenza al tiofanato di metile per una selezione di ceppi di *M. fructicola* è stata inoltre indagata tramite sequenziamento del gene della beta tubulina utilizzando i primer specifici sviluppati da Ma e colleghi (2003). I 18 ceppi piemontesi sequenziati, che avevano mostrato elevata resistenza nei saggi *in vitro*, presentavano la mutazione E198A confermando la resistenza a tale principio attivo.

### ***Monilinia laxa***

I ceppi di *M. laxa* sono risultati più sensibili dei ceppi di *M. fructicola* al tiofanato di metile con una  $EC_{50}$  media compreso tra 0,002 a 0,026 mg l<sup>-1</sup>. La diversa sensibilità tra le due specie di *Monilinia*, è ulteriormente evidenziata dai valori di CMI: 0,3 mg l<sup>-1</sup> per isolati di *M. laxa* e CMI superiore a 300 mg l<sup>-1</sup> per isolati di *M. fructicola*. Il fenexamid ha mostrato una  $EC_{50}$  media compreso tra 0,006 a 0,110 mg l<sup>-1</sup>, mentre il tebuconazolo ha mostrato valori medi di  $EC_{50}$  compresi tra 0,003 a 0,022 mg l<sup>-1</sup>. Questi valori evidenziano una maggiore sensibilità a questo principio attivo rispetto agli isolati di *M. fructicola*. Il saggio con utilizzo di strobilurine mostra valori medi di  $EC_{50}$  compresi tra 0,024 a 0,320 mg l<sup>-1</sup> per pyraclostrobin e tra 0,019 a 0,269 mg l<sup>-1</sup> e azoxystrobin.

### **Quadro generale sulla sensibilità ai fungicidi in *Monilinia* spp.**

Ad oggi, è disponibile una vasta gamma di fungicidi per contenere le malattie fungine, anche se con l'utilizzo

nel tempo i patogeni possono acquisire resistenza ad alcuni composti, con conseguente perdita di efficacia. La maggior parte dei nuovi fungicidi sono caratterizzati da un meccanismo di azione specifico e, pertanto, sono a rischio di resistenza (Leroux *et al.*, 2002). Il Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) ha classificato *Monilinia* spp. come patogeno con un moderato rischio di sviluppare resistenza, basandosi su dati di biologia, epidemiologia, storia dei fenomeni di resistenza, sviluppo ed estensione della malattia. Numerose classi di fungicidi con differenti meccanismi di azione sono utilizzati contro *Monilinia* spp., tra cui i benzimidazoli (ad es. tiofanato di metile), gli inibitori della respirazione mitocondriale ad es. azoxystrobin e pyraclostrobin, (Miessner e Stammler, 2010), le anilinoipirimidine (ad es. cyprodinil), gli inibitori della sintesi degli ergosteroli (DMI; ad es. tebuconazolo; Ma *et al.*, 2005), gli idrossianilidi (ad es. fenhexamid) e i fenilpirroli (ad es. fludioxonil).

I risultati dello studio condotto su ceppi di *M. fructicola* isolati da pesche e nettarine in Piemonte evidenziano l'esistenza di diversi livelli di resistenza al tiofanato di metile con il 60% dei ceppi con una  $EC_{50}$  superiore a 30 mg l<sup>-1</sup> (elevata resistenza), e una tendenza all'aumento della resistenza dei ceppi per questo principio attivo nel tempo, passando da una  $EC_{50}$  media di 153,21 mg l<sup>-1</sup> per il 2010, a valori medi di 854,80 mg l<sup>-1</sup> e 3.703,27 mg l<sup>-1</sup> rispettivamente nel 2011 e nel 2012. Simili risultati sono stati osservati in California dal 1998 al 2002 (Yoshimura *et al.*, 2004), in Brasile dal 2000 al 2008 (May-De Mio *et al.*, 2011). Inoltre ceppi resistenti ai benzimidazoli sono stati riportati in Italia, USA, Australia e Corea del Sud. La resistenza osservata in *M. fructicola* potrebbe essere associata ad una mutazione nel gene codificante per la  $\beta$ -tubulina, come riportato da Weger *et al.* (2011).

Per i ceppi di *M. laxa* è stata osservata una ridotta sensibilità al tiofanato di metile, con valori medi di  $EC_{50}$  di 0,02, 0,087 e 0,26 mg l<sup>-1</sup> rispettivamente per gli i ceppi isolati negli anni 2010, 2011 e 2012. Un simile andamento è stato osservato da Ma *et al.* (2005) per *M. laxa* negli Stati Uniti in uno studio condotto dal 1987 al 2002, ed in Spagna dal 2006 al 2010 (Egüen *et al.*, 2016) con una chiara evidenza di resistenza al tiofanato di metile.

La classe di fungicidi DMI è stata ampiamente utilizzata dal 1997 in California, dal 2004 in Brasile e dal 2002 in Europa per il contenimento del marciume bruno (Schnabel e Dai, 2004). I risultati ottenuti dalla sperimentazione in Piemonte evidenziano la presenza di ceppi resistenti al tebuconazolo sia per la specie *M. fructicola* che per la *M. laxa* con il valore

medio di CMI (di 0,3-1 mg l<sup>-1</sup>) più alto finora riportato in letteratura. Questi dati sono in accordo con Chen e colleghi (2013) e confermano lo sviluppo di resistenza per la specie *M. fructicola* a questa classe di fungicidi. Lo sviluppo della resistenza è stato osservato ad esempio per il fenbuconazolo (Schnabel e Dai, 2004), il tebuconazolo (Yoshimura *et al.*, 2004) ed il propiconazolo (Zhu *et al.*, 2012).

Il fenexamid e il fludioxonil sono fungicidi ampiamente utilizzati su drupacee contro patogeni fungini di diverse specie. I nostri dati evidenziano un'elevata sensibilità ad entrambi i principi attivi sia per la specie *M. laxa* sia per la specie *M. fructicola* nel tempo e sono quindi risultati altamente efficaci nel contenimento del marciume bruno, come riportato per *M. fructicola* in California (Förster *et al.*, 2007) e per *M. laxa* in Europa (Malandrakis *et al.*, 2013).

Il cyprodinil è un fungicida appartenente alla classe delle anilino pirimidine, con un meccanismo di azione basato sull'inibizione della biosintesi della metionina, ed è utilizzato per il contenimento del marciume bruno delle drupacee in Europa dagli anni Novanta (Emery *et al.*, 2002). Diversi studi hanno riportato fenomeni di resistenza a questi fungicidi per il genere *Botrytis* (Leroux *et al.*, 2002), mentre più recentemente lo studio di Fazekas e colleghi (2014) ha riportato una ridotta sensibilità al cyprodinil in ceppi di *M. laxa*. Simili risultati sono stati evidenziati dallo studio condotto in Piemonte, con la presenza di una ridotta sensibilità a questo principio attivo.

Azoxystrobin e pyraclostrobin sono inibitori della respirazione mitocondriale comunemente utilizzati per contrastare infezioni da *Monilinia* spp. su drupacee. Recenti studi hanno associato la resistenza a questa classe di fungicidi dovuta a specifiche mutazioni (G143A, F129A e G137R) a carico del gene che codifica per il citocromo b (Markoglou *et al.*, 2006). I risultati ottenuti nei saggi con l'impiego di strobilurine hanno evidenziato una riduzione della sensibilità per la specie *M. laxa* e lo sviluppo di resistenza per la specie *M. fructicola* nei saggi con pyraclostrobin, e una riduzione di sensibilità nei saggi con azoxystrobin. Tale resistenza è stata osservata per numerose specie fungine (Miessner e Stammler, 2010) compresa *M. fructicola* (Pereira *et al.*, 2017).

### La ticchiolatura del melo

La maggiore criticità per il melo è rappresentata dalla difesa fitosanitaria, perché la ticchiolatura, causata dal patogeno *Venturia inaequalis*, è in grado di causare perdite di produzione ed economiche rilevanti se non vengono attuate adeguate misure di prevenzione e di lotta.

Per evitare i numerosi interventi fitosanitari, la ricerca si è da tempo attivata per ottenere varietà resistenti. Nonostante negli ultimi anni abbiano raggiunto il mercato alcune varietà decisamente migliorative per aspetti agronomici ed organolettici, la difesa chimica rappresenta lo strumento principale contro la ticchiolatura ed ogni anno sono necessari almeno 15-18 trattamenti con prodotti fitosanitari.

### Strategie di difesa nei confronti di ticchiolatura

La strategia adottata in Piemonte per il contenimento della ticchiolatura si basa sulla lotta di tipo preventivo. Questa tipologia di difesa, se applicata correttamente, consente di superare con esiti soddisfacenti anche le stagioni più critiche come quelle del 2013 e del 2018, particolarmente favorevoli allo sviluppo della malattia. L'impostazione di base fa riferimento ad attente valutazioni delle previsioni

meteorologiche le quali risultano affidabili nel breve periodo (3 giorni). L'unico limite di questa strategia è che non sempre si concretizzano le previsioni di pioggia e che l'intervento eseguito preventivamente risulta poi troppo distante, anche se solo di pochi giorni, dalla precipitazione che favorisce i processi infettivi.

In situazioni particolari, con piogge persistenti per più giorni consecutivi, si interviene su pianta bagnata, evitando così l'inizio dell'infezione. Questo sistema viene utilizzato da tempo nella difesa biologica in Piemonte, in quanto il polisolfuro di calcio esplica la sua migliore azione proprio in condizione di pianta bagnata e dunque anche sotto la pioggia. La strategia di difesa contro le infezioni primarie ha termine con l'esaurimento della massa d'inoculo. Durante la stagione estiva, la linea da seguire è totalmente dipendente dall'esito dell'infezione primaria e va programmata in base alle condizioni meteorologiche.

Interventi di tipo curativo vengono effettuati esclusivamente in casi di mancata copertura della pianta a seguito di un'avvenuta infezione, oppure in casi di dilavamento del prodotto di copertura o in occasione di infezioni molto gravi segnalate dal modello previsionale. Presentano un'azione curativa inibitori della sintesi dell'ergosterolo (IBE: difenoconazolo) e anilino pirimidine.

### I risultati della sperimentazione in Piemonte

#### Monitoraggio

Centosei ceppi di *Venturia inaequalis* sono stati isolati da meleti durante il 2015 e il 2016. I campionamenti sono stati effettuati da differenti cultivar di melo ('Ambrosia', 'Golden' e 'Mondial Gala') in frutteti situati in Piemonte con diverse strategie di gestione (trattati o non trattati con fungicidi DMI e QoI). Il DNA degli isolati è stato estratto da colture cresciute su estratto di malto e sono stati identificati attraverso l'amplificazione della regione ITS.

#### Saggio di sensibilità *in vitro* ai fungicidi DMI, QoI e SDHI

Quarantaquattro ceppi sono stati isolati da frutteti trattati o non trattati con fungicidi DMI e QoI al fine di rilevare l'eventuale riduzione di sensibilità a due fungicidi comunemente utilizzati nei programmi di difesa, il pyraclostrobin e il penconazolo. Su ulteriori 12 ceppi è stata inoltre valutata la sensibilità *in vitro* al difenoconazolo e al fluxapiraxad. La prova è stata effettuata *in vitro* con misurazione del diametro di crescita del micelio. La sensibilità è stata determinata confrontando il diametro della colonia cresciuta in terreni non ammendati o ammendati con fungicidi, utilizzando il terreno PDA. Il saggio con utilizzo del pyraclostrobin (Insignia®, Basf) è stato sviluppato saggiando cinque concentrazioni (0,01, 0,1, 1, 10, 100 mg l<sup>-1</sup>), addizionate di 100 mg l<sup>-1</sup> di acido salicilidrossamico (SHAM) (Sigma-Aldrich, Italia) e 100 mg l<sup>-1</sup> streptomicina solfato (Sigma-Aldrich, Italia). Il saggio con penconazolo (Topas® 10 EC, Syngenta) è stato effettuato con quattro concentrazioni (0,01, 0,1, 1, 10 mg l<sup>-1</sup>) addizionate con 100 mg l<sup>-1</sup> di streptomicina solfato. Il saggio con difenoconazolo (Score® 25EC, Syngenta) è stato effettuato con cinque concentrazioni (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 mg l<sup>-1</sup>) addizionate con 100 mg l<sup>-1</sup> di streptomicina solfato, mentre il saggio con fluxapiraxad (Sercadis®, Basf) è stato effettuato alle concentrazioni di 0,01, 0,1, 0,3, 1 e 10 mg l<sup>-1</sup>) addizionate con 100 mg l<sup>-1</sup> di streptomicina solfato. I saggi sono stati ripetuti in due esperimenti indipendenti utilizzando tre replicazioni per esperimento.

I rilievi sono stati effettuati dopo 28 giorni di incubazione a 20°C al buio. Per ogni ceppo è stata calcolata l'inibizione di crescita percentuale e il valore di EC<sub>50</sub>. Per i saggi è stata costruita una *baseline* utilizzando i ceppi provenienti da frutteti condotti seguendo i disciplinari dell'agricoltura biologica. Tali valori sono stati utilizzati come dose discriminativa nella valutazione della sensibilità degli isolati di *V. inaequalis*.

### **Quadro generale sulla sensibilità ai fungicidi in *Venturia inaequalis***

I valori medi di EC<sub>50</sub> ottenuti dall'analisi dei ceppi utilizzati per la costruzione della *baseline* sono 0,050 mg l<sup>-1</sup> per il pyraclostrobin e 0,029 mg l<sup>-1</sup> per il penconazolo. I ceppi isolati da campi trattati con fungicidi hanno mostrato un valore medio di EC<sub>50</sub> di 0,091 mg l<sup>-1</sup> per il saggio con penconazolo. Diversamente, i valori di EC<sub>50</sub> per il saggio con pyraclostrobin sono stati registrati in un ampio intervallo, da 0,001 mg l<sup>-1</sup> a 72.440, con un valore medio di 5.330 mg l<sup>-1</sup>. Tali valori evidenziano un'elevata variabilità tra ceppi isolati da diversi frutteti, ma anche tra ceppi isolati dallo stesso frutteto. Sulla base dei dati ottenuti, il 33% dei ceppi è risultato sensibile mentre il 67% a sensibilità ridotta per il saggio con penconazolo, mentre per il pyraclostrobin il 44% dei ceppi è risultato sensibile, il 14% a ridotta sensibilità e il 42% resistente. I dati ottenuti confermano quanto viene riportato in letteratura in riferimento alla ridotta efficacia dei fungicidi DMI nella difesa alla ticchiolatura e alla scarsa efficacia delle strobilurine per sviluppo di resistenza sia in Italia sia all'estero (Villani *et al.*, 2016).

I valori medi di EC<sub>50</sub> ottenuti dall'analisi dei ceppi utilizzati per la costruzione della *baseline* sono 0,322 µg / mL per il fluxapyroxad e 0,01 mg l<sup>-1</sup> per il difenoconazolo. I dati ottenuti dai saggi con fluxapyroxad hanno mostrato un valore medio di EC<sub>50</sub> di 0,293 mg l<sup>-1</sup> evidenziando la presenza dell'83% dei ceppi sensibili e un 17% di ceppi a ridotta sensibilità. La *baseline* di riferimento ottenuta è simile a quella riportata dallo studio di Ayer *et al.*, (2019). L'elevata attività intrinseca e la specificità per il loro target fa dei fungicidi SDHI una classe ad elevato rischio di sviluppo di resistenza (Avenot e Michailides 2010). Tuttavia i risultati ottenuti mostrano l'efficacia della classe SDHI e nello specifico del fluxapyroxad *in vitro*.

I dati ottenuti utilizzando il difenoconazolo, mostrano una EC<sub>50</sub> media di 0,023 mg l<sup>-1</sup> e la presenza del 100% dei ceppi sensibili a questo principio attivo. La *baseline* di riferimento ottenuta con isolati provenienti da frutteti condotti seguendo i disciplinari dell'agricoltura biologica è risultata molto simile a quanto rinvenuto dallo studio di Henríquez *et al.* (2011) in Cile, ma di un ordine di grandezza più alto rispetto a quanto rinvenuto da Villani *et al.* (2015).

In questo studio due fungicidi appartenenti alla classe DMI, penconazolo e difenoconazolo, sono stati saggati ed hanno evidenziato due differenti gradi di sensibilità ai fungicidi per i ceppi di *V. inaequalis* analizzati. Come riportato da Mondino *et al.* (2015), si denota una crescente resistenza a questa classe di fungicidi dovuto al loro intensivo. I dati ottenuti evidenziano una maggiore efficacia del difenoconazolo rispetto al penconazolo, che risulta essere ancora uno strumento efficace nella lotta alla ticchiolatura del melo.

### **Conclusioni**

La Direttiva Europea 2009/128/EC ormai obbliga tutti

gli stati membri alla lotta integrata dal 2014. Nell'ultimo decennio molti passi in avanti sono stati fatti al fine di immettere sul mercato un prodotto più salubre per il consumatore incentivando una difesa, ove possibile, non più basata sull'impiego di agrofarmaci ma incentrata sull'adozione di molecole, o organismi naturali o altri mezzi non tossici per l'uomo. Un'efficace gestione della difesa si traduce quindi in un vantaggio competitivo per il prodotto e l'intero distretto. La difesa sostenibile (che si declina nei metodi "integrato" ed "biologico") contro i patogeni chiave delle drupacee e del melo implica una strategia che coniuga efficacia, sostenibilità ambientale e sicurezza alimentare. Il monitoraggio della sensibilità ai fungicidi risulta un'informazione chiave nell'impostazione di una strategia di difesa efficace, ma basata su un limitato numero di molecole e di numero di trattamenti.

### **Ringraziamenti**

Lavoro presentato ai 42<sup>mi</sup> Incontri Fitoiatrici di Saluzzo (CN), 29 novembre 2019. Lavoro svolto con il contributo dei progetti "FRUITSENSOR- Tecnologie convergenti per una frutticoltura di precisione sostenibile" e "SMART APPLE - Tecnologie innovative e SMART per la produzione sostenibile di mele", finanziati dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo.

### **Riassunto**

La ticchiolatura rappresenta da sempre la malattia più pericolosa per il melo, così come lo è il marciume bruno per il pesco ed il nettarino. Si riportano nella presente nota, alcune caratteristiche relative alla lotta chimica nei confronti di marciume bruno e di ticchiolatura. È stata, inoltre, verificata la sensibilità di isolati di *Monilinia laxa* e *M. fructicola* a tiofanato di metile, tebuconazolo, fenexamid, fludioxonil, cyprodinil, pyraclostrobin e azoxystrobin. Il 90% dei ceppi di *M. fructicola* ha mostrato resistenza al tiofanato di metile, comprovata dalla presenza della mutazione E198A nel gene della beta tubulina. Per quanto riguarda *Venturia inaequalis*, è stata valutata la sensibilità a penconazolo, pyraclostrobin, fluxapyroxad e difenoconazolo. Il 67% dei ceppi ha mostrato ridotta sensibilità a penconazolo. Per quanto concerne il pyraclostrobin, il 14% dei ceppi ha mostrato ridotta sensibilità ed il 44% dei ceppi è risultato resistente. I ceppi di *V. inaequalis* analizzati hanno mostrato diverso grado di sensibilità a penconazolo e difenoconazolo, due fungicidi appartenenti alla classe DMI.

**Parole chiave:** drupacee; *Malus domestica*; marciume bruno; *Prunus persica*; *Malus domestica*; *Prunus persica*; ticchiolatura.

### **Summary**

#### ***Fungicide resistance in Monilinia spp. from peaches and nectarines and in Venturia inaequalis from apples***

*Apple scab is the most important disease for apple tree, as brown rot is peach and nectarine production. In the present article, the main characteristics of chemical management towards brown rot and apple scab are reported. Moreover, the sensitivity of isolates of Monilinia laxa and M. fructicola to thiophanate-methyl, tebuconazole, fenhexamid, fludioxonil, cyprodinil, pyraclostrobin and azoxystrobin was verified. Over 90% of the strains of M. fructicola showed resistance to thiophanate-methyl, proved by the occurrence of the E198A mutation in the gene for beta-tubulin. Concerning Venturia*

*inaequalis*, its sensitivity to penconazole, pyraclostrobin, fluzapyroxad and difenoconazole was established. Among the strains, 67% showed reduced sensitivity to penconazole. Concerning pyraclostrobin, 14% of the strains showed reduced sensitivity and 44% were resistant. The strains of *V. inaequalis* showed different degree of sensitivity to penconazole and difenoconazole, due DMI fungicides.

**Key words:** apple scab; brown rot; *Malus domestica*; *Monilinia fructicola*; *Monilinia laxa*; *Prunus persica*; stone fruit.

### Lavori citati

- Amiri A., Brannen P. M., Schnabel G. (2010) - Reduced Sensitivity in *Monilinia fructicola* Field Isolates from South Carolina and Georgia to Respiration Inhibitor Fungicides. *Plant Disease*, 94, 737-743.
- Avenot H. F., Michailides T. J. (2010) - Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29, 643-651.
- Ayer K. M., Villani S. M., Choi M., Cox K. D. (2019) - Characterization of the VisdHc and VisdHd genes in *Venturia inaequalis*, and sensitivity to fluxapyroxad, pydiflumetofen, inpyrflumoxam, and benzovindiflupyr. *Plant Disease*, in stampa. doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1225-RE.
- Chen F., Liu X., Schnabel G. (2013) - Field Strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. *Plant Disease*, 97, 1063-1068.
- Chen S., Yuan N., Schnabel G., Luocorres C. (2017) - Function of the genetic element 'Mona' associated with fungicide resistance in *Monilinia fructicola*. *Molecular Plant Pathology*, 18, 90-97.
- Egüen B., Melgarejo P., De Cal A. (2016) - The effect of fungicide resistance on the structure of *Monilinia laxa* populations in Spanish peach and nectarine orchards. *European Journal Plant Pathology*, 145, 815-827.
- Emery K. M., Scherm H., Savelle A. T. (2002) - Assessment of interactions between components of fungicide mixtures against *Monilinia fructicola*. *Crop Protection*, 21, 41-47.
- Fazekas M., Madar A., Sipiczki M., Miklós I., Holb I. J. (2014) - Genetic diversity in *Monilinia laxa* populations in stone fruit species in Hungary. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30, 1879-1892.
- Förster H., Driever G. F., Thompson D. C., Adaskaveg J. E. (2007) - Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the "reduced-risk" fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease*, 91, 209-215.
- Fritz R., Lanen C., Chapeland-Leclerc F., Leroux P. (2003) - Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine  $\beta$ -lyase of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77, 54-65.
- Gullino M. L., Gilardi G., Tinivella F., Garibaldi A. (2004) - Observations on the behaviour of different populations of *Plasmopara viticola* resistant to Qol fungicides in Italian vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 341-350.
- Henríquez J. L. S., Sarmiento O. V., Alarcón P. C. (2011) - Sensitivity of *Venturia inaequalis* Chilean isolates to difenoconazole, fenarimol, mancozeb, and pyrimethanil. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71, 39-44.
- Hrustić J., Mihajlović M., Grahovac M., Delibašić G., Bulajić A., Krstić B., Tanović B. (2012) - Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. *Pesticidi i Fitomedicina*, 27, 283-297.
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., Chapeland, F. (2002) - Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58, 876-888.
- Ma Z., Yoshimura M. A., Holtz B. A., Michailides T. J. (2005) - Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Management Science*, 61, 449-457.
- Malandrakis A., Koukiasas N., Veloukas T., Karaoglanidis G., Markoglou A. (2013) - Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* from Greece to fenhexamid and analysis of fenhexamid-resistant mutants. *Crop Protection*, 46, 13-17.
- Markoglou A. N., Malandrakis A. A., Vitoratos A. G., Ziogas B. N. (2006) - Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 149-162.
- May-De Mio L. L., Luo Y., Michailides T. J. (2011) - Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to Tebuconazole, Azoxystrobin, and Thiophanate-Methyl and Implications for Disease Management. *Plant Disease*, 95, 821-827.
- Miessner S., Stammler G. (2010) - *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*: risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117, 162-167.
- Mondino P., Casanova L., Celio A., Bentancur O., Leoni C., Alaniz S. J. (2015) - Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin and difenoconazole in Uruguay. *Journal of Phytopathology*, 163, 1-10.
- Pellegrino C., Gullino M. L., Garibaldi A., Spadaro D. (2009) - First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Disease*, 93, 668-668.
- Pereira W. V., Primiano I. V., Morales R. G. F., Peres N. A., Amorim L., May De Mio L. L. (2017) - Reduced sensitivity to azoxystrobin of *Monilinia fructicola* isolates from Brazilian stone fruits is not associated with previously described mutations in the cytochrome b gene. *Plant Disease*, 101, 766-773.
- Schnabel G., Dai Q. (2004) - Heterologous expression of the P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene from *Monilinia fructicola* reduces sensitivity to some but not all DMI fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78, 31-38.
- Villani S. M., Biggs A. R., Cooley D. R., Raes J. J., Kerik D. (2015) - Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease*, 11, 1526-1536.
- Villani S. M., Hulvey J., Hily J.-M., Cox K. D. (2016) - Overexpression of the CYP51A1 gene and repeated elements are associated with differential sensitivity to DMI fungicides in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 106, 562-571.
- Weger J., Schanze M., Hilber-Bodmer M., Smits T. H. M., Patocchi A. (2011) - First report of the  $\beta$ -tubulin E198A mutation conferring resistance to methyl benzimidazole carbamates in European isolates of *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 95, 497.
- Yoshimura M. A., Luo Y., Ma Z. H., Michailides T. J. (2004) - Sensitivity of *Monilinia fructicola* from stone fruit to thiophanate-methyl, iprodione, and tebuconazole. *Plant Disease*, 88, 373-378.
- Zhu F., Bryson P. K., Schnabel G. (2012) - Influence of storage approaches on instability of propiconazole resistance in *Monilinia fructicola*. *Pest Management Science*, 68, 1003-1009.