



CICLO DI SEMINARI

**PRODOTTI FITOSANITARI: ASPETTI  
NORMATIVI, APPLICATIVI,  
AMBIENTALI, USO SOSTENIBILE E  
GESTIONE DEI CONTROLLI**

Campus SAMEV (Grugliasco)

9 febbraio 2024



FEDERAZIONE ORDINI  
DEI DOTTORI AGRONOMI  
E DEI DOTTORI FORESTALI  
PIEMONTE - VALLE D'AOSTA



*Ministero della Giustizia*

Con il patrocinio di



FONDAZIONE  
PODERE  
PIGNATELLI

# La resistenza ai prodotti fitosanitari: diffusione del fenomeno e strategie di gestione

Francesco Vidotto, Luciana Tavella,  Davide Spadaro

## Resistenza dei funghi fitopatogeni ai fungicidi



Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA)  
Università degli Studi di Torino

# Resistenza dei funghi fitopatogeni ai fungicidi



- **Il fenomeno della resistenza nei funghi**
- Meccanismi dei fungicidi
- Meccanismi della resistenza
- Rischio di resistenza
- Valutazione della resistenza
- Gestione della resistenza
- Casi concreti



# Efficacia insufficiente

## IL MANCATO CONTENIMENTO DI UN PATOGENO DA PARTE DI UN FUNGICIDA PUO' ESSERE DOVUTO A:

- Identificazione erronea del patogeno: impiego di fungicidi o formulazioni errati
- Macchinari inadeguati o difettosi
- Tecnica di applicazione errata (dosaggi, volumi, momento di intervento)
- Condizioni molto favorevoli allo sviluppo della malattia
- Tasso di infezione troppo elevato
- **Comparsa di resistenza (individui di una specie manifestano una sensibilità al fungicida (ereditabile) inferiore alla media della specie)**

La conferma della resistenza a un fungicida necessita di **analisi in laboratorio.**



# Resistenza in campo e in laboratorio

La **resistenza in campo**: perdita di efficacia del p.a. rilevata in condizioni naturali. L'infezione del patogeno prosegue anche in seguito a diversi trattamenti con il p.a.

La **resistenza di laboratorio** si riferisce all'insensibilità di una popolazione a dosi crescenti di p.a. apportate in condizioni ambientali controllate, come ad esempio una piastra Petri.

In natura, **mutazioni genetiche casuali** possono rendere resistenti alcuni individui di una popolazione fungina. Il fungicida agisce più debolmente o non agisce più del tutto sulla crescita e/o la sporulazione dei patogeni, avvantaggiandoli (selezionandoli) significativamente al momento dell'applicazione dei prodotti fitosanitari.

In campo, si constata una diminuzione dell'efficacia del prodotto laddove la frequenza degli individui resistenti supera una certa proporzione. In questo caso si parla di «**resistenza pratica**».

# Resistenza qualitativa e quantitativa

**Resistenza qualitativa:** “discreta” o “passaggio singolo”.

Resistenza monogenica

Comparsa rapida (stabile nel tempo)

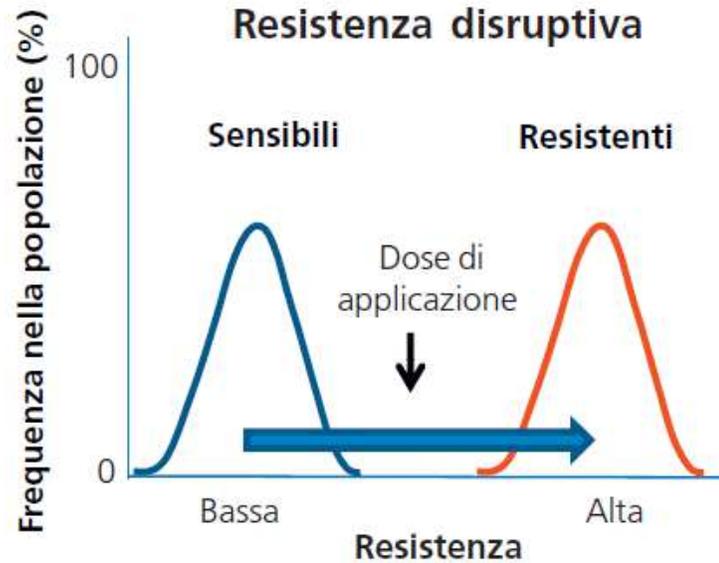
Anche usando dosi elevate non si riesce a controllare la popolazione.

**Resistenza quantitativa:** “progressiva” o “a più passaggi”.

Resistenza poligenica

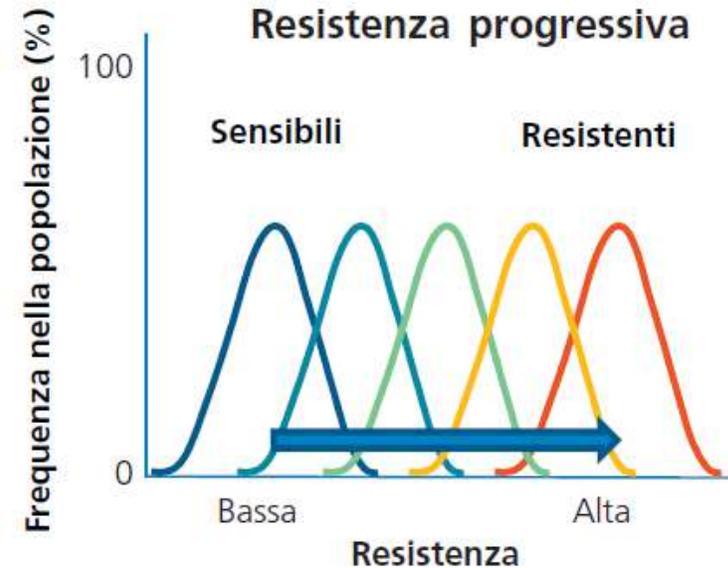
Comparsa lenta (graduale nel tempo)

Il p.a. sempre meno efficace man mano che aumentano il numero di trattamenti.



Asse orizzontale: dose di prodotto necessaria per controllare i ceppi fungini.

Due popolazioni distinte ON/OFF.  
In campo: perdita improvvisa dell'efficacia.  
Favorita da applicazioni ripetute.  
Esempio: strobilurine.



Diminuzione graduale della sensibilità al prodotto.  
In campo: erosione progressiva dell'efficacia.  
Favorita da sottodosaggi o da applicazioni in condizioni sfavorevoli.  
Esempio: triazoli.

# Resistenza incrociata e resistenza multipla



**Resistenza semplice** a uno o più fungicidi di una **stessa famiglia chimica (=gruppo chimico)**

**Resistenza incrociata** a fungicidi appartenenti a diverse famiglie chimiche con **stesso meccanismo d'azione**

Es. triazoli e imidazoli

**Resistenza incrociata negativa (negative cross-resistance)** la resistenza di un patogeno a una classe chimica determina un aumento della sensibilità nei confronti di un'altra famiglia chimica

Es. *Botrytis cinerea* benzimidazoli (resistenza) e fenilcarbammati (sensibilità incrementata)

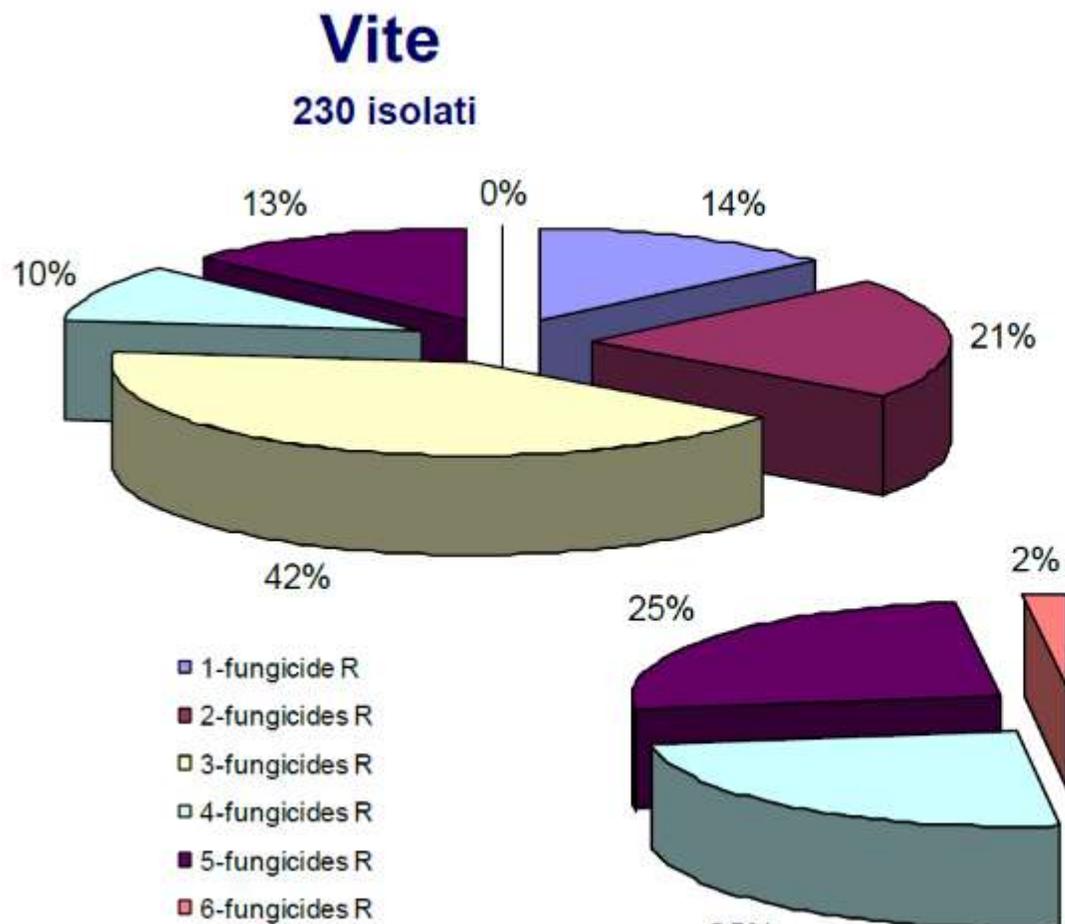
**Resistenza multipla (multiple resistance)** a fungicidi appartenenti a diverse famiglie chimiche con **diversi meccanismi d'azione**

Es. *Botrytis cinerea* resistente ai benzimidazoli alle dicarbossimmidi.

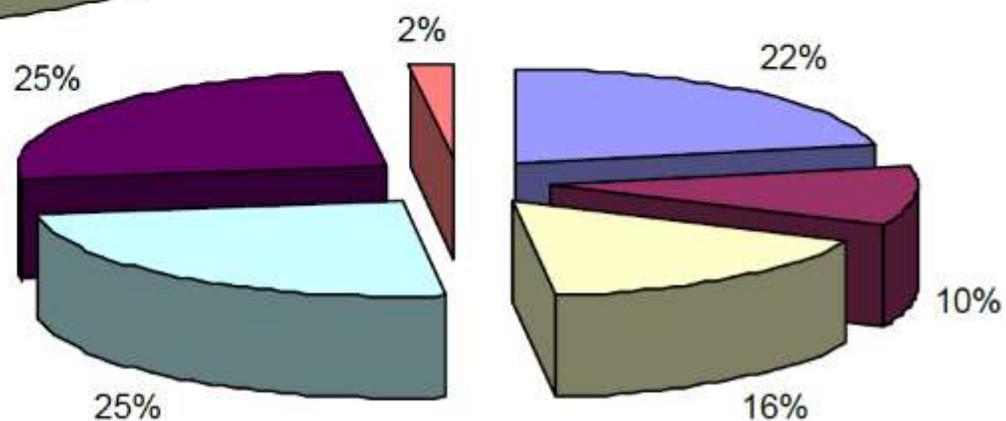
Tipo di resistenza	Descrizione	Esempio
<b>Resistenza incrociata</b>	Resistenza a due o più principi attivi grazie allo stesso meccanismo di resistenza.	Peronospora della patata e del pomodoro ( <i>Phytophthora infestans</i> ): isolati resistenti a metalaxyl e benalaxyl.
<b>Resistenze multiple</b>	Resistenza a più principi attivi dovuta alla somma di differenti meccanismi di resistenza creatisi nella popolazione fungina.	Septoriosi del frumento ( <i>Septoria tritici</i> ): isolati resistenti a strobilurine e triazoli.

# Resistenza multipla

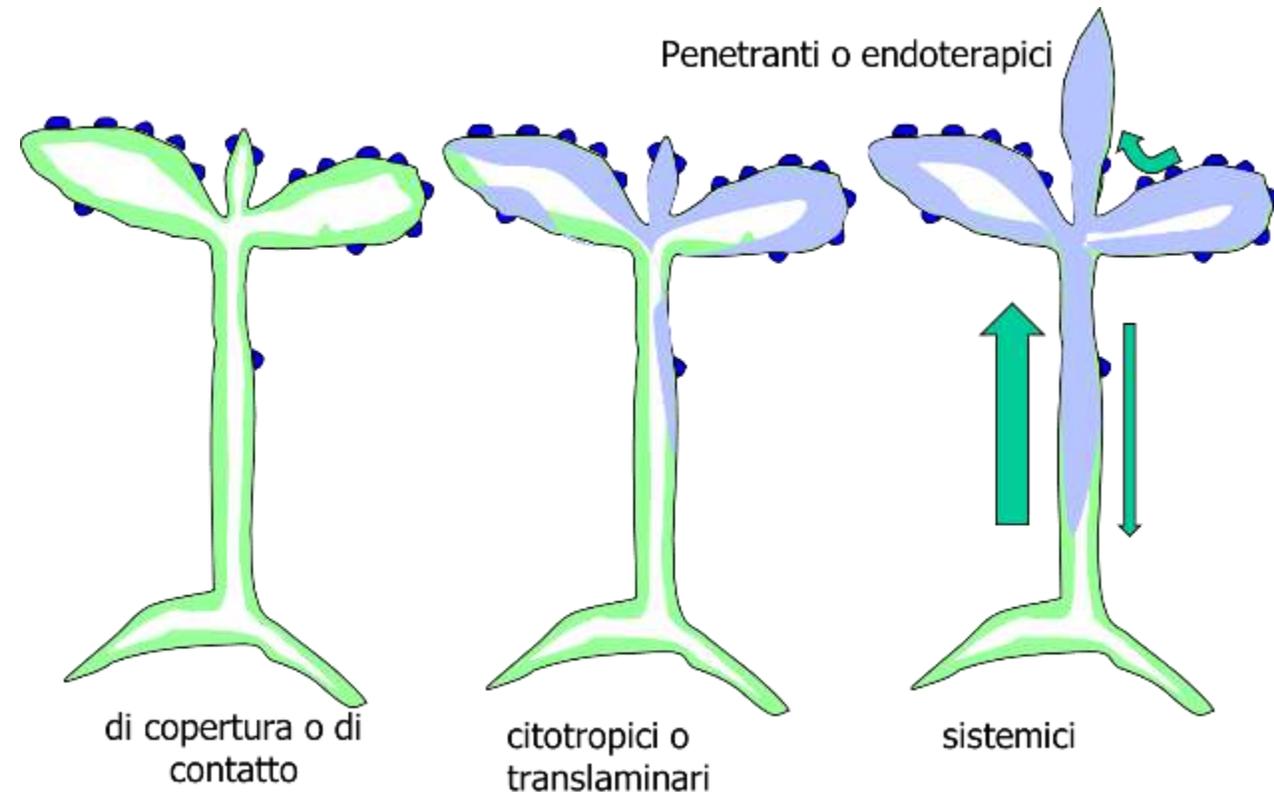
*Botrytis cinerea*



**Fragola**  
431 isolati

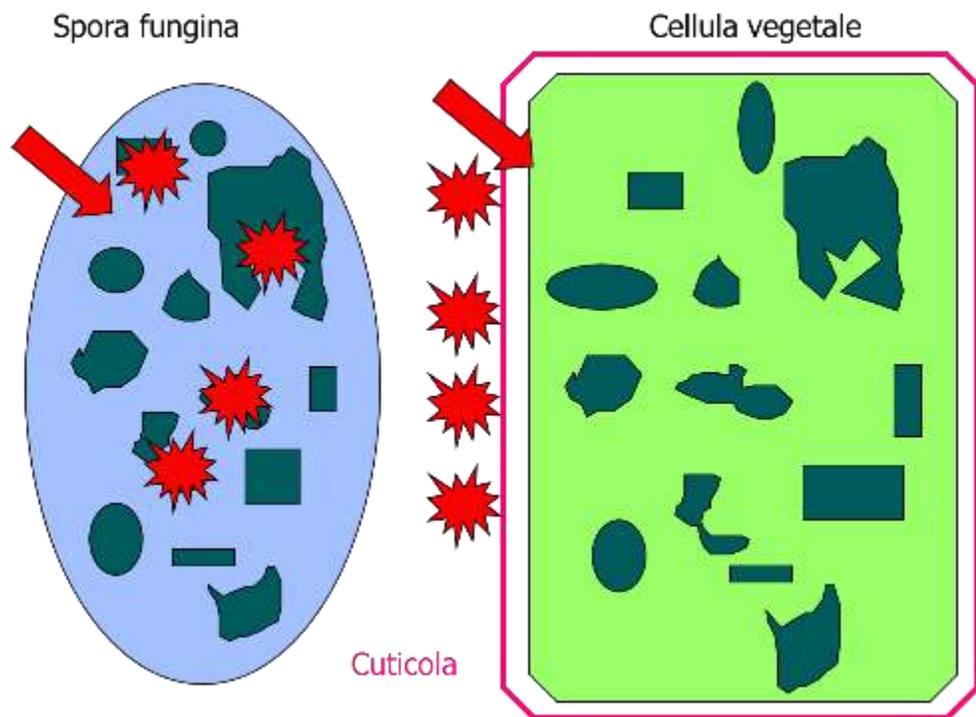


- Il fenomeno della resistenza
- **Meccanismi dei fungicidi**
- Meccanismi della resistenza
- Rischio di resistenza
- Valutazione della resistenza
- Gestione della resistenza
- Casi concreti



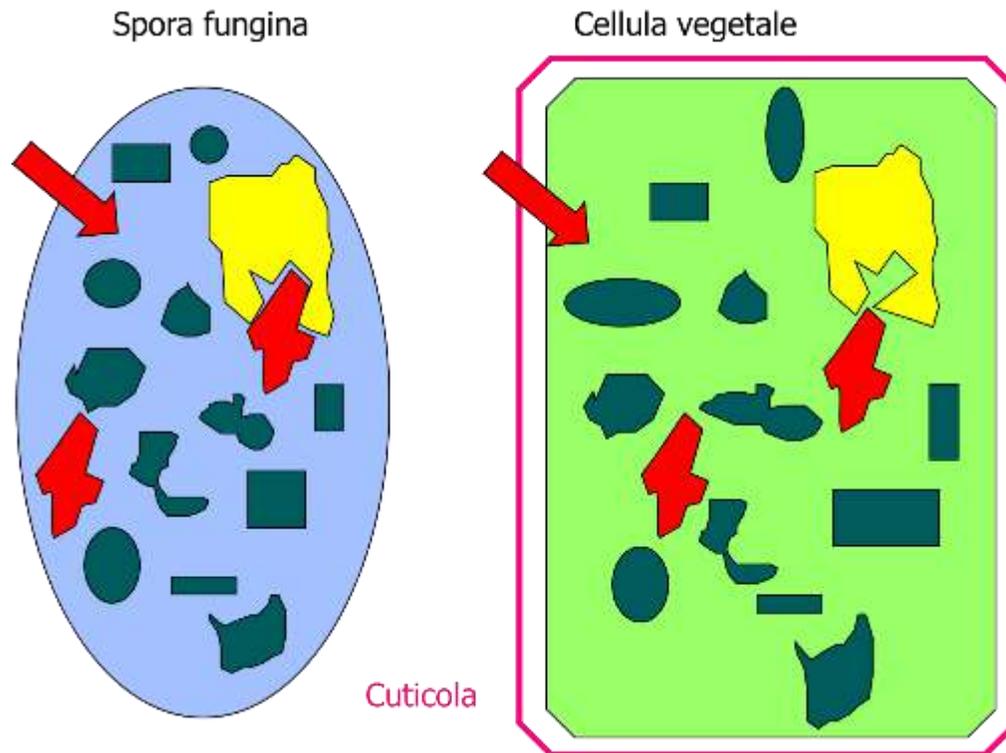
# Fungicidi monosito e multisito

## Fungicida multisito



Fungicida di copertura  
Esclusivamente preventivo  
Può essere dilavato

## Fungicidi monosito

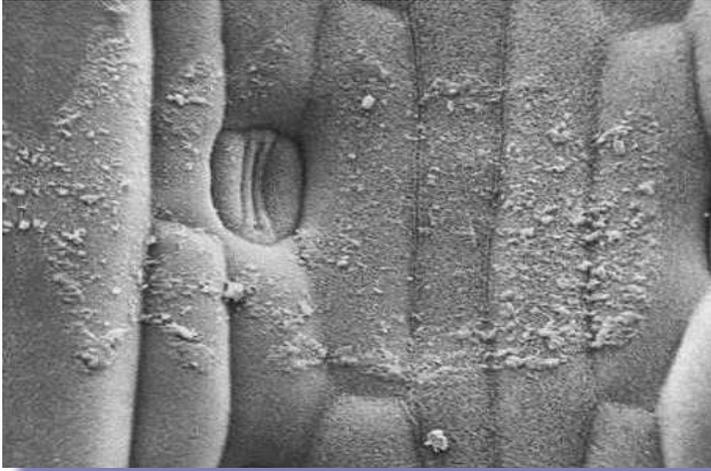


Fungicida sistemico  
Preventivo e curativo  
Meno soggetto al dilavamento

# Meccanismo di azione e rischio di resistenza

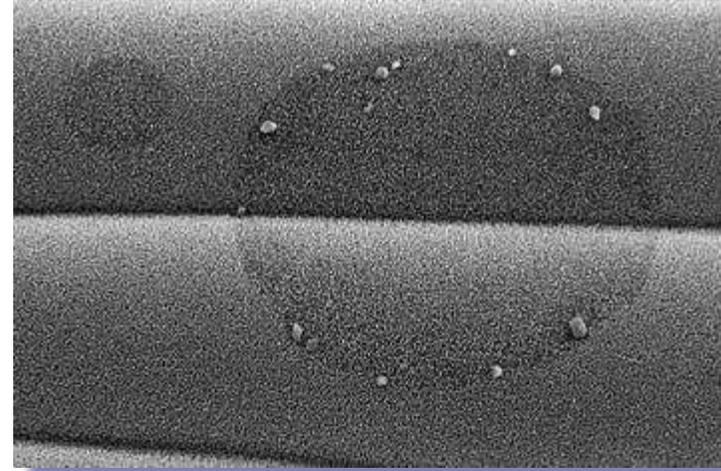


## Fungicida multisito



- Intervalli di applicazione più brevi
- Ampio spettro
- **Rischio di resistenza più basso**
- Esempi: folpet, rame.

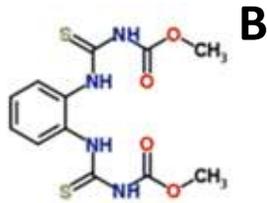
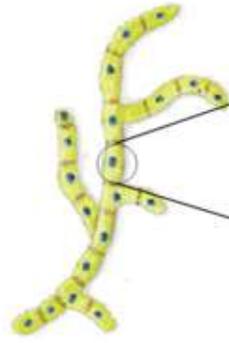
## Fungicida monosito



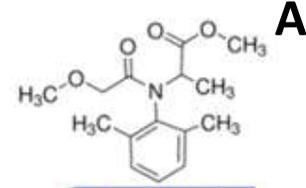
- Intervalli di applicazione più lunghi
- Selettivo
- **Rischio di resistenza più alto**
- Esempio: strobilurine

# Meccanismi di azione dei fungicidi

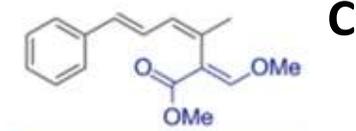
1. Cell wall
2. Plasma membrane
3. Cytoplasm
4. Nucleus
5. Mitochondria
6. Endoplasmic reticulum
7. Ribosomes
8. Golgi body
9. Lysosome
10. Vacuole



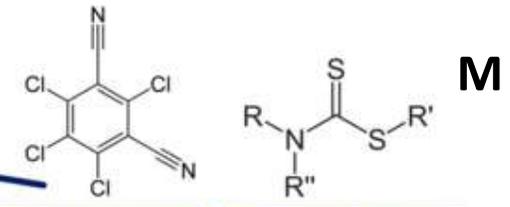
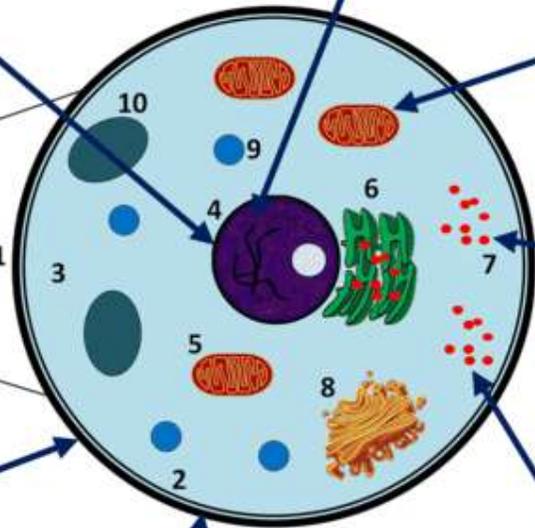
**Thiophanate methyl**  
Affects nuclear division



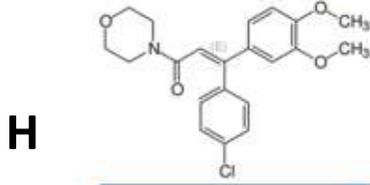
**Metalaxyl**  
Affects nucleic acid synthesis



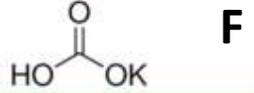
**Strobilurins**  
**Sulfur based fungicides**  
Affects mitochondrial functions



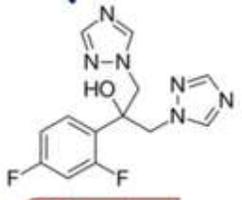
**Chlorothalonil**    **Dithiocarbamates**  
**Copper based fungicides**  
Affects functions of proteins and enzymes



**Dimethomorphs**  
Affects cell wall functions



**Kaligreen (Potassium bicarbonate)**  
Affects plasma membrane functions



**Triazoles**  
Affects sterol synthesis

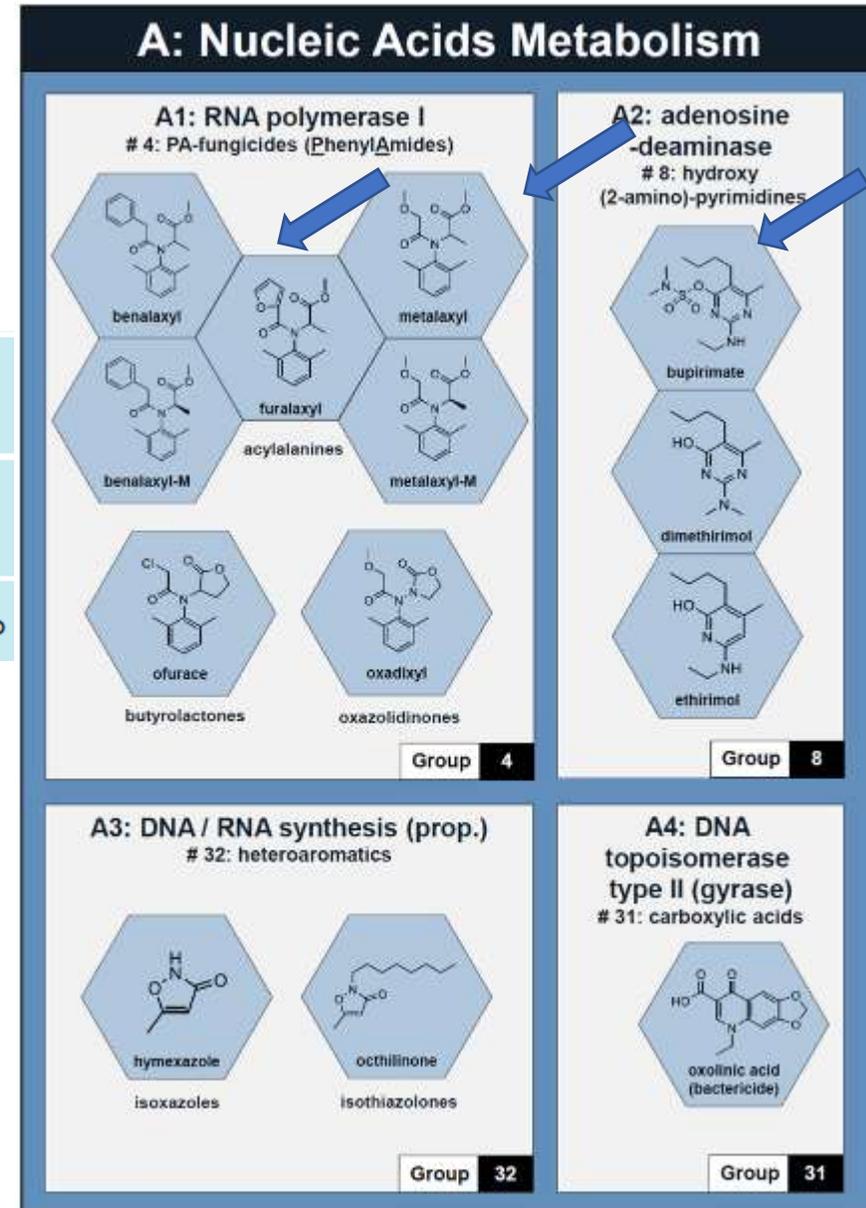
**G**

12 gruppi: A, B, C, D, E, F, G, H, U, M, P, BM

# Gruppo A: sintesi degli acidi nucleici



Inibizione della sintesi di acidi nucleici	Inibizione dell'enzima RNA polimerasi I	Fenilamidi (Acilalanine)	Metalaxyl, Metalaxyl M Benalaxyl, Benalaxyl M	Peronospora	ALTO
	Inibizione dell'enzima adenosin-deaminasi	Idrossipirimidine	Bupirimate	Oidi	MEDIO
	Sintesi DNA/RNA (proposto)	Isoxazoli	Hymexazole	Concia semi (Oomiceti)	Non conosciuto

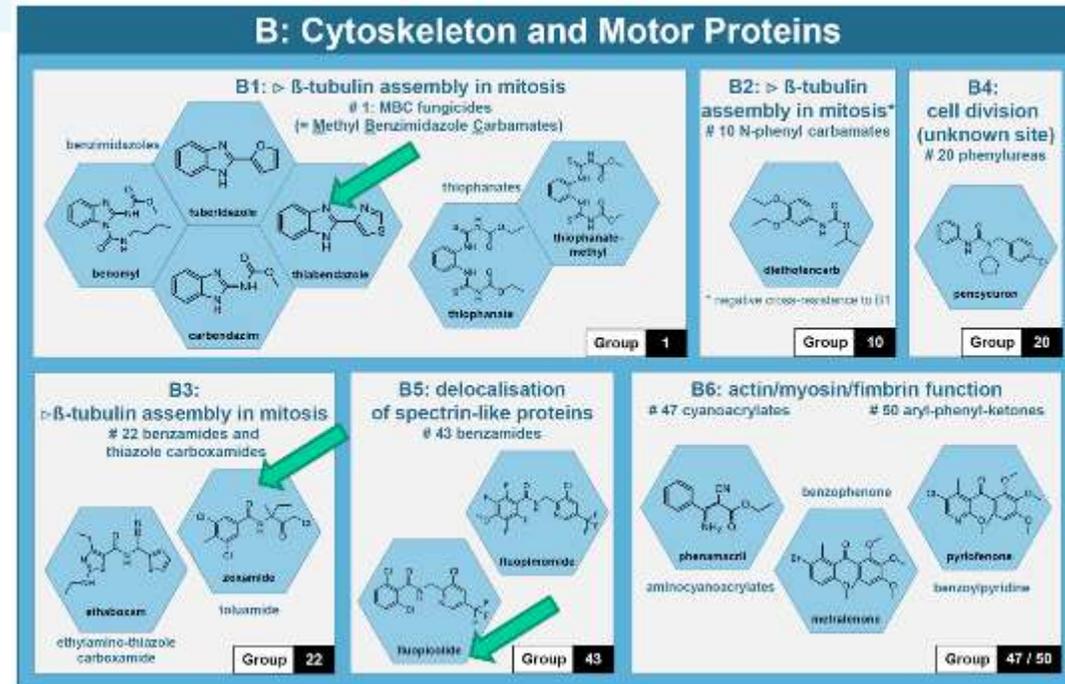


# Gruppo B: citoscheletro e proteine motrici



## INIBIZIONE FORMAZIONE CITOSCHELETRO E PROTEINE DI MOVIMENTO

Meccanismo d'azione	Gruppo chimico	Principio attivo	Impieghi principali	Rischio resistenza
Blocco dell'assemblaggio della $\beta$ -tubulina nei microtubuli dei fusi cromatici (mitosi)	Benzimidazoli	Thiabendazole	Marciumi post-raccolta pomacee, agrumi e patate da seme	ALTO (sostituzioni aminoacidiche più comuni E198A/G/K, F200Y nel gene della $\beta$ -tubulina)
	Benzamidi	Zoxamide	Peronospora	DA BASSO A MEDIO
Delocalizzazione proteine della membrana	Benzamidi	Fluopicolide	Peronospora	MEDIO
Alterazione actina, miosina e fimbrina	Aril-fenil-chetoni	Metrafenone e Pyriofenone	Oidio vite	MEDIO



# Gruppo C2: inibitori della respirazione cellulare



INIBITORI DELLA RESPIRAZIONE CELLULARE			
Gruppo chimico	Principio attivo	Impieghi principali	Rischio resistenza
Piridin-carboxamidi	Boscalid	Muffa grigia, Oidi, Ticchiolatura pomacee, Maculatura bruna pero, Sclerotinie	DA MEDIO A ALTO (varie mutazioni nel gene SDH con molteplici sostituzioni aminoacidiche: H/Y o H/L in posizione 257, 267, 272, P225L in funzione dei patogeni interessati)
Pirazole-4-Carbossamidi	Penthiopyrad	Muffa grigia, Sclerotinia, Ticchiolatura pomacee, Maculatura bruna pero	
	Fluxapyroxad, Sedaxane	Concia semi cereali (Septoriosi, funghi del "Mal del piede"), Maculatura bruna pero, Oidi, Ticchiolatura pomacee, <i>R. solani</i>	
	Isopyrazam, Bixafen, Benzovindiflupyr	Malattie fogliari cereali (fusariosi, septoriosi, ruggini, oidio)	
Piridinil-etil-benzamidi	Fluopyram	Muffa grigia vite	
Fenil-oxo-etil tiofene amidi	Isofetamid	Muffa grigia vite e fragola, Moniliosi	
Fenil-benzamidi	Flutolanil	<i>Rhizoctonia solani</i>	

# Gruppo C3: inibitori della respirazione cellulare



QI Inibizione del complesso III della catena respiratoria	QoI (Quinone outside Inhibitors)	Analoghi delle strobilurine	Metossiacrilati	Azoxystrobin Pycoxystrobin	Peronosspore vite e orticole Oidi, Alternariosi Malattie fogliari cereali	ALTO (mutazioni nel gene del citocromo b con sostituzioni, principalmente, G143A ma anche F129L)
			Metossicarbammati	Pyraclostrobin	Oidi, Maculatura bruna pero	
			Oxymino-acetamidi	Kresoxim-methyl Trifloxystrobin	Oidi, Ticchiolatura pomacee, Maculatura bruna pero	
			Diidro-dioxazine	Fluoxastrobin	Concia seme frumento	
	Oxazolidinedioni	Famoxadone	Peronosspore e alternariosi delle orticole			

# Gruppo C: inibitori della respirazione cellulare



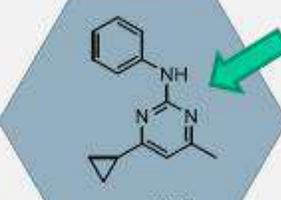
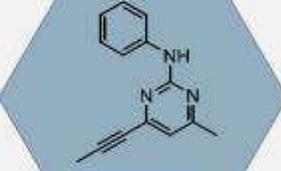
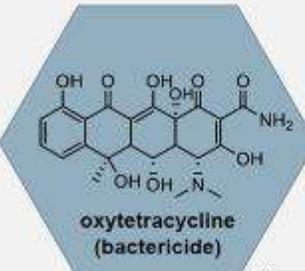
QiI (Quinone inside Inhibitors)	Cianoimidazoli	Cyazofamid	Peronospora vite e orticole	DA MEDIO A ALTO
	Sulfamoiltriazololi	Amisulbrom	Peronospora vite	
QoSI (Quinone outside Inhibitors Stigmatellin binding site)	Triazolopirimidilamine	Ametoctradin	Peronospora vite e orticole	DA MEDIO A ALTO

Disaccoppianti della fosforilazione ossidativa	Dinitrofenil-crotonati	Meptyldinocap	Oidi vite e orticole	Non conosciuto
	2,6-dinitro-aniline	Fluazinam	Muffa grigia, Peronospora solanacee, Ticchiolatura pomacee, Maculatura bruna pero	BASSO
Inibizione trasporto di ATP	Tiofene carbossamidi	Siltiofam	Concia semi cereali (funghi del "Mal del piede")	BASSO

# Gruppo D: inibitori della sintesi di aminoacidi



## D: Amino Acid and Protein Synthesis

<p><b>D1: methionine biosynthesis (cgs gene) (proposed)</b> # 9 Anilino-Pyrimidines ( AP fungicides )</p> <div style="text-align: center;">  <p>cyprodinil</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>mepanipyrim</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>pyrimethanil</p> </div> <p style="text-align: right;"><b>Group 9</b></p>	<p><b>D2: protein synthesis (ribosome, termination step)</b> # 23 enopyranuronic acid</p> <div style="text-align: center;">  <p>blasticidin-S</p> </div> <p style="text-align: right;"><b>Group 23</b></p>	<p><b>D3: protein synthesis (ribosome, initiation step)</b> # 24 hexopyranosyl antibiotics</p> <div style="text-align: center;">  <p>kasugamycin</p> </div> <p style="text-align: right;"><b>Group 24</b></p>
<p><b>D4: protein synthesis (ribosome, initiation step)</b> # 25 glucopyranosyl antibiotics</p> <div style="text-align: center;">  <p>streptomycin (bactericide)</p> </div> <p style="text-align: right;"><b>Group 25</b></p>	<p><b>D5: protein synthesis (ribosome, elongation step)</b> # 41 tetracycline antibiotics</p> <div style="text-align: center;">  <p>oxytetracycline (bactericide)</p> </div> <p style="text-align: right;"><b>Group 41</b></p>	

Inibizione della sintesi di aminoacidi

Inibizione della sintesi della metionina

AnilinoPirimidine (AP)

Cyprodinil, Pyrimethanil  
Mepanipyrim

Ticchiolatura pomacee, Muffa grigia, Moniliosi

MEDIO

# Gruppo E: perturbatori della trasduzione di segnali

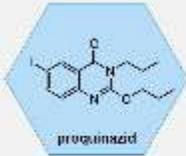
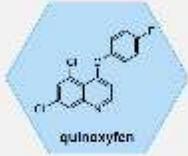


## E: Signal Transduction

### E1: signal transduction (mechanism unknown) #13 azanaphthalenes

aryloxyquinoline

quinazolinone



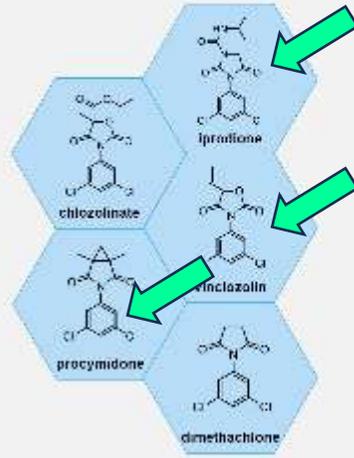
Group 13

### E2: osmotic signal transduction ▷ MAP / histidine-kinase (os-2, HOG1) # 12 phenylpyrroles (PP- fungicides)



Group 12

### E3: osmotic signal transduction ▷ MAP / histidine kinase (os-1, Daf1) # 2 dicarboximides

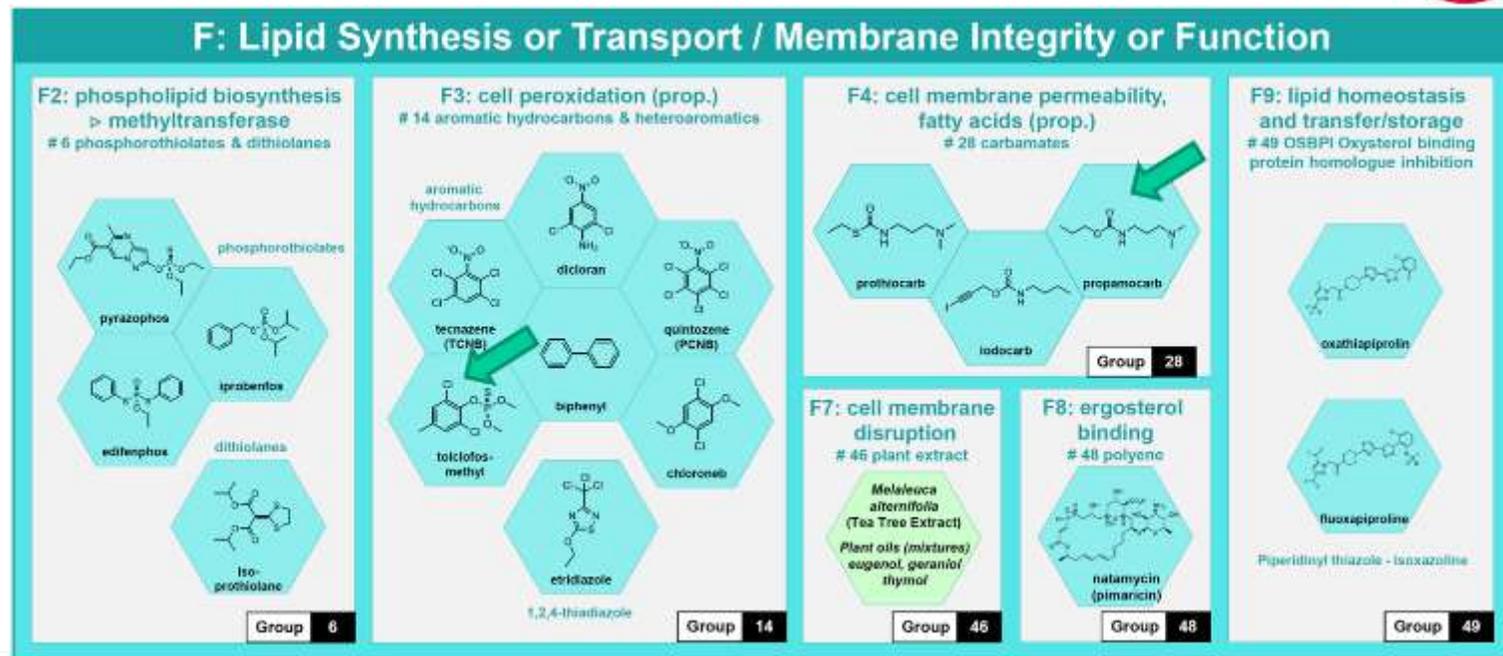


Group 2

## PERTURBATORI DELLA TRASDUZIONE DI SEGNALI CELLULARI

Meccanismo d'azione	Gruppo chimico	Principio attivo	Impieghi principali	Rischio resistenza
Interferenze su una proteina coinvolta nei segnali iniziali di riconoscimento cellulare (meccanismo non noto)	Azanaftaleni (Quinazolinone)	Proquinazid	Oidio vite (specifico)	MEDIO
Interferenze con l'enzima istidina-kinasi nella trasmissione del segnale osmotico (geni os-2, HOG1)	Fenilpirroli	Fludioxonil	Muffa grigia, Moniliosi, Maculatura bruna pero	DA BASSO A MEDIO
Interferenze con l'enzima istidina-kinasi nella trasmissione del segnale osmotico (geni os-1, Daf1)	Dicarbossimidi (revocati in UE)	Procimidone, Iprodione, Clozoxinate, Vinclozolin	Muffa grigia, Maculatura bruna pero, Moniliosi	DA MEDIO A ALTO (molte mutazioni nel gene os-1 con sostituzione, principalmente, I365S)

# Gruppo F: inibitori di sintesi e trasporto di lipidi, funzionalità di membrana

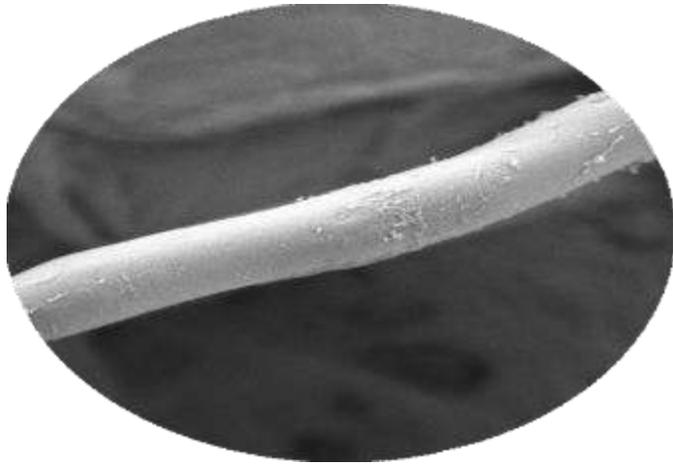


Inibizione della sintesi e trasporto lipidi, funzionalità membrana	Interferenze sulla perossidazione dei lipidi	Idrocarburi Aromatici (AH)		Tolclofos methyl	Patogeni terricoli (marciumi vari) Seme, terreno, coltura	DA BASSO A MEDIO
	Interferenze sulla sintesi degli acidi grassi e sulla permeabilità della membrana	Carbammati		Propamocarb	Oomiceti terricoli e radicali (terreno, concia), alcuni fogliari	DA BASSO A MEDIO
	Inibizione della proteina legante gli oxisteroli di membrana	OSBPI (Oxysterol binding protein homologue inhibition)	Piperidinil-tiazoli-isoxazolinoni	Oxathiapiprolin	Peronospora	Presumibilmente MEDIA (principio attivo di recentissima introduzione sul mercato)
	Distuttori membrana cellulare	Estratti di piante	Terpeni vari	Eugenolo, Timolo, Geraniolo (singoli o in miscela), olio di arancio dolce	Muffa grigia, Oidi	Non conosciuto

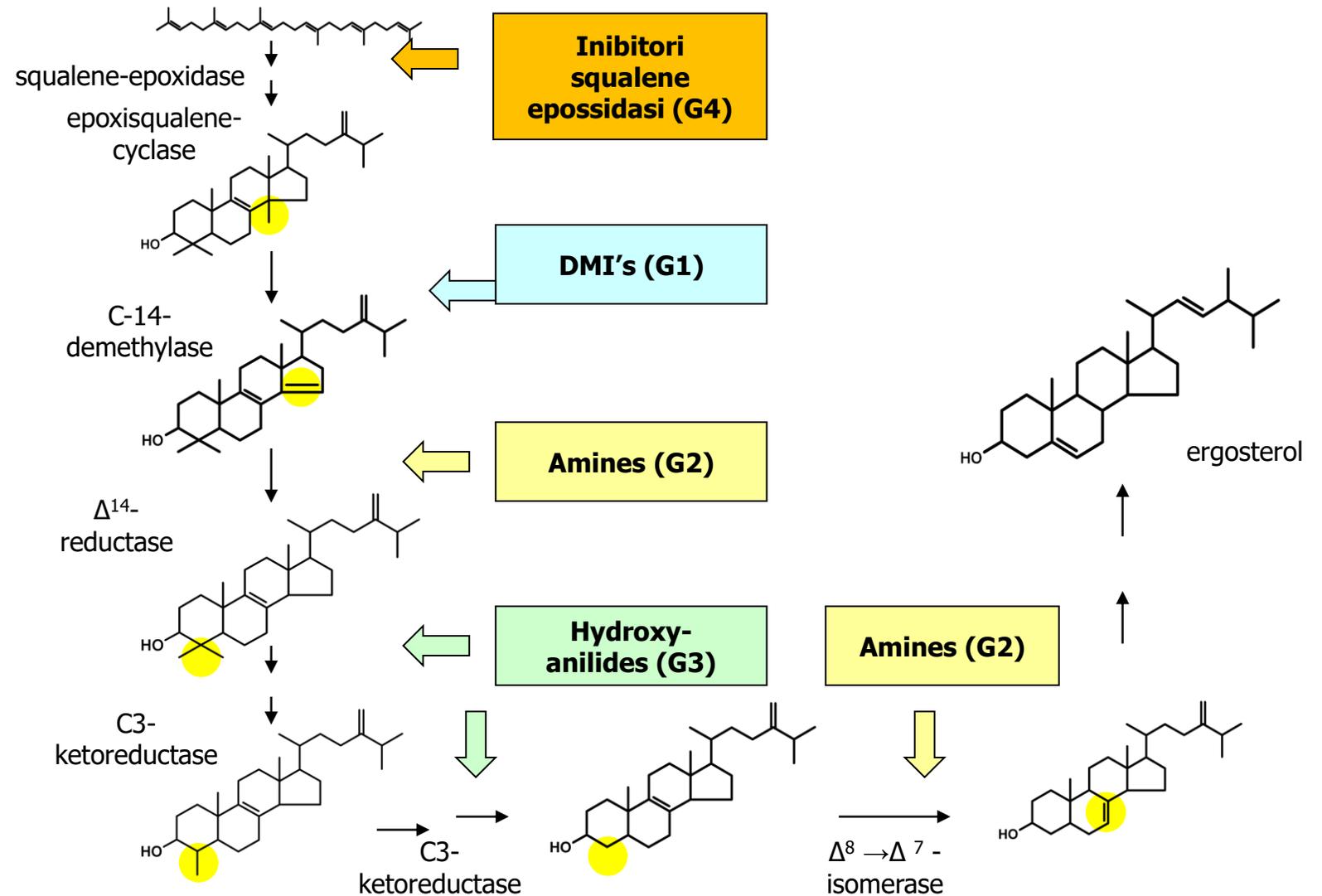
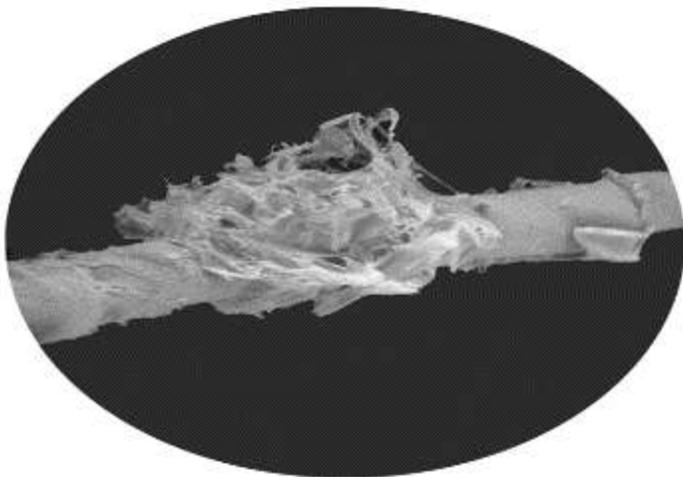
# Gruppo G: inibitori della sintesi di steroli di membrana



Non trattato



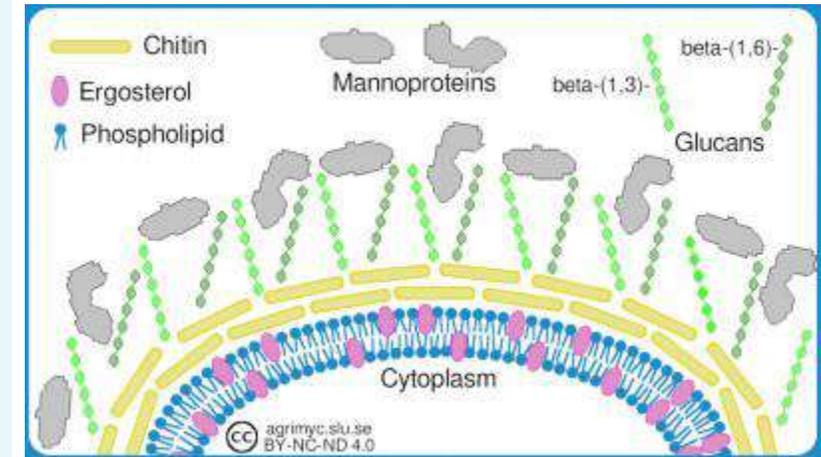
Trattato



# Gruppo G: inibitori della sintesi di steroli di membrana



Meccanismo d'azione	Gruppo chimico	Principio attivo	Impieghi principali	Rischio resistenza	
IBS Inibizione della sintesi degli steroli di membrana	Classe 1 (DMI) Inibizione dell'enzima C-14 demetilasi	Imidazoli	Prochloraz	Funghi del "Mal del piede" e fusariosi cereali, Cercospora e oidio bietola, Fusariosi ornamentali	MEDIO (meccanismi di resistenza complessi sia "target site" sia metabolici. Nei primi sono coinvolte mutazioni nel gene <i>cyp51</i> (numerose sostituzioni tra cui V136A, Y137F, A379G, ecc.), nei secondi sono da ricordare gli "ABC transporters") Resistenze generalmente parzialmente incrociate
			Imazalil	Marciumi post-raccolta agrumi	
			Penconazole Difenoconazole Tetraconazole Mefentrifluconazole	Oidi Ticchiolatura pomacee Maculature fogliari varie Malattie cereali	
			Tebuconazole	Idem + Moniliosi	
			Triticonazole Prothioconazole	Concia seme frumento	
			Classe 2 Inibizione degli enzimi $\Delta^8 \Delta^7$ isomerasi e $\Delta^{14}$ riduttasi (geni <i>erg24</i> , <i>arg2</i> )	Morfoline	
	Piperidine	Fenpropidin	Cercospora e oidio bietola		
	Spiroketalamine	Spiroxamine	Oidio vite		
	Classe 3 (KRI) Inibizione dell'enzima 3-chetoriduttasi (gene <i>erg27</i> )	Idrossianilidi	Fenhexamid	Muffa grigia e Moniliosi	DA BASSO A MEDIO
		Amino-pirazolinoni	Fenpyrazamine	Muffa grigia	



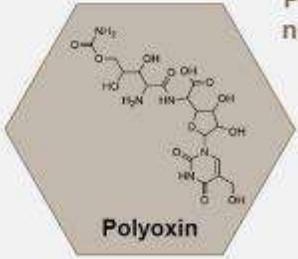
# Gruppo H: inibitori della sintesi di parete cellulare



## H: Cell Wall Biosynthesis

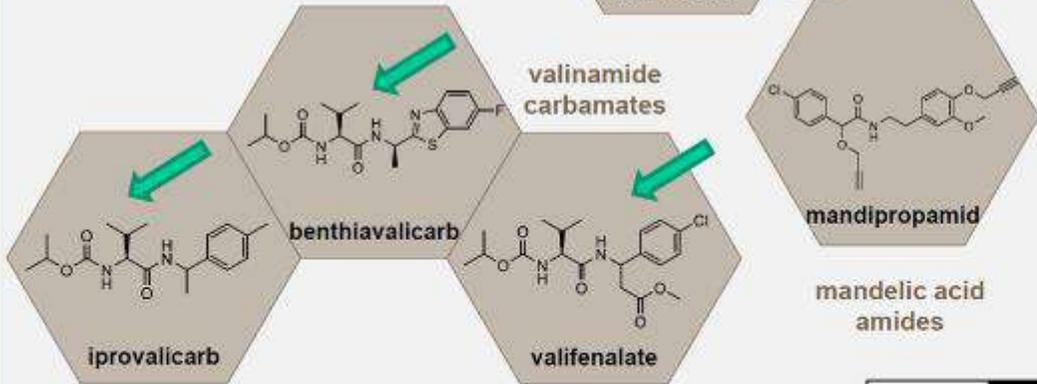
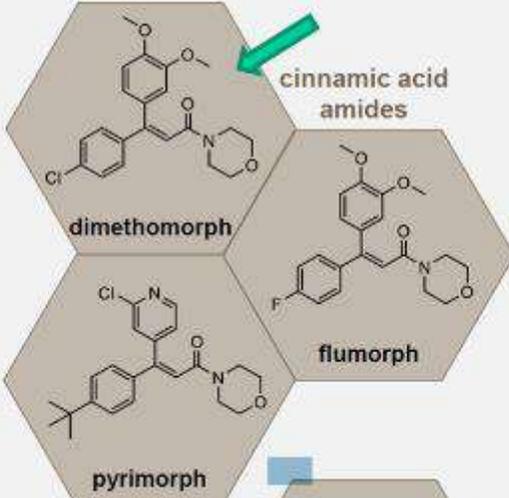
### H4: chitin synthase # 19 Polyoxins

Peptidyl  
Pyrimidine  
nucleoside



Group 19

### H5: cellulose synthase # 40 Carboxylic Acid Amides (CAA fungicides)



Group 40

H: BIOSINTESI DELLA PARETE	H5	Fungicidi CAA (Ammidi dell'acido carbossilico)	Ammidi dell'acido cinnamico	dimetomorf	Resistenza nota in <i>Plasmopara viticola</i> . Resistenza incrociata mostrata tra tutti i membri del gruppo CAA.
			Carbammati valinamide	bentiavalicarb iprovalicarb valifenalate	
			Ammidi dell'acido mandelico	mandipropamid	Da basso a medio rischio.

# Gruppo U: meccanismo di azione non noto



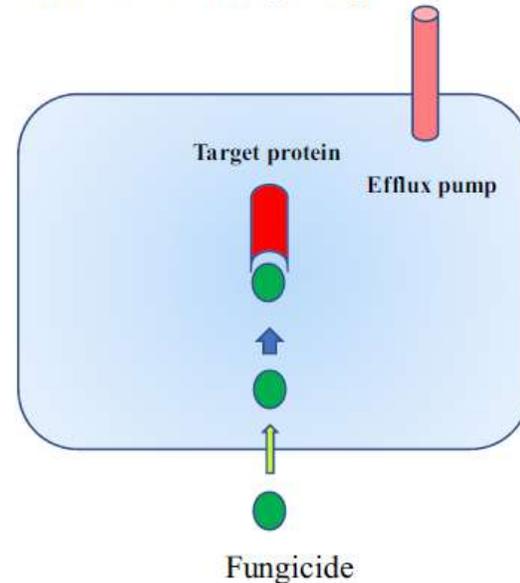
## MECCANISMO DI AZIONE SCONOSCIUTO

Meccanismo d'azione	Gruppo chimico	Principio attivo	Impieghi principali	Rischio resistenza
Alterazione membrane mitocondriale e citoplasmatica (meccanismi non chiariti)	Guanidine	Dodina	Bolla pesco, Ticchiolatura pomacee, Occhio di pavone olivo	DA BASSO A MEDIO
Meccanismo non chiarito	Cianocetamidi-oxime	Cymoxanil	Peronospora	DA BASSO A MEDIO
Meccanismo non ancora noto	Fenilacetamidi	Cyflufenamid	Oidio vite e orticole	ALTO

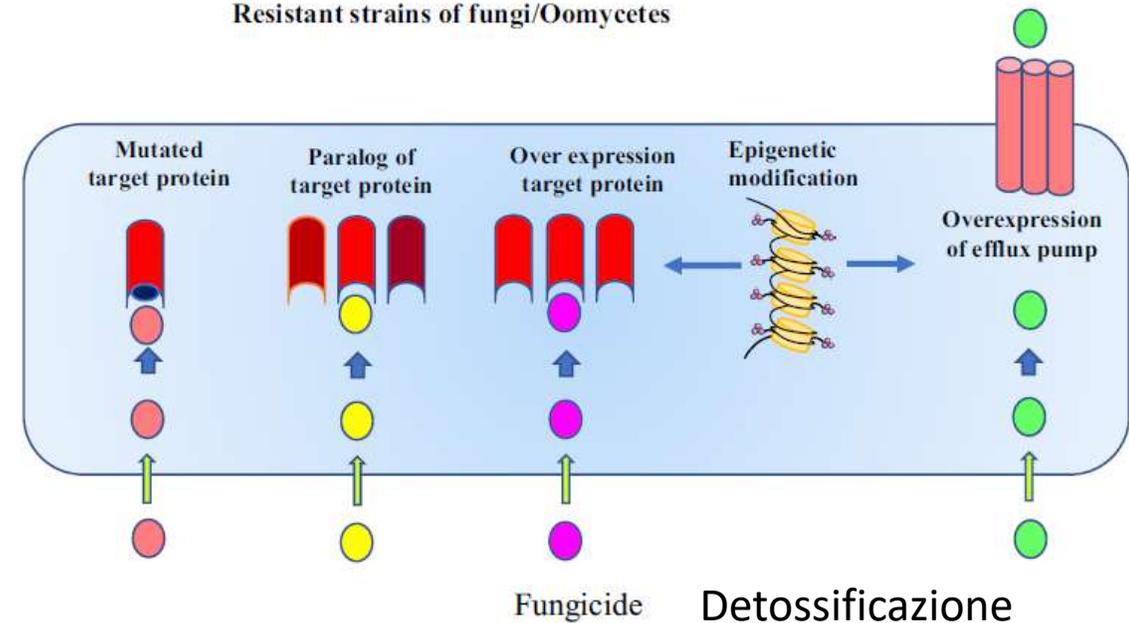
# Sommario

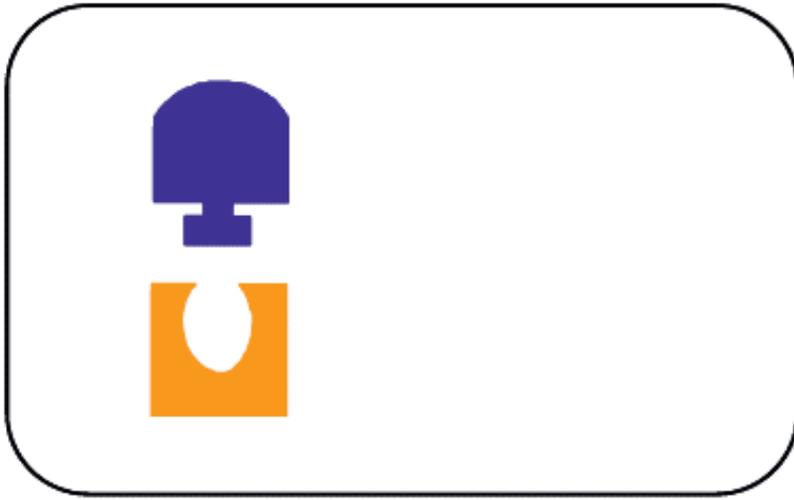
- Il fenomeno della resistenza
- Meccanismi dei fungicidi
- **Meccanismi della resistenza**
- Rischio di resistenza
- Valutazione della resistenza
- Gestione della resistenza
- Casi concreti

Sensitive strains of fungi/Oomycetes



Resistant strains of fungi/Oomycetes





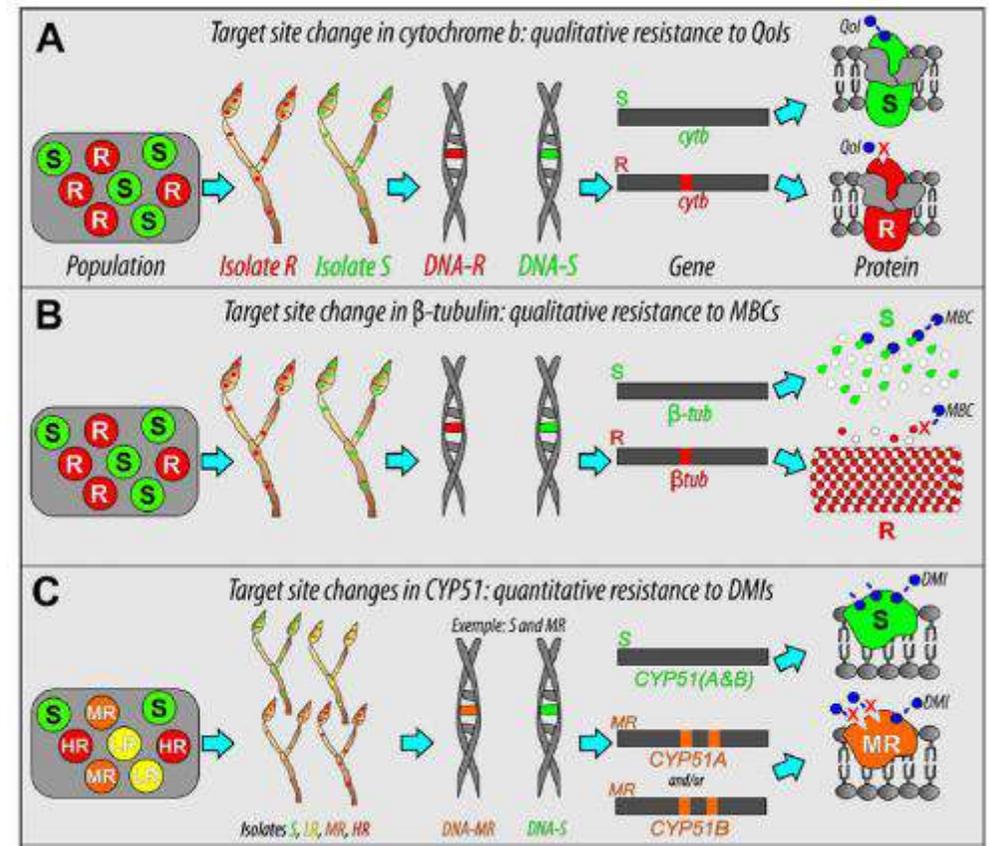
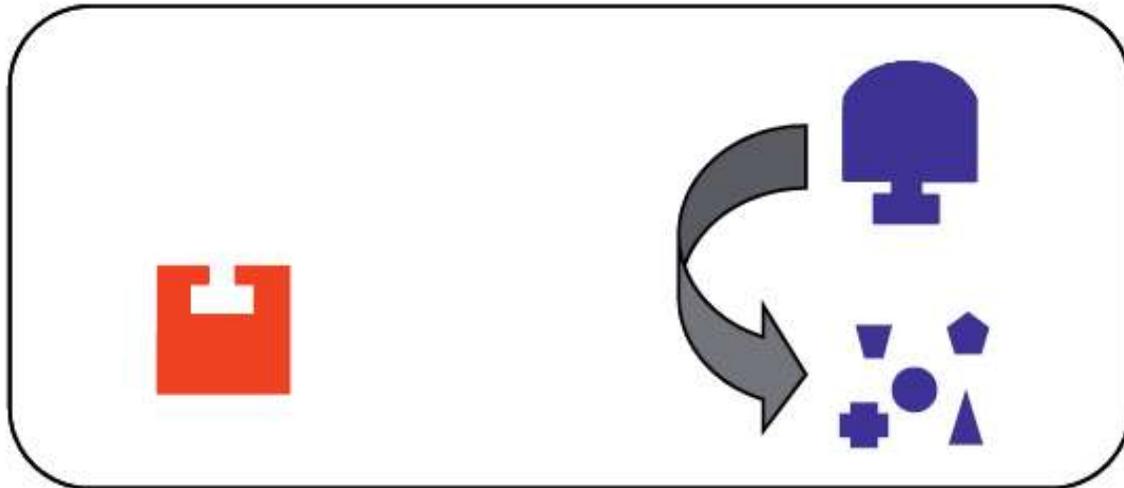
# Meccanismi molecolari

## Modificazione del target

Il target si modifica. Il fungicida non può più legarsi con il suo target o vi si lega con affinità ridotta.

Esempio: strobilurine, triazoli, inibitori della succinato deidrogenasi (SDHI).

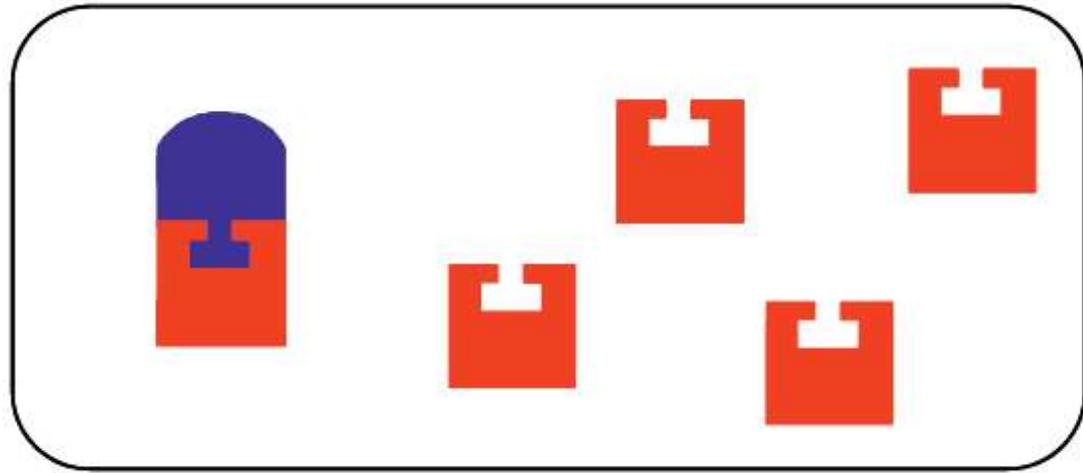
## Mutazioni SNPs



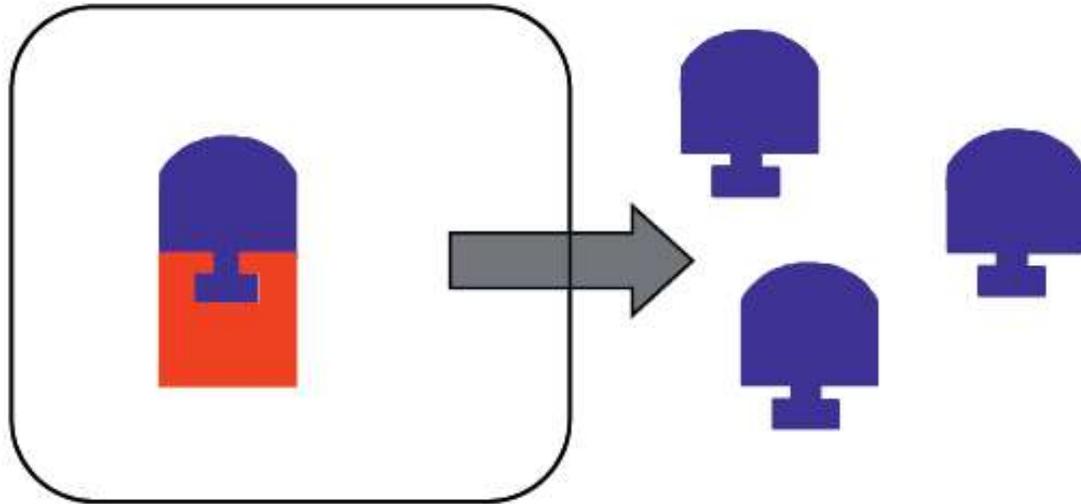
## Detossicazione metabolica

Il principio attivo viene degradato attivamente. Avviene molto raramente nei funghi.

# Meccanismi molecolari



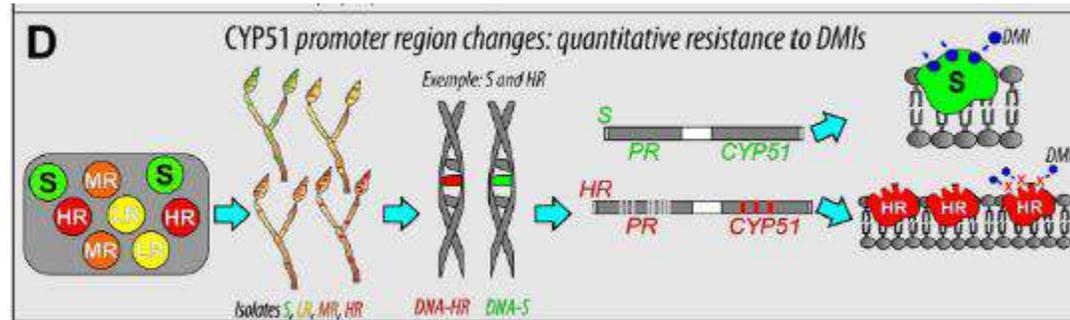
**Sovraespressione del gene target**  
**Duplicazione del gene target**



## Moltiplicazione del target

La cellula aumenta la produzione della molecola bersaglio, che risulta sovrabbondante rispetto alle molecole di fungicida.

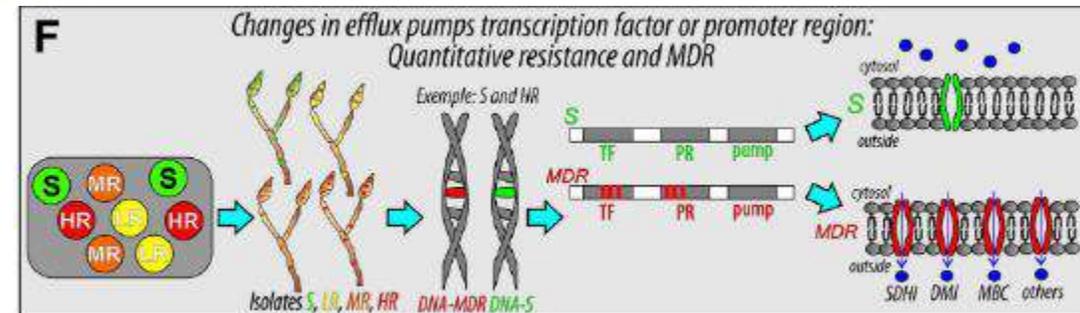
Esempio: triazoli.



## Escrezione del fungicida

Alcune pompe espellono il fungicida all'esterno della cellula, riducendo la quantità di principio attivo.

Esempio: triazoli.



# Sommario

- Il fenomeno della resistenza
- Meccanismi dei fungicidi
- Meccanismi della resistenza
- **Rischio di resistenza**
- Valutazione della resistenza
- Gestione della resistenza
- Casi concreti



# Rischio intrinseco legato al fungicida



## Livello di rischio intrinseco di resistenza dei fungicidi secondo il FRAC

Benzimidazolici Fenilamidi (acilalanine) Qol	<b>ELEVATO</b>
Dicarbossimidi Qil, Qxl (ametoctradin) SDHI	<b>MEDIO - ELEVATO</b>
DMI (Triazoli, Imidazoli), Bupirimate, Anilinopirimidine Quinoxifen e Proquinazid Metrafenone	<b>MEDIO</b>
Altri IBS (Spiroxamine, Fenhexamid, Fenpropidin) Dodina, Cymoxanil, CAA, Zoxamide, Propamocarb, Fludioxonil	<b>MEDIO - BASSO</b>
Fosetyl-Al, Fluazinam, Tradizionali multisito	<b>BASSO</b>

I fattori di stima da tenere conto sono principalmente legati al tipo di fungicida impiegato o “rischio intrinseco”.

**Caratteristiche intrinseche della molecola:**  
- meccanismo d’azione: multisito < unisito  
- predisposizione ai vari meccanismi di disattivazione

**12 gruppi: A, B, C, D, E, F, G, H, U, M, P, BM**

# Fattori legati al patogeno

Caratteristiche biologiche dell'organismo: rischi proporzionali a:

**N. generazioni:** se l'agente patogeno compie un ciclo vitale molto breve e con poche generazioni, o se (es. le peronosspore) è in grado, di compiere molte generazioni nel corso della stagione vegetativa

## Capacità di diffusione

**Produzione spore:** se possiede una elevata fecondità

**Variabilità genetica:** se ha ampia variabilità genetica, ha capacità di esprimere mutazioni

**Fitness dei ceppi resistenti:** se vi sono ceppi resistenti dotati di una elevata fitness o competitività

**Metabolismo:** se possiede la capacità di metabolizzare la s.a.

**Resistenza incrociata:** se è in grado potenzialmente di sviluppare una resistenza incrociata

Fattore	Peso
N. di generazioni	X 4
Dispersione spore	X 3
Produzione spore	X 2
Storia resistenza	X 2
Frequenza di manifestazione e protezione	X 3
<b>Totale</b>	<b>(<math>\Sigma</math>)</b>

Punteggio	Classe di rischio
14-34	I = basso
35-59	II = medio
>60	III = alto

# Rischio intrinseco legato al patogeno



Classi di rischio intrinseco di resistenza ai fungicidi da parte dei patogeni da EPPO, FRAC adattato

<b>RISCHIO ELEVATO</b>	<i>Plasmopara viticola</i> , <i>Pseudoperonospora cubensis</i> , <i>Phytophthora infestans</i> (fenilamidi) <i>Botrytis cinerea</i> <i>Venturia</i> spp. <i>Podosphaera xanthii</i> e specie correlate, <i>Blumeria graminis</i> <i>Penicillium</i> spp.
<b>MEDIO</b>	<i>Phytophthora infestans</i> (altri prodotti), <i>Peronospora destructor</i> , <i>Bremia lactucae</i> , <i>Erysiphe necator</i> , <i>Cercospora</i> spp. <i>Monilinia</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Stemphylium vesicarium</i> , <i>Septoria tritici</i>
<b>BASSO</b>	<i>Puccinia</i> spp. e altri agenti di ruggine <i>Alternaria</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp. Patogeni terricoli e del seme



# Pratiche agronomiche e fattori ambientali



Le **pratiche agronomiche** possono concorrere ad aumentare i rischi di insorgenza di resistenza.

- rotazioni corte applicate alle colture estensive monocoltura
- uso di cv suscettibili al patogeno
- concimazione e irrigazione
- isolamento geografico della popolazione del patogeno: più è isolata la coltura (distanza da altre colture, **serre**, tunnel ecc.), inferiore è la possibilità di introduzione di individui sensibili e di perdita delle forme resistenti
- mancanza di metodi alternativi di contenimento del patogeno

## **Modo d'impiego:**

- frequenza delle applicazioni: rischio proporzionale al numero
- tipo di applicazione: preventivo < curativo < eradicante
- applicazione singola < a. in miscela o alternanza con p.a. a diverso meccanismo d'azione
- applicazione su vaste aree > in aree confinate

**Fattori ambientali** in senso favorevole allo sviluppo e alla moltiplicazione del patogeno

- condizioni pedologiche
- andamento meteorologico (più breve il tempo per compiere una generazione, più frequente l'esposizione al fungicida, maggiore il rischio di sviluppare resistenza)



# Sommario

- Il fenomeno della resistenza
  - Meccanismi dei fungicidi
  - Meccanismi della resistenza
  - Rischio di resistenza
  - **Valutazione della resistenza**
  - Gestione della resistenza
  - Casi concreti
- 1. Saggi di sensibilità dei patogeni al p. a. in condizioni controllate**

La valutazione della resistenza ai fungicidi

- su pianta o parti di pianta: attività preventiva o curativa con inoculazione artificiale

- ***in vitro* su substrato artificiale:**

attività sull'accrescimento miceliare o sulla germinazione delle spore

- 2. Analisi genetiche sul patogeno**

ricerca di mutazioni nel DNA (es. PCR qualitativa e quantitativa)

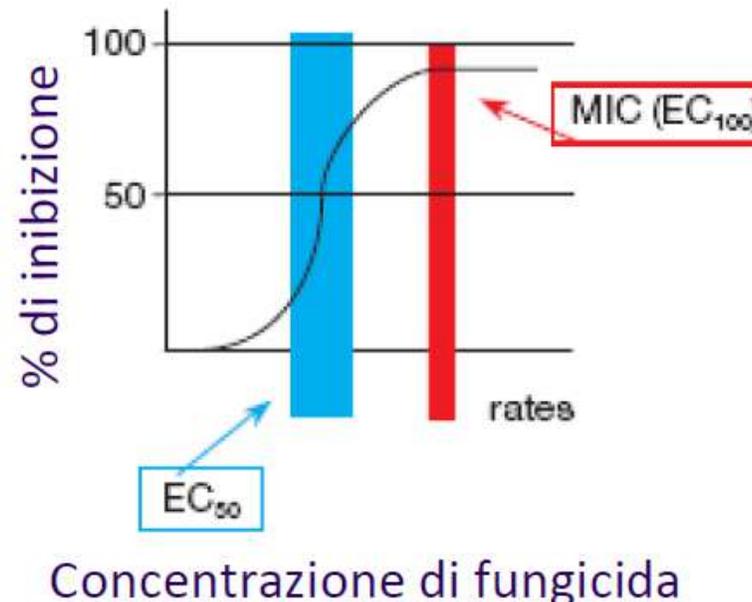
# Parametri per la valutazione

## I parametri di valutazione della resistenza dei patogeni nei saggi biologici *in vivo* e *in vitro*

EC50 (Concentrazione Efficace Mediana) mg/l (ppm)  
Concentrazione di fungicida in grado di inibire il 50% degli Individui

EC95 Dose Efficace al 95% mg/l (ppm)  
Concentrazione di fungicida in grado di inibire il 95% degli Individui

MIC (Minimum Inhibitory Concentration) o CMI  
mg/l (ppm)  
Concentrazione di fungicida che inibisce il 100% degli individui



Determinazione di una “**baseline**” ovvero una caratterizzazione fatta su base molecolare o biologica della risposta della popolazione fungina al trattamento con un fungicida prima che sia stato mai utilizzato quel p.a.

FR (Fattore di Resistenza)

$$FR = \frac{EC_{50} \text{resistenti}}{EC_{50} \text{sensibili}}$$



# Valutazione della resistenza genetica

**RESISTENZA: perdita di sensibilità nei confronti di un principio attivo in seguito a mutazione e selezione**

Le mutazioni sono presenti casualmente nella popolazione del patogeno prima dell'uso di un prodotto (frequenza mutazioni spontanee  $10^{-4}$ - $10^{-9}$ )

I fungicidi esercitano una forte pressione di selezione sulle popolazioni dei patogeni = selezione resistenza.

Meccanismo di resistenza noto

Resistenza di tipo monogenico: una mutazione in uno specifico gene è responsabile della completa perdita di efficacia di un prodotto (**Single Nucleotide Polymorphism - SNP**)

⇒ SVILUPPO DI UNA TECNICA DIAGNOSTICA IN GRADO DI DISCRIMINARE TRA ALLELE WILD TYPE E ALLELE MUTATO



# Classi di fungicidi con meccanismo d'azione specifico

<b>Classe di fungicida</b>	<b>Esempi di principi attivi</b>	<b>Enzima target</b>	<b>Meccanismo di resistenza</b>
<b>Strobilurine e composti analoghi QoI</b>	azoxystrobin, kersoxim-metile, trifloxystrobin	citocromo bc1 (inibitori della respirazione cellulare)	mutazioni nel gene <i>cyt b</i> (G143A, F129L)
<b>Benzimidazoli</b>	Benomyl	$\beta$ -tubulina (inibitori della mitosi cellulare)	mutazioni nel gene per la $\beta$ -tubulina (E198K/G/A, F200Y)
<b>Inibitori della biosintesi degli steroli (IBS)</b>	tridimenol, propiconazole, epossiconazole	C14-demetilasi (inibitori della demetilazione)	mutazione in <i>cyp51</i> (Y136F), overespressione <i>cyp51</i> , overespressione trasportatori ABC

# Principali tecniche diagnostiche

- **PCR**

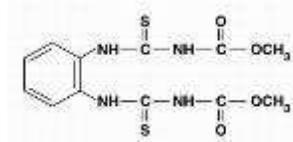
- PCR + sequenziamento del gene target
- PCR-RFLP
- Allele-specific-PCR (AS-PCR)

- **Real-time quantitative PCR**

- SYBR Green
- Taqman

- **DHPLC**

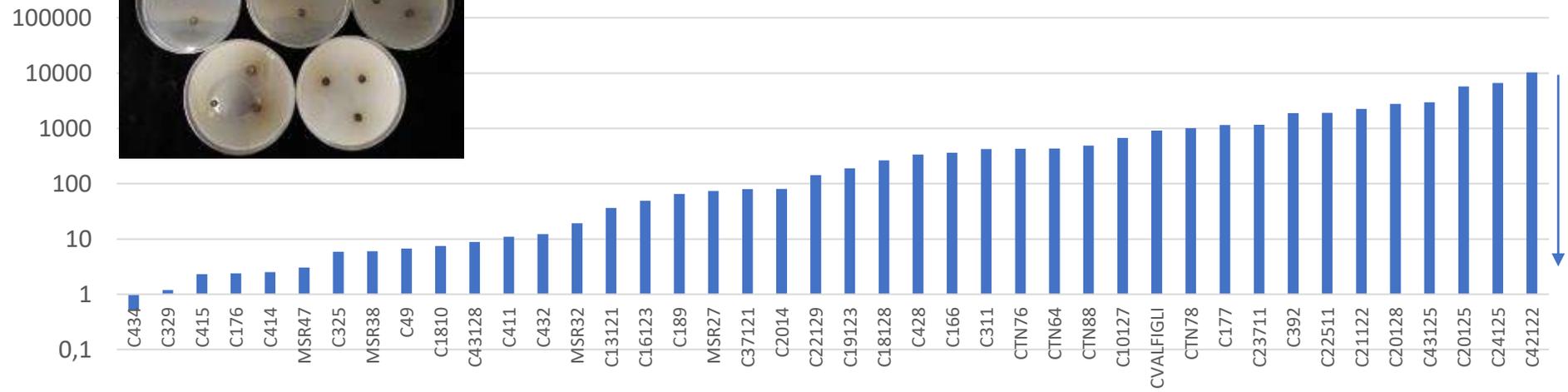
(denaturing high performance liquid chromatography)



# Sensibilità a tiofanato di metile di *Monilinia* spp.



*Monilia fructicola* -  $\text{Log}_{10} \text{EC}_{50}$  Tiofanato di metile



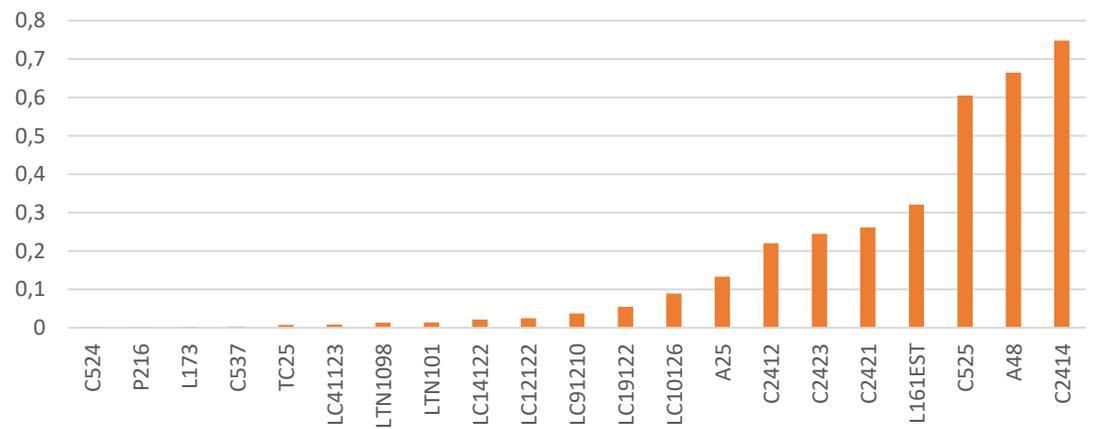
**Baseline: 1 mg l<sup>-1</sup>**

**EC<sub>50</sub> media *M. fructicola*: 1021 mg l<sup>-1</sup>**

**Resistenza in *M. fructicola*: 97%**

L'EC<sub>50</sub> è la concentrazione di fungicida che produce il 50% dell'effetto massimale. È una misura dell'efficacia del prodotto. Minore sarà l'EC<sub>50</sub> maggiore sarà la sua efficacia.

*Monilia laxa* - EC<sub>50</sub> Tiofanato di metile



Anno	<i>M. laxa</i> EC50	<i>M. fructicola</i> EC50
2010	0.002	153.3
2011	0.03	854.8
2012	0.09	3703.3

**EC<sub>50</sub> media *M. laxa*: 0,17 mg l<sup>-1</sup>**

***M. laxa*: 100% ceppi sensibili**

**RIDUZIONE DELLA SENSIBILITA'**

# Perché *Monilinia fructicola* è resistente al tiofanato di metile?

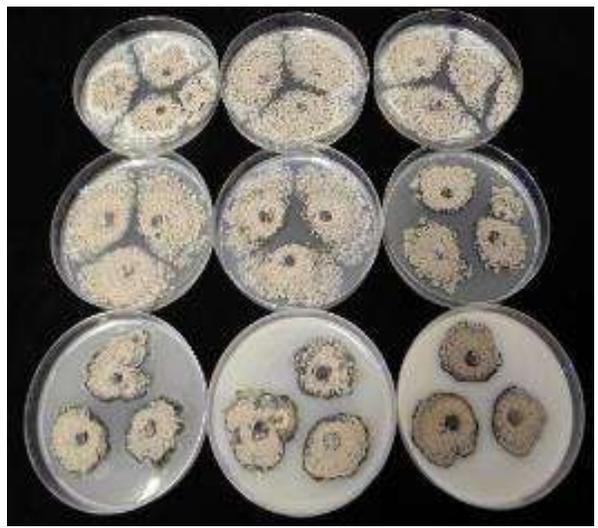
## Mutazioni puntiformi nel gene per la beta-tubulina

Ceppi a bassa resistenza hanno il codone 6 in cui è sostituita l'istidina (H) dalla tirosina (Y) (Ma., et al 2003)

Ceppi ad elevata resistenza hanno il codone 198 in cui è sostituito l'acido glutamico (E) dall'alanina (A) (Ma., et al 2003) o dalla lisina (K)



Species/Abbrv	Cr	DNA Sequences	Translated Protein Sequences
1. C24-12-7		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
2. C18-10		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
3. C3-11		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
4. Ctn64		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
5. C176		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
6. C3-25		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
7. C3-29		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
8. C10-12/7 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
9. C13-12/1 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
10. C19-12/3 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
11. CIN72 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
12. MSR38 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
13. MSR47 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
14. C40-12/2 CLON 1.3		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
15. C17-12/9 CLON 1.1		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
16. C14-12/5 clon 2.1 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
17. C18-12/8 clon 5.6		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
18. C166 Clon 4.7 inv		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
19. gi 296840665 gb HM051381		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
20. gi 30961892 gb AY283684		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
21. gi 30961890 gb AY283683		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
22. gi 30961888 gb AY283682		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
23. gi 30961894 gb AY283685		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
24. gi 30961884 gb AY283680		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
25. gi 30961882 gb AY283679		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY
26. gi 296840663 gb HM051380		ATLSVHQV	ENSDATFCIDNEALY



18 ceppi di *Monilinia fructicola* resistenti a tiofanato di metile selezionati per sequenziamento del gene per beta-tubulina.

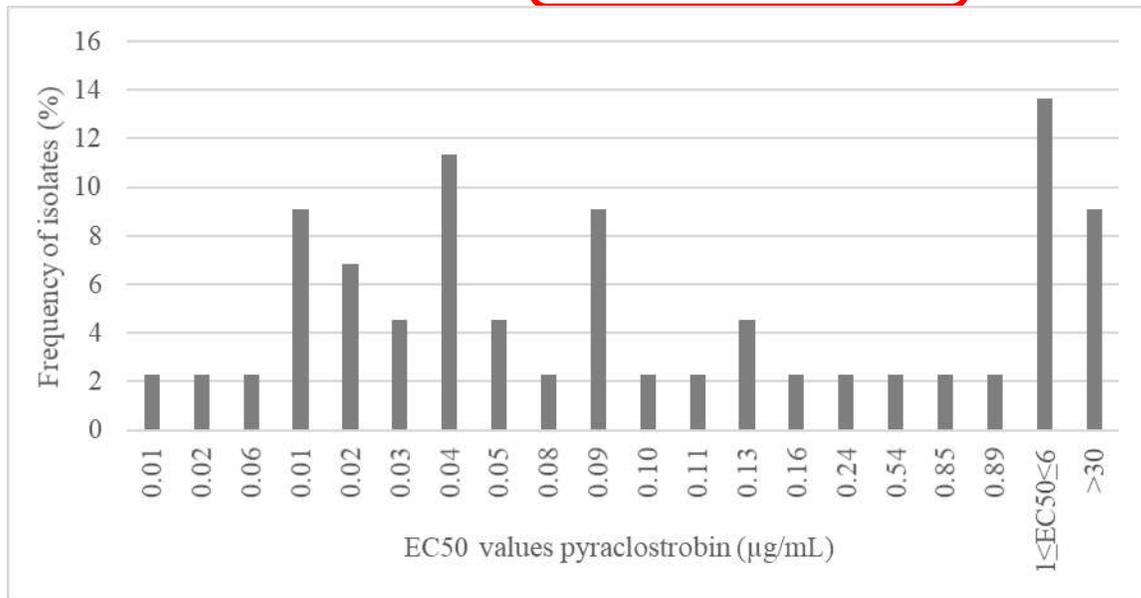
Tutti i ceppi presentavano mutazione E198A. In nessun ceppo erano presenti le mutazioni H6Y, E198K o F200Y.

# Sensibilità a QoI di *Venturia inaequalis*

Trasferimento di plug di micelio nei terreni ammendati a diverse concentrazioni (0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L) addizionati ad acido salicilidrossamico (SHAM)

## Pyraclostrobin - Insignia

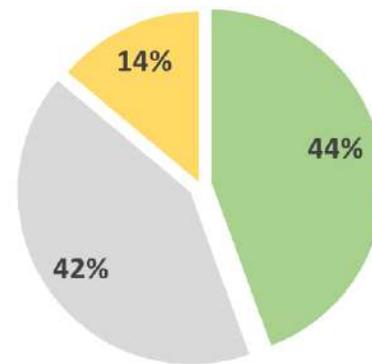
Baseline 0,05 mg/L



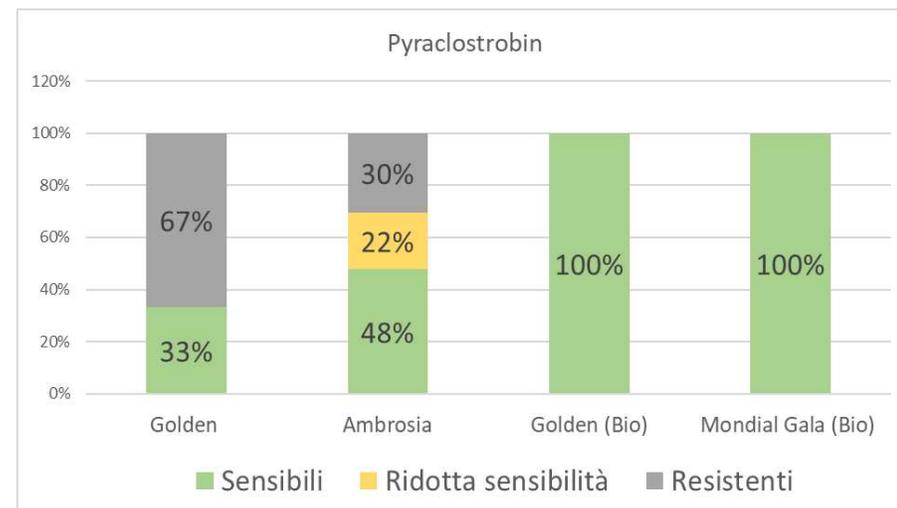
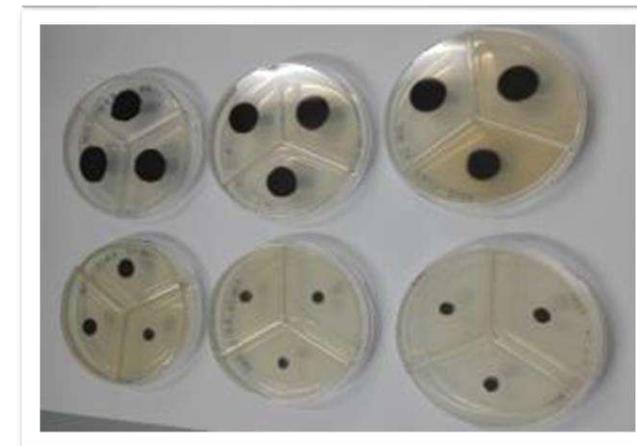
EC<sub>50</sub> medio 5,33 (range 0,001-72.440)

Max: 298 ppm

Impiegato in miscela con boscalid.



■ Sensibili ■ Resistenti ■ Ridotta sensibilità



■ Sensibili ■ Ridotta sensibilità ■ Resistenti



- Il fenomeno della resistenza
- Meccanismi dei fungicidi
- Meccanismi della resistenza
- Rischio di resistenza
- Valutazione della resistenza
- **Gestione della resistenza**
- Casi concreti

## Pratiche colturali

Distruzione dei residui colturali infetti

Fattore	Pratiche che favoriscono l'apparizione di resistenze	Rischio d'apparizione	Misure di prevenzione
Pratiche colturali	<b>Prima dell'installazione della coltura:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• rotazione inadeguata;</li> <li>• scelta di varietà sensibili alle malattie;</li> <li>• sementi non conciate né certificate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aumento dell'inoculo nella parcella (esempio: mal del piede, peronospora del girasole, sclerotinia della colza)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• estendere la rotazione;</li> <li>• evitare il ristoppio;</li> <li>• scegliere varietà resistenti;</li> <li>• utilizzare sementi conciate e certificate</li> </ul>
	<b>Nella coltura principale o intercalare</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• semina troppo precoce;</li> <li>• eccesso di concimazione azotata;</li> <li>• gestione inadeguata dei residui colturali (paglia, stoppie);</li> <li>• ricacci e/o avventizie non gestiti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• densità della coltura troppo elevata: umidità nella parcella (esempio: malattie dei cereali);</li> <li>• trasmissione di malattie (esempio: necrosi del colletto della colza);</li> <li>• ricacci che favoriscono lo sviluppo di malattie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• non seminare troppo precocemente;</li> <li>• limitare la concimazione azotata (concimi aziendali compresi);</li> <li>• rompere le stoppie per eliminare i residui colturali e lottare contro ricacci e/o avventizie</li> </ul>

# Pressione di selezione

Fattore	Pratiche che favoriscono l'apparizione di resistenze	Rischio d'apparizione	Misure di prevenzione
<b>Pressione di selezione</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• trattamenti superflui;</li><li>• utilizzo ripetuto della stessa famiglia di fungicidi sulla stessa parcella o coltura;</li><li>• fungicidi che non possiedono meccanismi d'azione differenti;</li><li>• fungicida con un solo meccanismo d'azione (monosito)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• eliminazione della maggior parte dei ceppi fungini con conseguente selezione di quelli più resistenti</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• trattare solo se necessario;</li><li>• alternare la famiglia di fungicidi utilizzati su una parcella o una coltura (esempio: evitare l'applicazione ripetuta di strobilurine nello stesso anno);</li><li>• utilizzare fungicidi con principi attivi aventi meccanismi d'azione differenti (vedi scheda 18.41-42);</li><li>• utilizzare fungicidi con più meccanismi d'azione (multisito)</li></ul>

Miscele: 1F + 1F multisito

Miscele: 1F + 1F con diverso MdA

Non si impedisce lo sviluppo della resistenza, ma se ne ritarda il più possibile la comparsa.



# Tecniche di applicazione

Fattore	Pratiche che favoriscono l'apparizione di resistenze	Rischio d'apparizione	Misure di prevenzione
<b>Tecniche d'applicazione</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• dosaggio inadatto, in particolar modo il sottodosaggio;</li><li>• frequenza di trattamento inadatta (eccessiva/insufficiente);</li><li>• superamento del numero massimo di applicazioni annuali autorizzate;</li><li>• inosservanza degli stadi fenologici ideali per l'applicazione;</li><li>• inosservanza delle soglie d'intervento;</li><li>• condizioni climatiche e/o tecniche d'applicazione inadeguate</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• concentrazione e penetrazione della poltiglia nella coltura insufficienti o inadeguate</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• adattare il dosaggio (evitare il sottodosaggio, soprattutto per triazoli e fenilammidi);</li><li>• ottimizzare la frequenza di trattamento;</li><li>• rispettare il numero di applicazioni annue autorizzate;</li><li>• rispettare gli stadi fenologici ideali per l'applicazione;</li><li>• trattare in condizioni climatiche ottimali (vedi scheda 18.10);</li><li>• utilizzare tecniche di applicazione corrette, basate su regolazioni e materiali adeguati (vedi scheda 18.10)</li></ul>

Non superare il n° massimo di applicazioni consentite per ciclo colturale indicati in etichetta.

Impiegare fungicidi a rischio solo nei periodi più a rischio per le infezioni (riduzione del n° di trattamenti).

**Limitare il n° dei trattamenti nel corso della stagione e trattare solo quando necessario concorre a ridurre complessivamente la quantità di prodotti applicati, rallentando la pressione selettiva.**

## **DISTRIBUIRE LA DOSE RACCOMANDATA IN ETICHETTA**

Garantire efficacia e contenimento della popolazione resistente.

**Resistenza quantitativa:** ridurre la dose potrebbe non contenere gli individui con fenotipo intermedio, moderatamente resistenti, che potrebbero evolvere generando nuove generazioni di individui più resistenti.

**Resistenza qualitativa:** aumentare la dose aumenta la velocità di selezione di ceppi resistenti.

# N° interventi con p.a. dello stesso gruppo



PREVENZIONE DELLA RESISTENZA AI FUNGICIDI:

Limitazioni del numero di interventi con sostanze attive dello stesso gruppo

**C3, G1, A1, D1, E2, E3, H5, C2**

FRUTTICOLE	QoI	IBE	Fenilammidi	Anilino-pirimidine	Fludioxonil	Dicarbos-simidi	CAA	SDHI (Boscalid)
actinidia	-	-	-	-	-	1	-	-
albicorno	2	3	-	2	2	-	-	2
ciliegio	2	3	-	-	-	-	-	2
fragola	2	2	3	2	2	-	-	2
melo	3	4	-	4	-	-	-	3
pero	3	4	-	4	4	-	-	3
pesco	3	4	-	3	3	-	-	3
susino	3	5	-	3	3	-	-	3
vite da tavola	3	3	3	2	3	-	4	1

FRUTTI A GUSCIO	QoI	IBE	Fenilammidi	Anilino-pirimidine	Fludioxonil	Dicarbos-simidi	CAA	SDHI (Boscalid)
mandorlo	-	2	-	-	-	-	-	-
noce	-	2	-	-	-	-	-	-

PICCOLI FRUTTI	QoI	IBE	Fenilammidi	Anilino-pirimidine	Fludioxonil	Dicarbos-simidi	CAA	SDHI (Boscalid)
lampone	2	-	-	-	-	-	-	2
ribes	2	-	-	-	-	-	-	2
rovo	2	-	-	-	-	-	-	2
uva spina	2	-	-	-	-	-	-	2

ORTICOLE A BULBO	QoI	IBE	Fenilammidi	Anilino-pirimidine	Fludioxonil	Dicarbos-simidi	CAA	SDHI (Boscalid)
aglio	2	-	-	-	-	-	2	-
cipolla	3	-	2	2	2	-	4	-
porro	2	-	-	-	-	-	-	-
scalogno	2	-	-	-	-	-	2	-

CUCURBITACEE	QoI	IBE	Fenilammidi	Anilino-pirimidine	Fludioxonil	Dicarbos-simidi	CAA	SDHI (Boscalid)
cetriolo	2	2	-	-	-	-	-	-
cocomero	2	-	-	-	-	-	-	-
melone	2	3	2	-	-	-	4	-
zucca	2	3	-	-	-	-	-	-
zucchini	2	2	-	-	-	-	2	-

SOLANACEE	QoI	IBE	Fenilammidi	Anilino-pirimidine	Fludioxonil	Dicarbos-simidi	CAA	SDHI (Boscalid)
melanzana	2	-	-	-	-	-	-	3
patata	2	3	3	-	-	-	4	-
patata dolce	-	-	-	-	-	-	-	-
peperone	-	3	1	-	-	-	-	3

pomodoro coltura protetta	3	3	3	-	2	-	4	3
pomodoro pieno campo	3	3	3	-	2	-	4	-

ORTICOLE A FOGLIA	QoI	IBE	Fenilammidi	Anilino-pirimidine	Fludioxonil	Dicarbos-simidi	CAA	SDHI (Boscalid)
basilico	2	-	2	-	-	-	2	2
bietola da costa	2	-	-	-	-	-	-	-
cardo	-	-	-	-	-	-	-	-
erbe fresche	2	-	2	-	-	-	-	-
lattuga	2	-	1	2	2	-	2	2
prezzemolo	2	-	1	-	-	-	-	2
rucola	2	-	2	3	3	1	2	-
sedano	2	4	-	-	-	-	-	-
spinacio	2	-	2	-	-	-	-	2

# Trattamenti preventivi, curativi, eradicanti



Evitare o limitare fortemente i trattamenti fungicidi curativi o eradicanti.

Alcuni fungicidi sistemici possiedono un'azione eradicante e curativa anche elevata.

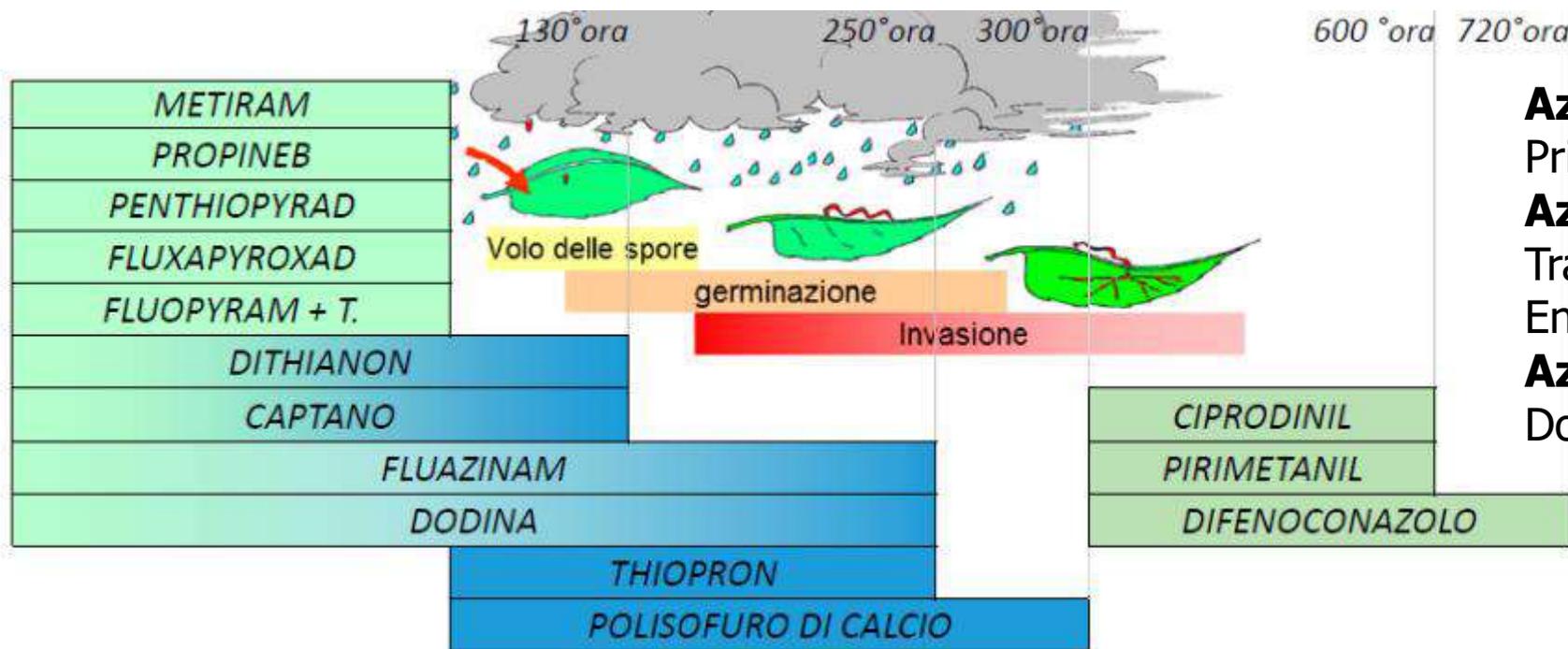
Tuttavia, l'uso ripetuto dei prodotti sistemici in modalità curativa può contribuire allo sviluppo di resistenze.

E' opportuno farne ricorso solo in casi di emergenza, quando le condizioni meteorologiche non consentono di intervenire preventivamente.

## DIFESA CURATIVA

## DIFESA PREVENTIVA

## DIFESA ERADICANTE



### Azione preventiva

Prima dell'infezione

### Azione curativa

Tra infezione e comparsa dei sintomi

Entro il 30% dell'infezione

### Azione eradicante

Dopo comparsa dei sintomi



# Casi accertati con maggiori ripercussioni



PRODOTTI	PATOGENO/MALATTIA
Benzimidazolici B1 fine anni '60/inizio anni '70	<i>Cercospora beticola</i> /Cercosporiosi bietola
	<i>Venturia inaequalis</i> /Ticchiolatura melo
	<i>Botrytis cinerea</i> /Muffa grigia varie colture
	<i>Penicillium expansum</i> /Marciume verde-azzurro
Dicarbossimidi E3 primi anni '80	<i>Botrytis cinerea</i> /Muffa grigia varie colture
	<i>Stemphylium vesicarium</i> /Maculatura bruna pero
QoI C3 fine anni '90/inizio anni 2000	<i>Plasmopara viticola</i> /Peronospora vite
	<i>Stemphylium vesicarium</i> /Maculatura bruna pero
	<i>Venturia inaequalis</i> /Ticchiolatura melo

1973 e 1974 Emilia Romagna  
 primi anni '80 Piemonte e Puglia  
 primi anni '80  
 primi anni '80 Liguria, Puglia, Piemonte  
 inizio anni '90 Emilia Romagna

## - *Plasmopara viticola*/vite

prime difficoltà di contenimento con azoxystrobin a Ravenna nel 2000, estensione negli anni successivi ad altre aree delle regioni nord-orientali (azoxystrobin e famoxadone), riduzione d'impiego dei QoI nell'Italia centro-settentrionale

## - *Venturia inaequalis*/melo

difficoltà di contenimento nei primi anni 2000 in alcune aree dell'Italia settentrionale, presenza di ceppi resistenti riscontrata in Emilia Romagna, Lombardia, Trentino, tendenza alla riduzione dell'impiego

## - *Stemphylium vesicarium*/pero

primo caso di difficoltà di difesa a Ravenna nel 2006, reperimento di ceppi resistenti, tendenza alla diffusione, situazione sotto controllo anche grazie al sistematico monitoraggio

## CASI ACCERTATI CON MINORI RIPERCUSSIONI PRATICHE

PRODOTTI		PATOGENO/MALATTIA
dodina	U	<i>Venturia inaequalis</i> /Ticchiolatura melo
cimoxanil	U	<i>Plasmopara viticola</i> /Peronospora vite
IBS (DMI)	G1	<i>Venturia inaequalis</i> / Ticchiolatura melo
		<i>Erysiphe necator</i> / Oidio vite
		<i>Cercospora beticola</i> /Cercosporiosi bietola
fenilamidi	A1	<i>Plasmopara viticola</i> / Peronospora vite
		<i>Bremia lactucae</i> /Peronospora lattuga
anilinopirimidine	D1	<i>Venturia inaequalis</i> / Ticchiolatura melo
		<i>Botrytis cinerea</i> /Muffa grigia varie colture
QoI	C3	<i>Podosphaera fusca</i> / Oidio cucurbitacee
		<i>Cercospora beticola</i> /Cercosporiosi bietola



# Risorse informative

## **Fungicide Resistance Action Committee**

<https://www.frac.info/>

## **EU Pesticides Database**

<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>

## **Ministero della Salute**

### **Banca dati dei prodotti fitosanitari**

[https://www.fitosanitari.salute.gov.it/fitosanitariws\\_new/FitosanitariServlet](https://www.fitosanitari.salute.gov.it/fitosanitariws_new/FitosanitariServlet)

**Davide Spadaro**  
**Università di Torino**  
@: [davide.spadaro@unito.it](mailto:davide.spadaro@unito.it)