

LA RESISTENZA AI FUNGICIDI

Agostino Brunelli
Centro di Fitofarmacia
Dipartimento di Protezione e Valorizzazione agroalimentare
Università di Bologna

Forum “Gestione delle resistenze” – Legnaro, 19 gennaio 2012

La base dell'attività dei fungicidi

Capacità del p. a. di combinarsi con una o più sostanze operanti nel biochimismo cellulare dei patogeni, impedendone le normali funzioni e quindi interrompendo processi fondamentali per il loro sviluppo

I bersagli cellulari

- più frequentemente enzimi attivi a livello di
 - produzione di energia (respirazione)
 - sintesi di sostanze indispensabili per il normale ciclo biologico
- altre sostanze

I meccanismi di resistenza dei patogeni ai fungicidi

Meccanismo principale

- Modificazione del sito bersaglio e conseguente impossibilità (o difficoltà) per il fungicida di combinarsi con esso (disaffinità)
es. Fenilamidi, QoI

Altri meccanismi

- Modificazioni metaboliche e/o strutturali a livello cellulare che impediscono al p. a. di raggiungere il bersaglio in quantità sufficiente per l'azione tossica:
 - disattivazione metabolica
 - riduzione permeabilità della membrana
 - espulsione
 - incremento espressione sito bersaglioes. Triazoli
- Attivazione di processi metabolici alternativi a quello bersaglio del p. a. ?

La base genetica della resistenza ai fungicidi

Modificazioni fenotipiche collegate a mutazioni geniche:

- a. cromosomiche (nucleo)
- b. extracromosomiche (es. mitocondri)

Insorgenza e diffusione condizionate anche dalle peculiarità genetiche del patogeno: diploidia, aploidia

- organismi aploidi: espressione immediata
- organismi diploidi: dominanza/recessività

La base genetica della resistenza ai fungicidi

Controllo monogenico o poligenico

➤ Resistenza monogenica

in genere collegata a modificazioni del sito bersaglio

- comparsa generalmente rapida (*one step*)
- interessa tutti i prodotti con lo stesso meccanismo d'azione anche di diversi gruppi chimici (r. incrociata)
es. fenilamidici, Qol

➤ Resistenza poligenica

in genere coinvolto anche il “percorso” del p. a. verso il bersaglio

- comparsa lenta e progressiva (*multi step*), effetto additivo
- non necessariamente incrociata anche fra prodotti di uno stesso gruppo chimico
es. triazoli

I fattori di rischio alla base dello sviluppo della resistenza ai fungicidi

Fattori collegati al fungicida

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

- 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 > a. in aree confinate

I fattori di rischio alla base dello sviluppo della resistenza ai fungicidi

Fattori collegati al patogeno

- Caratteristiche biologiche dell'organismo: rischi proporzionali a
 - variabilità genetica: capacità di esprimere mutazioni
 - capacità di moltiplicazione (numero di generazioni e individui)
 - capacità di diffusione
 - competitività degli individui resistenti (fitness)

- Interazione dell'ambiente e/o dell'ospite in senso favorevole allo sviluppo e alla moltiplicazione del patogeno
 - condizioni pedoclimatiche e andamento meteorologico
 - pratiche agronomiche: concimazione, irrigazione, varietà suscettibili

Livello di rischio intrinseco di resistenza dei fungicidi secondo il FRAC

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

Classi di rischio intrinseco di resistenza ai fungicidi da parte dei patogeni

da EPPO, FRAC adattato

RISCHIO ELEVATO	<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.
MEDIO	<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>
BASSO	<i>Puccinia</i> spp. e altri agenti di ruggine <i>Alternaria</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp. Patogeni terricoli e del seme

Interazione tra il rischio intrinseco del fungicida e quello associato alla malattia

da Brent e Hollomon (2007)

Dicarbossimidi, Fenilamidi, Benzimidazoli, Qol	ALTO (3)	3	6	9
IBS-DMI, Anilinopirimidine, Fenilpirroli, Carbosamidi (SDHI)	MEDIO (2)	2	4	6
Rameici, zolfo, Ditiocarbammati, Ftalimidici, chlorotalonil	BASSO (0,5)	0,5	1	1,5
Rischio associato al fungicida	Rischio associato alla malattia	BASSO (1)	MEDIO (2)	ALTO (3)
		Malattie seme Malattie telluriche Ruggine cereali	Rincosporiosi orzo Septoriosi grano	Ticchiolatura melo Botrite vite Peronospora vite Peronospora patata e pomodoro Oidio cereali

I casi più significativi di resistenza pratica ai fungicidi in Italia

Prodotti	Malattie	Comparsa
Benzimidazolici	Ticchiolatura melo	Primi anni 70
Dicarbossimidi	Maculatura bruna pero	Primi anni 90
Qol	Peronospora vite	2000
Analoghi strobilurine	Ticchiolatura melo	Primi anni 2000
	Maculatura bruna pero	2006-2007
	Oidio cucurbitacee	Primi anni 2000
Dicarbossimidi, Anilinopirimidine	Muffa grigia vite, fragola e altre colture protette	Anni 90 2002-2003

La valutazione della resistenza ai fungicidi

Le due metodologie di base

1. Saggi di sensibilità dei patogeni al p. a. in condizioni controllate

- **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)

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

- **Grado d'azione** saggi su pianta intera
- **DE₅₀** Dose Efficace al 50% mg/l (ppm)
- **DE₉₅** Dose Efficace al 95% mg/l (ppm)
- **CMI** Concentrazione Minima Inibitoria mg/l (ppm)
- **FR** (Fattore di Resistenza):
$$\text{DE}_{50} \text{ popolazione resistente} / \text{DE}_{50} \text{ popolazione sensibile}$$

I punti critici nella valutazione della resistenza ai fungicidi con saggi biologici

Saggi di sensibilità in condizioni controllate

- Valore tendenzialmente qualitativo dei saggi basati sulla inoculazione di popolazioni dei patogeni (*in vivo* e *in vitro*)

Saggi di tipo qualitativo non sempre in grado di fornire indicazioni attendibili sulla resistenza pratica: tendenza alla sovrastima a causa dell'abbondanza di inoculo (compresi individui resistenti)

- Necessità di utilizzare anche saggi di tipo quantitativo, basati sulla manipolazione dei singoli individui in modo da potere valutare la reale frequenza di resistenti

Metodologie più complesse, maggiori tempi e costi

Analisi genetiche

Individuazione delle mutazioni attraverso amplificazione di frammenti di DNA con diverse metodologie prevalentemente basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR):

a) Metodi qualitativi:

es. elettroforesi su gel di agarosio

b) Metodi quantitativi:

es. attraverso fluorescenza

Es. Real Time

I punti critici nella valutazione della resistenza ai fungicidi con analisi genetiche

Analisi delle mutazioni

- Valore qualitativo della normale tecnica PCR
- Necessità di utilizzare anche tecniche con valore quantitativo
es. PCR Real Time

Problema di base:

la messa a punto delle metodologie analitiche richiede la conoscenza precisa del sito d'azione del fungicida e delle mutazioni coinvolte nella resistenza

vantaggi: verifiche più rapide ed economiche per ampi monitoraggi

La gestione del rischio resistenza ai fungicidi

Con la moderna evoluzione dei fungicidi il rischio di sviluppo di resistenze non è praticamente evitabile

Unica possibilità concreta:

limitare il rischio attraverso un utilizzo controllato dei principi attivi finalizzato a ridurre l'azione selettiva sugli eventuali individui mutati

Le linee guida per limitare la pressione selettiva dei fungicidi a rischio

- impiegarli in miscela o alternanza con uno o più prodotti a diverso meccanismo d'azione, meglio se multi-sito
- limitare il numero di applicazioni per stagione o ciclo colturale
- applicarli in modo preventivo, evitando l'uso post-infezionale (curativo e ancora più eradicante)
- applicarli correttamente (dosi, intervalli, distribuzione) in modo da ottimizzare la protezione