



UNIONE EUROPEA
Fondo Europeo Agricolo
per lo Sviluppo Rurale



Regione Emilia-Romagna

L'Europa investe nelle zone rurali

AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2015 DEL TIPO DI OPERAZIONE 16.1.01 "GRUPPI OPERATIVI DEL PEI PER LA PRODUTTIVITÀ E LA SOSTENIBILITÀ DELL'AGRICOLTURA"

**FOCUS AREA 2A, 4B, 4C, 5A E 5E DGR N. 2268 DEL 28 DICEMBRE
2015**

RELAZIONE TECNICA FINALE

DOMANDA DI SOSTEGNO 5004934

DOMANDA DI PAGAMENTO 5055013

FOCUS AREA: 4B

Titolo Piano	Tecniche diagnostiche, distribuzione territoriale e gestione di resistenze dei principali patogeni, fitofagi e malerbe ai prodotti fitosanitari
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	CRPV sede Via dell'Arrigoni, 120 Cesena (FC), Piva 01949450405
Elenco partner del gruppo operativo	<ul style="list-style-type: none"> - C.R.P.V. SOC. COOP. - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO - UNIVERSITA' CATTOLICA SACRO CUORE - IBAF-CNR - TERREMERSE - CEREALI PADENNA - APOFRUIT Italia - APOCONERPO - GRANFRUTTA ZANI - CAB MASSARI - AZIENDA AGRICOLA LUCCHI MAURIZIO - AZIENDA AGRICOLA BIANCHI GIUSEPPE

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)

36

Data inizio attività	01 settembre 2016
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	14 ottobre 2019

Relazione relativa al periodo di attività dal	01 settembre 2016	14 ottobre 2019
Data rilascio relazione	29 novembre 2019	

Autore della relazione	Maria Grazia Tommasini		
Telefono		email	mgtommasini@crpv.it

1 Descrizione dello stato di avanzamento del Piano

Lo sviluppo delle attività previste nel Piano è iniziato il 1 settembre 2016 ed in generale tutte le attività sono state attivate e svolte seguendo i protocolli presentati nel piano. Tutte le attività previste (pari al 100%) sono state realizzate.

In sintesi:

- L'azione 1 è stata realizzata come previsto seguendo i percorsi e utilizzando i diversi strumenti indicati nel piano.
- L'azione 2 non era prevista e non è quindi stata svolta alcuna attività.
- L'azione 3 è stata realizzata interamente conformemente a quanto previsto. In particolare nella sottoazione 1 i risultati ottenuti dal campionamento territoriale hanno portato a svolgere oltre 1500 analisi ma a causa dell'andamento climatico sfavorevole per alcune avversità non sono stati riscontrati campioni critici su cui svolgere specifiche analisi inerenti Alternaria del pomodoro e patata (attività 1.5) e Oidio delle cucurbitacee (attività 1.6). Inoltre non sono state svolte analisi su Monilie delle drupacee (attività 1.3) in quanto una simile attività su questi funghi sono state svolte in parallelo nell'ambito di un altro GO della FA 4B dal titolo "Strategie di difesa innovative ecocompatibili, gestione miscele residue e aggiornamenti sulle necessità idriche per una frutticoltura sostenibile" (titolo breve "SOS Frutta", n. domanda 5005113, GO: Frutticoltura sostenibile - di durata biennale, terminato nel 2018). In questo progetto "SOS Frutta" infatti era previsto uno studio più approfondito su questo target che ha visto l'esigenza di svolgere anche analisi simili a quelle previste nel presente progetto, pertanto non si è ritenuto opportuno in questo progetto "Resistenze" ripetere ulteriori analisi durante lo sviluppo del progetto SOS Frutta. Alcune analisi su questo target sono state quindi svolte solo nel 2019.

Tutte le altre attività sono state svolte come previsto dal Piano.

- L'azione 4 sulla divulgazione ha visto sviluppare dal GO diverse iniziative che hanno soddisfatto le aspettative del progetto e del GOI. In totale sono state svolte 35 diverse iniziative oltre alla pagina dedicata sul sito del CRPV.
- L'azione 5 sulla formazione è stata interamente svolta nell'ultimo anno di progetto a seguito del necessario sviluppo dei dati e relativa elaborazione.

1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività reale	Mese termine attività previsto	Mese termine attività reale
1 - Cooperazione		Esercizio della Cooperazione	1	1	36	36
3 - Realizzazione del piano.		Azioni dirette alla realizzazione del piano	1	1	36	36
4 - Divulgazione		Divulgazione	3	5	36	36
5 - Formazione		Seminari Coaching	12	27	36	36

2 DESCRIZIONE PER SINGOLA AZIONE

AZIONE 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

1.1 Attività e risultati

Azione

Azione 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV, Cereali Padenna, Terremerse, IBAF-CNR, UCSC, UNIMORE, UNIBO

Descrizione attività

CRPV, nel suo ruolo di capomandatario ha svolto funzione di coordinatore dell'attività di funzionamento e gestione del Gruppo Operativo (GO) in accordo con gli altri Partner del GO.

Il **referente scientifico** del piano è stato individuato in (IBAF-CNR) sebbene per le diverse competenze necessarie per il buon sviluppo del progetto, sono 4 i le figure che hanno svolto referenza scientifica per le specifiche discipline richieste: (UniBO) per i patogeni, (UCSC) e (UniMORE) per i fitofagi e (IBAF-CNR) per le malerbe.

Il CRPV, tramite proprio personale come **Responsabile Organizzativo del Piano, RP**), ha seguito regolarmente e gestito con le necessarie ed opportune documentazioni, tutte le fasi di sviluppo, dall'attivazione anche formale, all'attuale rendicontazione intermedia, del GO e del relativo Piano per assicurarne il corretto funzionamento e svolgimento.

In particolare sono di seguito descritte in sintesi le diverse attività svolte dal CRPV.

A seguito dell'approvazione del Piano (Delibera Reg. Emilia Romagna n° 11594 del 19/07/2016) è stata gestita la fase di costituzione dell'ATS con tutti i partner del Gruppo Operativo (GO) fino alla sua completa formalizzazione avvenuta nel settembre 2016 come da comunicazione inoltrata all'Ente regionale di competenza. Nell'ATS sono anche descritti i ruoli di ciascun partner nell'ambito del GO.

Per la Gestione del GO, sin dal 1 settembre 2016 è stata fatta l'attivazione del piano ed in particolare delle diverse prove e attività previste nell'azione 3 e azione 4 come concordato dal GO.

Un primo incontro fra i partner effettivi del GO è stato organizzato in data **26 settembre 2016**, in tale contesto sono stati rivisti i contenuti e gli obiettivi del Piano, al fine di avere la più ampia condivisione

possibile delle informazioni, affinare le modalità di realizzazione delle azioni d'innovazione e rendere operativi rapidi feedback.

L'incontro del 26 settembre 2016 ha rappresentato anche il momento di costituzione del Comitato di Piano (CP) per la gestione e il funzionamento del GO. Il CP è quindi composto:

- dal Responsabile Organizzativo del Piano (RP) anche detto Responsabile del Piano:
(CRPV);
- dai Responsabili Scientifici (RSs), del IBAF-CNR, dell'Univ. di Bologna
(UniBO), dell'Univ. di Piacenza (UCSC), dell'Univ. di Modena e
Reggio Emilia (UniMORE);
- da Terremerse;
- da Cereali Padenna;
- da CAB Massari;
- da Apofruit;
- da Apoconerpo;
- da GranFrutta Zani;

oltre che dai rappresentanti delle Aziende agricole Bianchi Giuseppe e Lucchi Maurizio.

Il **RP** si è quindi occupato di coordinare nel complesso tutte le attività, animando il GO, seguendone il percorso e verificandone la coerenza e buon sviluppo (attraverso innumerevoli contatti telefonici, via whatsapp, mail e mailing list, documentabili dagli strumenti CRPV e incontri specifici). Il RP ha inoltre favorito lo scambio di informazioni e ogni volta utile, il necessario supporto sia informativo che logistico per il buon sviluppo delle sinergie e attività previste dal piano.

Ha inoltre stimolato e collaborato per la realizzazione delle azioni di divulgazione e formazione, come descritte di seguito nell'azione 4 e 5.

L'attività di coordinamento e animazione ha visto il RP organizzare e partecipare un **totale di 17 incontri** del GO ed in particolare nelle seguenti date:

- **26 settembre 2016** (a Bologna, BO),
- **24 gennaio 2017** (a Bologna, RA),
- **01 agosto 2017** (a Bologna, BO),
- **11 settembre 2017** (a Bologna, BO)
- **10 ottobre 2017** (Bologna, BO) (incontro sottoazione 3.3)
- **10 ottobre 2017** (Bologna, BO) (incontro GOI)
- **05 dicembre 2017** (Tebano e skype)
- **22 febbraio 2018** (Tebano, RA)
- **13 febbraio 2018** (Bologna, BO)
- **28 febbraio 2018** (Tebano, RA)
- **21 maggio 2018** (Bologna, BO)
- **10 luglio 2018** (Conselice RA)
- **11 ottobre 2018** (Bologna BO)
- **19 ottobre 2018** (Bologna BO)
- **07 dicembre 2018** (Tebano, RA)
- **15 febbraio 2019** (Bologna BO)
- **31 maggio 2019** (Bologna BO)

Ai suddetti incontri sono stati invitati anche i referenti tecnici del Servizio Fitosanitario regionale, coi quali è stato comunque mantenuto un costante contatto durante tutto il periodo. I fogli firma di tutti gli incontri del GO sopra citati, sono disponibili c/o il CRPV.

Oltre ai suddetti incontri il RP ne ha fatti alcuni ulteriori e specifici per la fase di monitoraggio sullo stato di avanzamento delle diverse attività incluse nel Piano o per affrontare eventuali specifiche piccole criticità. Inoltre sono stati innumerevoli i contatti fra il RP e i partners via mail, telefono o skype al fine di indirizzare, supportare e fornire informazioni utili allo sviluppo corretto del progetto e delle fasi tecnico-amministrative ad esso connesse.

Per la fase organizzativa e logistica di incontri e delle altre iniziative descritte di seguito, il CRPV si è avvalso della segreteria tecnica di CRPV.

Durante il costante monitoraggio dei lavori ed i risultati via via raggiunti in caso di scostamenti sono state valutate le necessarie azioni correttive. Questo è stato gestito anche in relazione ai momenti cruciali nello sviluppo delle diverse prove del Piano ("milestone"). In particolare nel primo periodo ottobre-febbraio (per la raccolta in particolare di campioni da impiegare nelle attività di laboratorio e per la messa a punto della

strumentazione da impiegare in una prova della sottoazione 3 e nell'azione 3) e poi aprile-settembre (periodo nel quale tutti i campioni delle 3 sottoazioni 1, 2 e 3, nell'azione 3, sono stati raccolti e le indagini eseguite), sono state svolte verifiche su tutte le prove finalizzate al controllo del corretto stato di avanzamento lavori. Anche gli incontri sopra citati sono stati utili a questo scopo, oltre ai contatti diretti avuti con i responsabili di ciascuna prova, e nel caso per definire congiuntamente con il RS, il responsabile della prova e se possibile anche del referente del Servizio Fitosanitario, le opportune azioni correttive.

Dal secondo semestre 2017 in poi è iniziata anche la fase di analisi e rendicontazione tecnica, che si è poi ripetuta prevalentemente nei periodi invernali successivi ed il RP ha fornito tutti gli strumenti, informazioni e suggerimenti utili ai partner effettivi per il corretto sviluppo di questa fase dell'attività. I periodi invernali hanno poi coinciso con l'organizzazione di alcuni eventi di divulgazione organizzati sul territorio (vedi azione 4).

In occasione dei Campus Cloud (descritti di seguito nell'azione 4) sono stati promossi momenti di discussione fra tutti i partner del GO e alcuni altri tecnici e operatori del settore produttivo, per un utile confronto sui risultati raggiunti. Tale interfaccia e discussione ha fornito utili spunti di miglioramento e di affinamento per alcune prove che hanno permesso in certi casi alcuni aggiustamenti e miglioramenti dei protocolli ancora da completare.

Nella fase terminale del progetto, il RP e i RSs, insieme a tutti i partner coinvolti, hanno completato l'analisi dei risultati ottenuti e predisposto la relazione tecnica finale oltre alle altre documentazioni necessarie per la rendicontazione amministrativo-economica prima intermedia e poi finale. Il CRPV si è occupato della gestione e predisposizione della documentazione e format e ha opportunamente informato e supportato i partner nella fase di rendicontazione tecnica ed economica.

Oltre alle attività descritte in precedenza, il CRPV ha svolto altre funzioni legate al proprio ruolo di capofila e referente responsabile in quanto mandatario dell'ATS, come le attività di interrelazione con la Regione Emilia-Romagna, l'assistenza tecnico-amministrativa agli altri partner, le richieste di chiarimento e la redazione di eventuali richieste di aggiustamento o comunicazioni di altra natura trasmesse all'ente preposto.

Il CRPV si è inoltre occupato dell'aggiornamento della Rete PEI-AGRI in riferimento al Piano, come richiesto dalla regione, al fine di stimolare l'innovazione, tramite l'apposita modulistica presente sul sito.

Autocontrollo e Qualità

Attraverso le Procedure e le Istruzioni operative approntate nell'ambito del proprio Sistema Gestione Qualità, il CRPV ha lavorato al fine di garantire efficienza ed efficacia al progetto, come segue:

- Requisiti, specificati nei protocolli tecnici, rispettati nei tempi e nelle modalità definite;
- Rispettati gli standard di riferimento individuati per il progetto;
- Garantita la soddisfazione del cliente tramite confronti diretti e comunicazioni scritte;
- Rispettate modalità e tempi di verifica in corso d'opera definiti per il progetto;
- Individuati i fornitori ritenuti più consoni per il perseguimento degli obiettivi.

La definizione delle procedure, attraverso le quali il Responsabile di Progetto ha effettuato il coordinamento e applicato le politiche di controllo di qualità, sono la logica conseguenza della struttura organizzativa del CRPV.

In particolare sono state espletate le attività di seguito riassunte.

Attività di coordinamento

Le procedure attraverso le quali si è concretizzato il coordinamento dell'intero progetto si sono sviluppate attraverso riunioni e colloqui periodici con il Responsabile Scientifico e con quelli delle Unità Operative coinvolte.

Attività di controllo

La verifica periodica dell'attuazione progettuale si è realizzata secondo cadenze temporali come erano state individuate nella scheda progetto. Più in particolare è stata esercitata sia sul funzionamento operativo che sulla qualità dei risultati raggiunti; in particolare è stata condotta nell'ambito dei momenti sotto descritti.

- Verifiche dell'applicazione dei protocolli operativi in relazione a quanto riportato nella scheda progetto;
- Visite ai campi sperimentali e ai laboratori coinvolti nella conduzione delle specifiche attività.

Riscontro di non conformità e/o gestione di modifiche e varianti

Non si sono verificate situazioni difformi a quanto previsto dalla scheda progetto.

Tutte le attività svolte come previsto nella procedura specifica di processo sono registrate e archiviate nel fascicolo di progetto e certificate attraverso visite ispettive svolte dal Responsabile Gestione Qualità del CRPV.

Il Sistema Qualità CRPV, ovvero l'insieme di procedure, di misurazione e registrazione, di analisi e miglioramento e di gestione delle risorse, è monitorato mediante visite ispettive interne e verificato ogni 12 mesi da Ente Certificatore accreditato (DNV-GL).

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi del piano sono stati raggiunti e non sono state rilevate criticità nella fase di cooperazione del GO.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

1.2 Personale

Nome Cognome	Unità Aziendale responsabile	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo totale
	CRPV	Tecnico	Tecnica	6	125,76
	CRPV	Tecnico	Tecnica	40	1.111,60
	CRPV	Tecnico	Tecnica	24	1.304,48
	CRPV	Tecnico	Tecnica	58	1.216,06
	CRPV	Tecnico	Tecnica	100	3.205,00
	CRPV	Segreteria	Segreteria	20	499,00
	CRPV	Tecnico	Amministrativa	105	2.336,25
	CRPV	Tecnico	Tecnica	109	3.372,42
	CRPV	Tecnico	Amministrativa	145	5.395,45
	UNIMORE	Ricercatore	Responsabile scientifico	15	435,15
	UNIBO	Ricercatore	Referente Scientifico	70	2.030,00
	UCSC	Personale senior	Referente Scientifico	44	1.822,84
	Terremerse	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	48	1.504,80
	Terremerse	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	202	6.375,12
	Terremerse	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	40	1.262,40
	IBAF-CNR	Ricercatore	Tecnico	50	2.503,00
	Cereali Padenna	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	44	819,70
					35.319,03

1.3 Trasferte

Nome e Cognome	Descrizione	Costo
	Trasferte tra la sede del CRPV, le sedi dei partner e i siti in cui si svolgono le azioni di realizzazione del piano.	714,80
	Partecipazione riunioni	5,90
	Totale:	720,70

AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

3.1 Attività e risultati

Azione

AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV, IBAF-CNR, UNIBO, UCSC, UNIMORE, TERREMERSE, CEREALI PADENNA, CAB MASSARI.

Le unità verranno esplicitate per ogni singola attività.

Descrizione attività

SOTTOAZIONE 1: ANALISI DELLE PRINCIPALI CRITICITÀ LEGATE A FENOMENI DI RESISTENZA DI PATOGENI CHIAVE DELLE PRINCIPALI COLTURE ORTOFRUTTICOLE ED ERBACEE IN EMILIA-ROMAGNA

Obiettivo generale di questa sotto-azione è stata di validare metodi innovativi atti a valutare l'insorgenza di resistenze di patogeni delle principali colture agrarie verso nuove famiglie di prodotti che sono state recentemente introdotte sul mercato. In particolare sono stati prelevati da frutteti/campi segnalati, in stretta collaborazione con l'assistenza tecnica presente sul territorio, campioni (costituiti da foglie e/o frutti) che sono stati quindi analizzati in laboratorio. Per favorire il lavoro di prelevamento e consegna, sono stati distribuiti a diversi tecnici del territorio regionale protocolli di campionamento e schede di accompagnamento campioni per ciascuno dei patogeni coinvolti nel piano al fine di estendere quanto più possibile la raccolta di campioni opportuni allo scopo.

Sono previste in dettaglio 10 attività, ciascuna inerente un differente patogeno, ma nel complesso la sottoazione si prefigge, come da progetto, di eseguire un numero minimo di analisi complessive per anno pari a 200 a prescindere dal tipo di patogeno che sarà determinato in funzione delle richieste provenienti dalla assistenza tecnica sul territorio e alle condizioni climatiche annuali più o meno favorevoli alle infezioni determinate dai diversi patogeni.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti dal campionamento territoriale della stagione 2016 le cui analisi sono state condotte a partire da settembre dello stesso anno e primi mesi del 2017. In particolare non sono stati analizzati fino ad ora campioni di *Alternaria* del pomodoro e patata (attività 1.5) e *Oidio* delle cucurbitacee (attività 1.6) in quanto dato l'andamento climatico sfavorevole allo sviluppo di queste malattie non sono stati reperiti campioni utili. Non sono state svolte analisi neppure su *Monilie* delle drupacee (attività 1.3) in quanto diverse analisi sono state già svolte in parallelo nell'ambito di un altro GO della FA 4B dal titolo "Strategie di difesa innovative ecocompatibili, gestione miscele residue e aggiornamenti sulle necessità idriche per una frutticoltura sostenibile" (titolo breve "SOS Frutta", n. domanda 5005113, GO: Frutticoltura sostenibile - di durata biennale, terminerà nel 2018). In questo progetto "SOS Frutta" infatti è previsto uno studio più approfondito su questo target che ha visto l'esigenza di svolgere anche analisi similari a quelle previste nel presente progetto, pertanto non si è ritenuto opportuno ripeterle in questo progetto partito successivamente.

Complessivamente comunque il numero di analisi condotte è ben superiore a quello stimato di almeno 200 in questa prima fase del progetto.

I risultati ottenuti dal campionamento territoriale delle stagioni 2017 e 2018. In particolare sono stati analizzati campioni di pere interessate da maculatura bruna, foglie provenienti da meleti con ticchiolatura, drupacee interessate da marciume bruno, foglie di frumento con sintomi di septoriosi, foglie di barbabietola con cercosporiosi e ceppi di *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*. Nel secondo biennio non è stato possibile

invece analizzare campioni di peronospora della vite, alternaria su pomodoro e patata, oidio cucurbitacee e peronospora basilico a causa, generalmente, dell'andamento climatico sfavorevole allo sviluppo di queste malattie.

Complessivamente comunque il numero di analisi condotte è ben superiore a quello stimato (400).

Si descrivono di seguito le attività della sottoazione.

1.1 MACULATURA BRUNA DEL PERO

OBIETTIVI

Questo lavoro è stato intrapreso per approfondire il monitoraggio della sensibilità di *S. vesicarium*, agente della maculatura bruna del pero, nei confronti dei principali fungicidi utilizzati per il suo contenimento. Lo studio è stato affrontato attraverso analisi di sensibilità nei confronti di iprodione, fludioxonil, analoghi delle strobilurine, SDHI (boscalid, fluxapyroxad, penthiopyrad, fluopyram).

ANNO 1

MATERIALI E METODI

a) Analisi di sensibilità nei confronti di iprodione e fludioxonil

La metodologia può essere così schematizzata:

- per ciascun campione si procede all'isolamento del patogeno da almeno 15 tacche sintomatiche provenienti da altrettanti frutti;
- tutti gli isolati così ottenuti vengono poi sottoposti alla prova di sensibilità *in vitro* su substrato avvelenato con due concentrazioni discriminanti del p.a. iprodione (10 e 50 mg/l) che permettono di distinguere, osservando l'accrescimento miceliare rispetto a colonie cresciute su substrato non avvelenato, i 3 fenotipi a diversa sensibilità nei confronti del prodotto, già individuati e caratterizzati negli studi precedenti: sensibili (S), resistenti R₁ (mediamente resistenti con Concentrazione Minima Inibitoria <50 mg/l), resistenti R₂ (altamente resistenti, con CMI >50 mg/l). Nella prova viene inoltre inserita la concentrazione di 15 mg/l di fludioxonil, attraverso la quale è possibile evidenziare anche l'eventuale presenza di resistenza incrociata con iprodione nel caso del fenotipo R₂. Attraverso la caratterizzazione degli isolati nei diversi fenotipi è poi possibile risalire alla composizione della popolazione presente nel frutteto.

b) Analisi di sensibilità nei confronti degli analoghi delle strobilurine

La sensibilità alle strobilurine è stata valutata tramite saggi sulla germinazione conidica realizzati *in vitro* su substrato avvelenato con pyraclostrobin, una delle tre strobilurine registrate su pero dal momento che il loro comune meccanismo di resistenza ne rende praticamente identica la loro attività fungicida. Il principio attivo è stato utilizzato alla concentrazione di 0,5 mg/l valutando, dopo 5 ore di incubazione, la percentuale di conidi germinati rispetto ad un testimone non trattato. I saggi sono stati eseguiti sulle 27 popolazioni ottenute miscelando la sporulazione di tutte le colonie isolate dalle singole macchie di ciascun campione.

c) Analisi di sensibilità nei confronti degli SDHI (boscalid, fluxapyroxad, penthiopyrad, fluopyram)

Si è proseguita, con questo monitoraggio, la raccolta di dati sulla sensibilità a boscalid, penthiopyrad, fluopyram (già in uso nella difesa del pero da *S. vesicarium*), e fluxapyroxad (di prossima autorizzazione contro *S. vesicarium*) attraverso l'analisi delle 27 popolazioni.

Le prove di sensibilità nei confronti degli SDHI sono state realizzate valutando l'inibizione dell'accrescimento miceliare attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro, dopo 2 giorni di incubazione su substrato liquido (YBA) contenente diverse concentrazioni di p.a. (0-0,02-0,05-0,5-1-2,5 mg/l). Il parametro di sensibilità calcolato è stato la DE₅₀ (Dose Efficace 50: concentrazione in mg/l in grado di ridurre del 50% l'accrescimento fungino rispetto ad un testimone non trattato).

RISULTATI

a) Analisi di sensibilità nei confronti di iprodione e fludioxonil

L'analisi realizzata su 401 isolati appartenenti a 27 popolazioni (campioni) ha mostrato come la quasi totalità degli isolati apparteneva al fenotipo sensibile mentre solo 2 erano rappresentati unicamente dal fenotipo R₁ (il fenotipo R₂ non è stato riscontrato). Di tutte le popolazioni, 26 (96,3%) sono risultate formate solo da individui sensibili, mentre solo 1 (3,7%) è appartenente a quelle cosiddette "miste" in quanto formate sia da individui sensibili che da fenotipi resistenti. Sono completamente assenti popolazioni formate da soli individui resistenti. In particolare si è potuto osservare che la quasi totalità delle popolazioni miste è costituita da individui sensibili rispetto ai resistenti R₁ (S>R₁) (**Tabella 1**). Dal monitoraggio di tutti i 401 isolati non sono emerse altre variazioni di sensibilità, confermando che sia il fenotipo R₁ che il fenotipo S sensibili a iprodione, sono sensibili al fludioxonil.

Tabella 1- Sensibilità a iprodione delle popolazioni di *S. vesicarium* suddivise in base alle province di provenienza dei campioni

Provenienza campioni	Campioni ricevuti (frutteti)	Popolazioni di <i>S. vesicarium</i> ottenute	Popolazioni con tutti individui sensibili S		Popolazioni con individui sensibili e resistenti					
					Fenotipi S > R ₁		Fenotipi S < R ₁		Fenotipi S = R ₁	
			N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Bologna	7	7	7	100	0	0	0	0	0	0
Ferrara	8	8	7	87,5	1	12,5	0	0	0	0
Modena	6	6	6	100	0	0	0	0	0	0
Ravenna	6	6	6	100	0	0	0	0	0	0
Totali	27	27	26	96,3	1	3,7	0	0	0	0

In conclusione, la regressione della resistenza è decisamente confermata considerata anche l'ampia indagine condotta su una quantità di frutteti con programmi di intervento diversi tra loro. Appare comunque fondamentale l'applicazione di strategie anti-resistenza per evitare che gli sporadici ceppi resistenti, caratterizzati comunque da elevata adattabilità all'ambiente, possano acquisire nuovamente frequenze tali da causare problemi di contenimento.

b) Analisi di sensibilità nei confronti degli analoghi delle strobilurine

Le analisi effettuate hanno evidenziato un ulteriore calo della presenza di popolazioni con conidi resistenti. Si è potuto inoltre osservare che la frequenza dei conidi resistenti ha subito un notevole decremento nella fascia di germinazione più alta corrispondente al 91-100%, a vantaggio delle fasce inferiori. Nel corso di questo monitoraggio effettuato su 27 popolazioni, 15 popolazioni hanno mostrato al loro interno una percentuale di conidi resistenti alle strobilurine variabile da pochi punti percentuale sino al 100%.

c) Analisi di sensibilità nei confronti degli SDHI (boscalid, fluxapyroxad, penthiopyrad, fluopyram)

Si conferma, anche per il 2016, la sensibilità delle popolazioni analizzate: infatti il confronto tra le DE50 dei singoli prodotti (boscalid, fluxapyroxad, penthiopyrad, fluopyram, complessivamente variabili da 0,08 a 2,24 mg/L) ottenute dal campionamento 2016 con quelle evidenziate nelle rispettive *baseline* (da 0,02 a 0,81 mg/L) ha mostrato valori analoghi. Il monitoraggio nei confronti di questi principi attivi proseguirà per mantenere sotto controllo l'evoluzione della sensibilità a questi fungicidi che, avendo un meccanismo d'azione monosito, sono potenzialmente a rischio di resistenza.

Dato l'elevato numero di campioni reperiti, il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 937 (401 per iprodione e altrettanti per fludioxonil; 27 per strobilurine (pyraclostrobin) e 108 per i quattro SDHI): è stato quindi abbondantemente superato il limite minimo riportato nel progetto per questa attività pari a 100 analisi.

ANNO 2 e ANNO 3

MATERIALI E METODI

a) Analisi di sensibilità nei confronti di iprodione (solo nel 2017) e fludioxonil

La metodologia applicata è stata la stessa già osservata nel I rendiconto e così schematizzata:

- per ciascun campione si procede all'isolamento del patogeno da almeno 15 tacche sintomatiche provenienti da altrettanti frutti;
- tutti gli isolati così ottenuti vengono poi sottoposti alla prova di sensibilità *in vitro* su substrato avvelenato con due concentrazioni discriminanti del p.a. iprodione (10 e 50 mg/l) che permettono di distinguere, osservando l'accrescimento miceliare rispetto a colonie cresciute su substrato non avvelenato, i 3 fenotipi a diversa sensibilità nei confronti del prodotto, già individuati e caratterizzati negli studi precedenti: sensibili (S), resistenti R₁ (mediamente resistenti con Concentrazione Minima Inibitoria <50 mg/l), resistenti R₂ (altamente resistenti, con CMI >50 mg/l). Nella prova viene inoltre inserita la concentrazione di 15 mg/l di fludioxonil, attraverso la quale è possibile evidenziare anche l'eventuale presenza di resistenza incrociata con iprodione nel caso del fenotipo R₂. Attraverso la caratterizzazione degli isolati nei diversi fenotipi è poi possibile risalire alla composizione della popolazione presente nel frutteto.

Le analisi nei confronti dell'iprodione sono state condotte solo nel 2017 dal momento che, a partire dalla stagione 2018, il principio attivo è stato revocato a livello europeo e quindi i formulati basati su di esso automaticamente non più utilizzabili nella difesa.

b) Analisi di sensibilità nei confronti degli analoghi delle strobilurine

La sensibilità alle strobilurine è stata valutata tramite saggi sulla germinazione conidica realizzati *in vitro* su substrato avvelenato con pyraclostrobin. Il principio attivo è stato utilizzato alla concentrazione di 0,5 mg/l valutando, dopo 5 ore di incubazione, la percentuale di conidi germinati rispetto ad un testimone non trattato. I saggi sono stati eseguiti su 161 popolazioni (52 prelevate nel 2017 e 109 nel 2018) ottenute miscelando la sporulazione di tutte le colonie isolate dalle singole macchie di ciascun campione (**Tabelle 1 e 2**).

c) Analisi di sensibilità nei confronti degli SDHI (boscalid, fluxapyroxad, penthiopyrad, fluopyram, isopyrazam e bixafen)

Le prove di sensibilità nei confronti degli SDHI nel 2017 sono state realizzate valutando l'inibizione dell'accrescimento miceliare da parte dei principi attivi tecnici attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro, dopo 2 giorni di incubazione su substrato liquido (YBA) contenente diverse concentrazioni di p.a. (0-0,02-0,05-0,5-1-2,5 mg/l). Il parametro di sensibilità calcolato è stato la DE₅₀ (Dose Efficace 50: concentrazione in mg/l in grado di ridurre del 50% l'accrescimento fungino rispetto ad un testimone non trattato). Le prove condotte nel 2018 sono state impostate in modo innovativo ricorrendo ai formulati commerciali di boscalid (Cantus), fluxapyroxad (Xemium), penthiopyrad (Fontelis) e fluopyram (Luna Privilege) a 10-20-30 mg/L e i risultati proposti come grado di azione calcolato alla concentrazione più alta (30 mg/L). Il numero delle popolazioni analizzate è lo stesso di quello citato per gli analoghi delle strobilurine: 52 nel 2017 e 109 nel 2018 (**Tabelle 1 e 2**).

Tabella 1- Campioni analizzati nel 2017

Provenienza campioni	Campioni ricevuti (frutteti)	Popolazioni di <i>S. vesicarium</i> ottenute
Bologna	8	8
Ferrara	34	30
Modena	8	8
Ravenna	7	6
Totali	57	52

Tabella 2 - Campioni analizzati nel 2018

Provenienza campioni	Campioni ricevuti (frutteti)	Popolazioni di <i>S. vesicarium</i> ottenute
Bologna	18	18
Ferrara	48	48
Modena	23	23
Ravenna	17	17
Forlì-Cesena	1	1
Reggio Emilia	2	2
Totali	109	109

RISULTATI e CONCLUSIONI

a) Analisi di sensibilità nei confronti di iprodione e fludioxonil

Su 556 isolati, appartenenti a 52 popolazioni (campioni), la maggioranza era sensibile all'iprodione (462), 87 appartenevano al fenotipo R1 e 7 all'R2. Dal punto di vista delle popolazioni, circa il 65% era costituito esclusivamente da isolati sensibili, il 31% mostrava una preponderanza di isolati sensibili sui resistenti e il 5% una parità tra sensibili e resistenti (**Tabella 3**). Riguardo fludioxonil, nel 2017, 4 popolazioni su 52 presentavano isolati resistenti sostanzialmente corrispondenti al fenotipo R2 osservato per iprodione.

Tabella 3- Sensibilità a iprodione delle popolazioni di *S. vesicarium* suddivise in base alle province di provenienza dei campioni (2017)

Provenienza campioni	Popolazioni di <i>S. vesicarium</i>	Popolazioni con tutti individui sensibili S		Popolazioni con individui sensibili e resistenti					
				Fenotipi S > R ₁ + R ₂ (event.)		Fenotipi S < R ₁ + R ₂ (event.)		Fenotipi S = R ₁ + R ₂ (event.)	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Bologna	8	6	75	2	25	0	0	0	0
Ferrara	30	15	50	13	43,3	0	0	2	6,7
Modena	8	4	50	3	37,5	0	0	1	12,5
Ravenna	6	5	83,3	1	16,7	0	0	0	0
Totali	52	30	64,6	1	30,6	0	0	0	4,8

La regressione della resistenza a iprodione è comunque confermata nonostante l'abbassamento, rispetto al 2016, della percentuale di isolati sensibili. Dal momento che l'iprodione non è più inserito nella difesa, nel 2018 sono state condotte prove solo nei confronti di fludioxonil. Nel 2018, su quasi 1000 isolati che costituivano le 109 popolazioni, nessuno si è rilevato resistente a fludioxonil.

b) Analisi di sensibilità nei confronti degli analoghi delle strobilurine

Le analisi effettuate hanno messo in luce la presenza di sole due popolazioni su 161 campionate nel biennio che non mostravano nessun conidio resistente nonostante la frequenza percentuale di conidi resistenti all'interno delle popolazioni mostra una tendenza a diminuire proprio con un decremento del numero di popolazioni con percentuali più alte (dall'80 al 100%) a favore delle categorie intermedie (dal 40 al 60%). In ogni caso la resistenza alle strobilurine anche in *S. vesicarium* non regredisce con facilità nel corso del tempo e il loro utilizzo, in situazioni di bassa frequenza, deve essere ancora limitato ai periodi di minor rischio infettivo all'interno di una adeguata strategia.

c) Analisi di sensibilità nei confronti degli SDHI (boscalid, fluxapyroxad, penthiopyrad, fluopyram, isopyrazam e bixafen)

Le analisi svolte nel 2017, su 52 popolazioni, hanno purtroppo testimoniato la presenza di fenomeni di diminuita sensibilità 12 popolazioni che per l'uno o l'altro dei 6 SDHI saggiati ha fatto rilevare DE50 > o >> della massima concentrazione utilizzata (2,5 mg/l). Sulla scorta della esperienza del 2017, nel 2018 è stata messa a punto una metodologia più rapida e maggiormente collegabile alle diverse situazioni pratiche con il ricorso ai formulati commerciali dei principi attivi utilizzati nella difesa (boscalid, fluxapyroxad, penthiopyrad e fluopyram). In questo modo è stato possibile dividere le popolazioni analizzate in funzione del grado di azione di questi prodotti portando a concludere che nel 27% dei casi conservano la loro efficacia (grado di azione dal 60 al 100%), in un 55% probabilmente stanno perdendo la loro iniziale validità (grado di azione dal 30 al 60%) mentre nel restante 18% la loro efficacia sembra attestarsi anche ben sotto il 30%. Purtroppo il fenomeno della resistenza nei confronti degli SDHI è arrivato a essere una realtà per *S. vesicarium* e non sarà facile gestirla dal momento che non sono presenti attualmente sul mercato nuovi prodotti con meccanismi di azione diversi da quelli oggi già disponibili.

Si ritiene di far rilevare in questa sede e al termine della disamina della sensibilità ai vari prodotti, la presenza in ascesa di ceppi di *Alternaria* spp. riscontrata negli ultimi due anni nei frutteti. Nel 2017 si trattava di pochissimi casi mentre nel 2018 quasi tutti i campioni hanno mostrato, insieme a *S. vesicarium*, la presenza di questo fungo in percentuali decisamente superiori a quanto mai accaduto nel passato tanto da far ipotizzare un loro ruolo nella patogenesi. A questo proposito gli studi sono stati intrapresi con biosaggi e verifiche di attività dei diversi prodotti.

Il numero complessivo di analisi effettuato nel biennio è stato pari a più di 1000 analisi per iprodione e fludioxonil, 161 per strobilurine (pyraclostrobin) e 161 per gli SDHI): è stato quindi abbondantemente superato il limite minimo riportato nel progetto per questa attività pari a 100 analisi.

1.2 TICCHIOLATURA DEL MELO E DEL PERO

ANNO 1

OBIETTIVI

Dopo le prime conferme sulla presenza di popolazioni di *Venturia inaequalis* a ridotta sensibilità (e probabilmente resistenti) al difenoconazole in Emilia-Romagna, si è ritenuto di concentrare l'attività proprio su questo principio attivo allo scopo di verificare come e se le popolazioni, in particolare, a ridotta sensibilità potevano influenzare l'attività preventiva e curativa del fungicida. Per quanto riguarda *Venturia pyrina* è in corso la messa a punto del protocollo molecolare (non riportato in questa sede, in sintesi al momento si è provveduto al campionamento di un paio di popolazioni dalle quali è stato estratto il DNA) per la ricerca della mutazione G143A coinvolta nella resistenza alle strobilurine sulla cui attività in campo si nutrono dei sospetti.

MATERIALI E METODI

Popolazioni di *V. inaequalis* sensibili ed a ridotta sensibilità al difenoconazole, provenienti dall'Emilia-Romagna, sono state saggiate *in vivo* con metodolologia specificatamente messa a punto e preventivamente confrontata con quella tradizionale basata su saggi *in vitro* su monoconidiche. Allo scopo di conseguire risultati e conclusioni più affidabili si è ritenuto necessario aumentare il ridotto numero di popolazioni sospette pervenute dall'Emilia-Romagna, con altre provenienti soprattutto dal Trentino ed anche dalla Lombardia (Tabella 1).

Vi erano tre tipologie di popolazioni:

- Selvatiche, provenienti da zone non agricole e mai trattate
- Ben controllate, provenienti da frutteti dell'Emilia-Romagna dove il difenoconazole o altri IBS erano stati utilizzati con buoni risultati
- Poco controllate, provenienti da frutteti con infezione presente e con sospetti sul difenoconazole.

Per i saggi *in vivo* sulle popolazioni indicate in tabella, sono state utilizzate piantine di melo da seme cv Golden con 5-6 foglie inoculate con sospensioni di conidi alla concentrazione di $1-2 \times 10^5$ /ml e poste in condizioni controllate. Le applicazioni preventive sono state realizzate 24, o 48 o 72 ore prima dell'inoculazione, mentre le applicazioni curative sono state realizzate 56 o 96 ore dopo il momento di inoculazione. 20-21 giorni dopo l'inoculazione, veniva effettuato il rilievo conteggiando la percentuale di superficie fogliare ticchiolata e il relativo grado di azione.

Tabella 1. Popolazioni di *Venturia inaequalis* esaminate: tipologie, ubicazione e numero di trattamenti con IBS (soprattutto difenoconazole) effettuati negli ultimi tre anni. *Evidenziate in grassetto le popolazioni regionali.*

Popolazioni Selvatiche			Popolazioni Ben controllate			Popolazioni con Ridotto controllo e sospetti sugli IBS		
N°	Località	N° IBS	N°	Località	N° IBS	N°	Aree melicole	N° IBS
62	Golena del fiume Po (MN)	0	156	Borghi (FC)	2	26.13	Trentino	3-5
12-03	Parco ferroviario(BO)	0	99	Fosso Ghiaia (RA)	1-2	25-13	Trentino	4-6
			98	Cona (FE)	2	29-13	Emilia-R.	2-7
			202	Codroipo (UD)	0-2	23-13	Trentino	6-8
			Misto	Popolazioni da diverse aree melicole	1-2	31-13	Emilia-R.	6-8
						116-05	Lombardia	4-5
						3-15	Emilia-R.	5-8

RISULTATI

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 2, tuttavia essi emergono in modo più sintetico e chiaro in tabella 3. In particolare le popolazioni selvatiche e ben controllate con IBS presentano un'attività preventiva (a 24, 48 e 72 ore) e curativa (56 e 96 ore) molto elevata e con valori pressoché analoghi. Il difenoconazole applicato sulle popolazioni ben controllate evidenzia risultati leggermente inferiori a quelli delle popolazioni selvatiche, sia nelle applicazioni preventive che curative.

Si nota invece una evidente riduzione di attività curativa sulle popolazioni con ridotto controllo e sospette di ridotta attività da parte degli IBS. Al contrario l'attività preventiva evidenziata su queste popolazioni è molto elevata e simile a quella delle popolazioni selvatiche e ben controllate dagli IBS.

Tabella 2. Attività del difenoconazole in tutte le prove realizzate con applicazioni preventive e curative sulle popolazioni di *V. inaequalis*

Popolazioni		Prove realizzate (°)	Livello d'infezione* e grado d'azione (°)** del difenoconazole con:					
Tipologia	Numero Popolaz.		Test	Applicazioni preventive			Applicazioni curative	
				72 ore	48 ore	24 ore	56 ore	96 ore
Selvatiche	12-03	1	20.0*		0.0*(100**)	0.0* (100**)	0.0*(100**)	
		2	18.6	0.0(100)			0.0 (100)	0.0 (100)
		3	22.1			0.0 (100)		
	62	4	50.0				0.0 (100)	0.8 (98.3)
		5	17.5				0.05 (99.2)	
Ben-controllate	156	1	42.2			0.0 (100)	0,0 (100)	
		2	45.0		0.6 (98.5)		2.0 (95.5)x	
	98	3	19.1			0,0 (100)	0,0 (100)	
		4	42.3	1.6(96.0)		2.4(94.3)	0.6 (98,5)	0.8 (98.1)
		5	44.7				2.2 (95.0)	
	202	6	43.6				1.4 (96.6)	
	99	7	17.5				0.4 (97.6)	
		8	18.6				2.2 (88.2)	
	Mixed	9	13.3		0,0 (100)		3,05(77.1)	
		10	35.0	0.66 (98.1)			9.6 (74.0)	7.6 (78.4)
		11	35.6	3.3 (90.7)			10,0 (72.0)	7.6 (78.4)
Poco controllate	23-13	1	10,0		0.2 (98.0)		5,5 (44.5)	
		2	13.0		2.6 (88.0)		6,6 (48.7)	
	26.13	3	39.4				29.7 (24.6)	
	25.13	4	67.7				29.1 (56.9)	
	29-13	5	10.6	1,2(88.6 %)		0,33(96.9)	2,88 (72.9)	
		6	6.1				3.9 (35.5)	
	31-13	7	14.6	0.0 (100)			11,0 (24,9)	
		8	16.1				11.1 (31.1)	
		9	20.5			0.8(95.9)	7.7 (62.1)	
	116-05	10	21.6				10.8 (50.0)	
	3-15	11	21.3	0.3 (98.4)			16.6 (22.0)	15.3 (27.2)

* Infezione espressa come percentuale media di superficie fogliare ticchiolata

** () Grado d'azione: $\frac{\text{percentuale media di area fogliare ticchiolata in ciascuna tesi} \times 100}{\text{percentuale media di area fogliare ticchiolata nel testimone}}$

Tabella 3. Risultati sintetici dell'attività preventiva e curativa del difenoconazolo sulle tre tipologie di popolazioni di *V. inaequalis*

Tipologia popolazioni	Grado d'azione medio del difenoconazolo nei seguenti momenti di intervento				
	Preventivo			Curativo	
	72 ore	48 ore	24 ore	56 ore	96 ore
Selvatiche	100,0	100,0	100,0	99,9	99,1
Ben controllate	94,9	99,2	98,1	90,4	84,9
Poco controllate	95,6	93,0	96,4	43,0	27,2

CONCLUSIONI

Le popolazioni a ridotta sensibilità e resistenti al difenoconazolo, già accertate in Emilia-Romagna, si caratterizzano per causare un notevole peggioramento dell'attività di tipo curativo, la principale prerogativa sfruttata con questo preparato nella difesa dalla ticchiolatura del melo.

Al contrario l'attività preventiva a 1, 2 e 3 giorni del prodotto su queste popolazioni risulta simile a quella delle popolazioni sensibili.

Questo fenomeno risulta analogo a quello precedentemente rilevato sulle anilino-pirimidine pyrimethanil e cyprodinil, ma si presenta questa volta in misura più accentuata, probabilmente per la maggiore attività curativa del difenoconazolo.

Per la prosecuzione dell'attività, è stato richiesto ai tecnici un maggior numero di campioni in modo da avere una migliore conoscenza sulla diffusione, in Emilia-Romagna, della resistenza agli IBS e in particolare al più attivo ed utilizzato difenoconazolo.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 18 (considerando soltanto le 5 prove effettuate sulle necessarie popolazioni selvatiche e, rispettivamente, 7 e 6 prove realizzate su popolazioni ben controllate e poco controllate provenienti dall'Emilia-Romagna): è stato quindi soddisfatto il numero riportato a livello progettuale di 10-20 analisi/anno.

ANNO 2 e ANNO 3

OBIETTIVI

Nel biennio di progetto si è voluta affrontare la persistenza della resistenza su due gruppi di principi attivi e cioè le strobilurine e il difenoconazolo che, come visto nel rendiconto del I anno, ha anch'esso determinato preoccupazioni soprattutto per la perdita, in diversi casi, della sua attività curativa da anni alla base della gestione delle infezioni di *Venturia inaequalis* su melo. E' stata portata avanti anche la messa a punto del protocollo molecolare per stabilire la presenza della mutazione G143A in *Venturia pyrina* della quale non si riferirà in maniera puntuale dal momento che non sono pervenuti campioni specifici da analizzare.

MATERIALI E METODI

Le foglie ticchiate sono state raccolte in giugno-luglio e portate in laboratorio. I conidi sono stati separati dalle foglie mediante aspirazione e, dopo concentrazione e filtrazione, sono stati inoculati in serra semenzali al fine di ottenere nuovi conidi più numerosi e vitali.

Successivamente è stata valutata la sensibilità *in vitro* secondo un protocollo consolidato (Fiaccadori et al., 2011). Sono stati realizzati tre saggi con trifloxystrobin per ciascuna popolazione e calcolata la DE50 attraverso analisi Probit. Verranno riportati i risultati ottenuti nel 2005 (a partire dal 2006 le strobilurine sono state interrotte), 2011 e 2017 per migliore comprensione ma verranno conteggiati, ai fini delle analisi, solo quelli provenienti dai saggi del 2017.

Per l'analisi della regressione al difenoconazole si è invece ricorsi a due popolazioni resistenti nel 2015 (una a Bagnacavallo, RA, l'altra da un frutteto in provincia di Forlì-Cesena) poi ricampionate nel 2016, 2017 e 2018 in seguito alla interruzione completa dell'uso del prodotto. Allo scopo nei tre anni sono state poste in campo sei piante in vaso della cv Dallago di due anni che, in occasione dei trattamenti, venivano coperte con sacchetti di polietilene, in modo da essere naturalmente infettate dalle ascospore presenti. Alla comparsa delle prime macchie, gli astoni sono stati trasferiti nelle serre del DISTAL e opportunamente utilizzati i conidi presenti in prove di sensibilità svolte su piantine da seme. Le applicazioni venivano solite in maniera curativa seguendo il protocollo riferito nel primo rendiconto. Una popolazione è considerata con "probabili riduzioni di attività" in campo quando almeno uno dei due saggi condotti evidenziava un grado di azione (sec. Abbot) inferiore al 74%.

RISULTATI e CONCLUSIONI

La persistenza della resistenza alle strobilurine in *V. inaequalis* nelle popolazioni analizzate appare molto elevata nel corso del tempo. Solo dopo un circa un decennio di interruzione dell'uso i parametri risultano scesi anche se non hanno ancora raggiunto il valore di DE50 max considerato di piena efficacia che precedenti studi hanno determinato in <0,063 mg/L (**Tabella 4**).

Tabella 4 – Persistenza del fenomeno della riduzione di sensibilità a trifloxystrobin nei tre anni dei prelievi in termini di DE50

Codice campione	I prelievo (2005) DE50 max	II prelievo (2011) DE50 max	III prelievo (2017) DE50 max
143	>10	>10	0,81
144	>10	>10	3,42
148	>10	>10	0,8

Relativamente a difenoconazole, i risultati mostrano un recupero della sensibilità (specialmente nel frutteto di FC) (**tabella 5**) che tuttavia non consentono di uscire dalla situazione di resistenza neanche dopo tre anni dalla sospensione all'uso. Analisi effettuate nei prossimi anni potranno contribuire a chiarire ulteriormente il fenomeno e a prevedere il momento di un eventuale reinserimento di questo principio attivo nella difesa da *V. inaequalis*.

Tabella 5 – Sensibilità al difenoconazole (grado di azione %) nel 2015, 2017 e 2018 di due popolazioni di *V. inaequalis* risultate resistenti nel campionamento del 2015

Frutteto	2015			2017			2018		
	Grado azione nei singoli saggi (%)		Grado azione medio (%)	Grado azione nei singoli saggi (%)		Grado azione medio (%)	Grado azione nei singoli saggi (%)		Grado azione medio (%)
	I	II		I	II		I	II	
Bagnacavallo (RA)	31,7	22,8	27,2	26	58,8	42,4	38,3	56	47,1
Forlì-Cesena (FC)	26	43	34,5	31,9	69,7	50,8	68	64,3	66,1

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 11: è stato quindi soddisfatto il numero riportato a livello progettuale di 10-20 analisi/anno.

1.3 MARCIUME BRUNO DELLE DRUPACEE

ANNO 3

OBIETTIVI

Al termine del progetto PSR Frutticoltura (di durata biennale, 2016-17), l'attività di analisi di sensibilità alla *Monilinia* spp. è stata trasferita nel presente progetto e quindi riguarderà i prelievi effettuati nel 2018. E' proseguita la preliminare indagine sulla discriminazione delle specie presenti sul territorio regionale e le analisi della sensibilità a tebuconazole, boscalid e pyraclostrobin.

MATERIALI E METODI

Nel corso del 2018 sono stati ricevuti, da giugno a settembre 2018, 11 campioni rappresentati da rametti e frutti di pesco, percoco, nettarino dalle province di Ravenna e Bologna. Da tutti i campioni è stata isolata *Monilinia* spp. Le colonie così ottenute sono state sottoposte a analisi PCR per la discriminazione delle specie. I fungicidi considerati nelle analisi di sensibilità sono stati tebuconazole (triazolo), boscalid (SDHI) e pyraclostrobin (QoI). I saggi condotti su tebuconazole sono stati impostati ricorrendo alla valutazione della inibizione miceliare su substrato agarizzato (PDA) avvelenato con le seguenti concentrazioni del principio attivo: 0-0,001-0,01- 0,1- 1-10 mg/L. Il rilievo della crescita diametrica del fungo in piastra alle diverse concentrazioni ha permesso di stabilire la Dose Efficace 50 (DE50) e la Concentrazione Minima Inibitoria (CMI). Nei risultati vengono riportati i dati dei tre rilievi eseguiti (dopo tre, cinque e sette giorni dalla inoculazione). Analoghe prove sulla inibizione della crescita miceliare, sono state condotte per boscalid ma con concentrazioni diverse (0-0,05-0,5-1-2,5-5 mg/L) e con il calcolo delle DE50 dei due rilievi eseguiti (dopo 3 e 5 giorni dalla inoculazione). Per pyraclostrobin è stata osservata la germinazione conidica del patogeno alla concentrazione discriminante di 0,5 mg/L rispetto a un controllo non avvelenato su substrato agarizzato (agar acqua 1,5%). Sia alle piastre testimone che a quelle avvelenate è stato aggiunto un inibitore della respirazione alternativa (SHAM) per evitare l'influenza di questo metabolismo presente *in vitro* che farebbe interpretare come positivi (resistenti) i campioni capaci di attivarlo.

RISULTATI e CONCLUSIONI

Gli 11 campioni erano costituiti da *M. fructicola* che, in soli due casi, era accompagnata da *M. laxa* (**tabella 6**). Anche nel 2018 la specie preponderante e quasi esclusiva è quindi *M. fructicola* a testimonianza della sempre maggiore diffusione sul territorio.

I risultati delle analisi di sensibilità a tebuconazole (**tabella 7**) mostrano la sostanziale completa sensibilità di tutte le popolazioni analizzate che è determinata da valori di DE50 <0,1 mg/L. Solo la popolazione 125 mostra valori poco al di sopra del limite nel secondo e terzo rilievo. Il principio attivo si può considerare ancora affidabile nonostante i lunghi anni di utilizzo.

Riguardo la sensibilità a boscalid, tenendo conto della DE50 media di sensibilità che varia da 0,1 a 3 mg/l per *M. fructicola* mentre arriva a 5 mg/l per *M. laxa*, si può concludere che gran parte dei campioni presentano resistenza a questo principio attivo (**tabella 8**).

Le analisi di sensibilità a pyraclostrobin non hanno fatto registrare nessuna germinazione alla concentrazione discriminante di 0,5 mg/L. Gli esiti hanno chiaramente mostrato una completa sensibilità di tutti i ceppi al principio attivo.

Tabella 6 – Campioni analizzati nel 2018 e risultati della discriminazione delle specie di *Monilinia* spp. presenti

Codice campione	COMUNE	PROVINCIA	CULTIVAR	SPECIE <i>MONILINIA</i> SPP.
121	Faenza	RA	Pesco, Bigfire	<i>M. fructicola</i> , <i>M. laxa</i>
122	S.Bartolo	RA	Percoca, Fergold	<i>M. fructicola</i>
123	Mordano	BO	Percoca, Fergold	<i>M. fructicola</i>
124	Bagnacavallo	RA	Percoca, Fergold	<i>M. fructicola</i>
125	Cotignola	RA	Pesco, Monvenè	<i>M. fructicola</i>
126	Lugo	RA	Pesco, VAR Morsiani 90	<i>M. fructicola</i>
127	Granarolo (Faenza)	RA	Nettarino, Big Top	<i>M. fructicola</i>
128	Imola	BO	Pesco, Kakec	<i>M. fructicola</i>
129	Imola	BO	Pesco, Sweet Henry	<i>M. fructicola</i>
130	Faenza	RA	Nettarine, Sweet o Henry	<i>M. fructicola</i>
131	Bagnacavallo	RA	Nettarine, Red Fair	<i>M. fructicola</i> , <i>M. laxa</i>

Tabella 7 – Sensibilità a tebuconazole in termini di DE50 e CMI (mg/l) nei tre rilievi effettuati (dopo 3-5 e 7 giorni dalla inoculazione)

Codice campione	I rilievo		II rilievo		III rilievo	
	DE50 (mg/l)	CMI (mg/l)	DE50 (mg/l)	CMI (mg/l)	DE50 (mg/l)	CMI (mg/l)
121	0,0019	<1	0,0033	<1	0,0045	<1
122	0,0084	<1	0,0098	<1	0,0069	<1
123	0,035	<10	0,038	<10	0,041	<10
124	0,058	<10	0,113	<10	0,068	<10
125	0,10	>10	0,23	>10	0,28	>10
126	0	<10	0	<10	0	<10
127	0,014	>10	0,281	>10	0,160	>10
128	0,062	<10	0,149	<10	0,113	<10
129	0,01	<10	0,01	<10	0,01	<10
130	0	<10	0	<10	0	<10
131	0,018	<10	0,02	<10	0,0284	<10

Tabella 8 – Sensibilità a boscalid in termini di DE50 (mg/l) nei due rilievi effettuati (dopo 3 e 5 giorni dalla inoculazione)

Codice campione	DE50 (mg/l)	
	I rilievo	II rilievo
121	8,75	13,83
122	1273	709,4
123	13,8	18,9
124	3,51	2,8
125	11,9	20,5
126	0,42	0,7
127	8,74	111,2
128	7,48	478,8
129	9,52	9,9
130	2,85	8,6
131	1,38	0,93

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 44, quindi superiore al numero riportato a livello progettuale (20 analisi/anno).

1.4 PERONOSPORA DELLA VITE

ANNO 1

OBIETTIVI

In seguito alle recenti segnalazioni di cali di efficacia presumibilmente legati all'utilizzo dei CAA (amidi dell'acido carbossilico) e del fluopicolide, sono stati eseguiti saggi di sensibilità sui campioni pervenuti allo scopo di verificare la fondatezza o meno delle ipotesi di campo.

MATERIALI E METODI

Il protocollo sperimentale per l'analisi della sensibilità delle popolazioni del patogeno ai due CAA (mandipropamid e dimethomorph) e a fluopicolide consiste nel biosaggio che prevede il trattamento (preventivo) e inoculazione artificiale di dischetti fogliari di vite. In particolare, dischetti di 22 mm di diametro (da foglie di barbatelle allevate in serra cv Chardonnay) vengono immersi in sospensioni del prodotto formulato o soluzioni del prodotto tecnico oggetto di indagine a diverse concentrazioni di principio attivo (0-1-3 -10 - 30 -100 mg/L per i due CAA, 0-0,5-1-2,5-5-10 mg/L per fluopicolide). Dopo 24 ore i dischetti, opportunamente collocati in piastre Petri da 9 cm di diametro (5 dischetti/piastra - 3 piastre/concentrazione di prodotto), vengono inoculati attraverso la nebulizzazione di sospensioni di sporangi (10^5 /mL) dei singoli campioni. Le piastre vengono quindi collocate in cella climatica a $23\pm 1^\circ\text{C}$ di temperatura, fotoperiodo 12/12 e in condizioni di elevata Umidità Relativa (70-80%). Al termine del periodo di incubazione (6-8 giorni) viene eseguita la valutazione della percentuale di superficie sporulata su ciascun dischetto. I dati vengono quindi analizzati statisticamente tramite Probit al fine di ottenere la Dose Efficace al 50% (DE50) in mg/L che rappresenta la concentrazione di principio attivo capace di inibire lo sviluppo della sporulazione per il 50% rispetto al testimone non trattato.

RISULTATI

Nella tabella 1 sono riportati i risultati delle prove eseguite.

Tabella 1. Sensibilità ai tre diversi fungicidi (DE50 in mg/L) degli 8 campioni di *P. viticola* campionati nel 2016

Codice	Azienda	Comune (Pv)	Varietà	Vigneto (tipologia)	Mandipropamid	Dimethomorph	Fluopicolide
					DE50 (mg/L)		
362	Camerlona	Piangipane (RA)	Trebbiano	Testimone prova prodotti	2,4	0,8	-
363	Camerlona	Piangipane (RA)	Trebbiano	Commerciale	75,3	1,2	-
364	Pagani	Lugo (RA)	Chardonnay	Commerciale	0,01	0,06	-
399	Chiossi Ermenegildo	Poviglio (Re)	Ancellotta	Commerciale	-	0,12	0,77
400	Silva Faustino	Poviglio (Re)	Maestri	Commerciale	-	-	0,47
401	Veroni Pierpaolo	San Martino in Rio (Re)	Lambrusco Salamino	Commerciale	-	-	1,35
402	Medici Ermete	Montecchio Emilia (Re)	Lambrusco Salamino	Commerciale	-	-	1,28
403	Società Agricola Acerbi	Rio Saliceto (Re)	Ancellotta	Commerciale	-	-	1,34

CONCLUSIONI

Attraverso i saggi effettuati non si evidenziano perdite di sensibilità capaci di giustificare cali di efficacia in campo imputabili a dimethomorph e fluopicolide. Un campione dei tre analizzati per mandipropamid (363) ha invece mostrato la presenza di resistenza che ha portato a sconsigliare l'adozione del principio attivo in campo.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 12, quindi rispondente al numero riportato a livello progettuale (10-15 analisi/anno).

ANNO 2 E ANNO 3

Nel 2017 e 2018 non sono pervenuti campioni di peronospora della vite da parte della assistenza tecnica: si è infatti trattato di due stagioni nelle quali l'andamento climatico, pur favorevole inizialmente alle infezioni con piogge e bagnature più o meno persistenti in entrambi gli anni seppure in periodi diversi, è proseguito con mesi di giugno e luglio particolarmente caldi e siccitosi tanto da consentire un rallentamento della difesa senza d'altra parte condurre a problemi particolari. Il ricorso a interventi con prodotti di copertura in miscela con quelli a rischio resistenza ha senza dubbio determinato, nella gran parte delle zone, l'ottenimento di una produzione sana e adeguata.

1.5 ALTERNARIA POMODORO E PATATA

ANNO 1

Non sono stati individuati campioni su questa malattia nel periodo rendicontato a causa dell'andamento climatico sfavorevole alle infezioni. Si prevede comunque di estendere la ricerca di campioni coinvolgendo ulteriormente i tecnici dei partner del GO e del servizio di assistenza tecnica regionale, qualora anche questo non fosse sufficiente si proporrà una loro eventuale sostituzione con avversità fungine/batteriche di maggiore interesse.

ANNO 2 E ANNO 3

Anche nel biennio 2017-18, i tecnici non hanno dovuto affrontare particolari problemi connessi con *Alternaria* spp. su solanacee e quindi non si hanno campioni da rendicontare.

1.6 OIDIO CUCURBITACEE

ANNO 1

Non sono stati individuati campioni su questa malattia nel periodo rendicontato a causa dell'andamento climatico sfavorevole alle infezioni. Si prevede comunque di estendere la ricerca di campioni coinvolgendo ulteriormente i tecnici dei partner del GO e del servizio di assistenza tecnica regionale, qualora anche questo non fosse sufficiente si proporrà una loro eventuale sostituzione con avversità fungine/batteriche di maggiore interesse.

ANNO 2 E ANNO 3

Anche nel biennio 2017-18, i tecnici non hanno dovuto affrontare particolari problemi connessi con *Podosphaera xanthii* e quindi non si hanno campioni da rendicontare.

1.7 SEPTORIOSI DEL FRUMENTO

ANNO 1

OBIETTIVI

Mychosphaerella graminicola anamorph. *Zymoseptoria tritici* è una delle più importanti avversità del frumento. La sua recente diffusione in Italia ha reso necessario l'inserimento di questo patogeno all'interno dei programmi di difesa. Le principali classi di fungicidi utilizzate sono: triazoli, strobilurine, SDHI. In seguito a recenti segnalazioni, da parte della assistenza tecnica della regione Emilia Romagna, di cali di efficacia, risulta necessario saggiare la sensibilità del patogeno nei confronti delle principali classi di fungicidi usate nei programmi di difesa.

MATERIALI E METODI

Allo scopo di ottenere una collezione rappresentativa sono stati prelevati campioni da diverse tipologie di appezzamenti: commerciali trattati e non trattati, sperimentali e un wild type come riferimento (Tabella 1).

L'isolamento del patogeno è avvenuto partendo da foglie infette poste a incubare per 24 ore a elevata umidità. Da ogni macchia, con l'aiuto di un ago, sono stati prelevati i cirri che venivano poi piastrati su PDA addizionato di antibiotici (streptomina e neomicina). Questo ha permesso di ottenere una collezione che è stata valutata con analisi spettrofotometriche nei confronti dei fungicidi elencati nella Tabella 2. Per azoxystrobin e pyraclostrobin le analisi sono state eseguite sugli isolati monomacchia ottenuti dalle foglie da campo, per gli altri fungicidi le analisi sono state eseguite su isolati monoconidici.

Tabella 1. Tipo di appezzamento da cui sono stati prelevati i campioni di *Z. tritici*

CAMPIONE	TIPO DI APPEZZAMENTO	CAMPIONE	TIPO DI APPEZZAMENTO
3	Sperimentale	14	Sperimentale
5	Sperimentale	16	Sperimentale
6	Sperimentale	18	Wild type
7	Sperimentale	20	Commerciale non trattato
8	Sperimentale	21	Commerciale non trattato
9	Commerciale trattato	22	Commerciale non trattato
10	Sperimentale	25	Commerciale non trattato
11	Commerciale trattato	28	Commerciale non trattato
12	Commerciale trattato	29	Commerciale non trattato
13	Sperimentale		

Tabella 2. Fungicidi e relative concentrazioni usate nei saggi di sensibilità nei confronti di *Z. tritici*

FAMIGLIA CHIMICA	PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONI (mg/l)
Strobilurine	Azoxystrobin	0-0,001-0,003-0,01-0,03-0,1-0,3-1-3-10-30
	Pyraclostrobin	0-0,01-0,1-1-2-10
Triazoli	Cyproconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
	Tebuconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
	Prothioconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
	Difenoconazole	0-0,0024-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10
	Eposiconazole	0-0,0024-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10
	Metconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
	SDHI	Isopirazam
	Solatenol	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10
	Bixafen	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10
	Fluopyram	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10

RISULTATI

STROBILURINE

Tutti gli isolati sono stati analizzati nei confronti di azoxystrobin e tre di questi (3-13-14.1) hanno mostrato valori di DE50 superiori alla soglia dei 3 mg/l che in bibliografia viene riportata come un livello medio al di sopra del quale gli isolati dovrebbero essere considerati a ridotta sensibilità alle strobilurine (tabella 3, grafico 1). Con il pyraclostrobin sono stati analizzati gli isolati che avevano mostrato DE50

elevate nei confronti dell'azoxystrobin più almeno un isolato per campione. Tutti isolati hanno mostrato valori molto inferiori alla soglia dei 3mg/l (tabella 3, grafico 2). Per entrambi i prodotti il wild type di riferimento ha mantenuto una DE₅₀ di 0,03 mg/l per l'azoxystrobin e 0,01 mg/l per il pyraclostrobin (tabella 3).

Tabella 3. Valori di DE50 dei 55 isolati di *Z. tritici* nei confronti di azoxystrobin e pyraclostrobin

Isolato	azoxystrobin	pyraclostrobin	Isolato	azoxystrobin	pyraclostrobin
3	4,7	0,22	16.3	0,43	0,15
5.1	1,64	0,37	18.1	0,02	-
5.2	0,97	-	18.2	0,03	>0<0,01
5.3	1,33	0,13	18.3	0,01	-
6.1	0,19	0,33	18.4	0,01	-
6.2	0,09	0,31	18.5	0,01	-
6.3	0,15	-	18.6	0,01	-
7.1	0,84	0,04	20.2	1,92	0,12
7.3	0,01	-	21.1	0,29	0,34
8.1	0,08	0,07	21.2	0,02	0,002
8.2	0,14	-	22.1	0,02	-
9.1	0,2	>0<0,01	22.2	0,46	0,09
9.2	0,01	-	25.1	0,03	-
10.2	0,01	-	25.2	0,06	-
10.3	0,02	-	25.5	0,01	-
10.4	0,018	>0<0,01	25.6	0,01	0,01
11.1	2,06	0,07	25.8	0,01	-
11.2	0,15	0,2	28.1	0,01	-
11.3	2,19	0,03	28.2	0,18	>0<0,01
12.1	0,85	0,17	28.3	0,02	-
12.2	0,93	0,17	28.4	0,09	-
13.1	3,62	0,04	28.5	0,01	-
13.2	2	0,19	29.1	0,48	-
13.3	1,16	0,3	29.2	1,65	0,16
13.5	2,5	0,18	29.3	1	-
14.1	3,11	0,54	29.4	2,88	0,26
16.1	1,01	0,36	29.5	0,88	-
16.2	1,19	0,11	<i>Totale</i>	<i>55 isolati</i>	-

Grafico 1

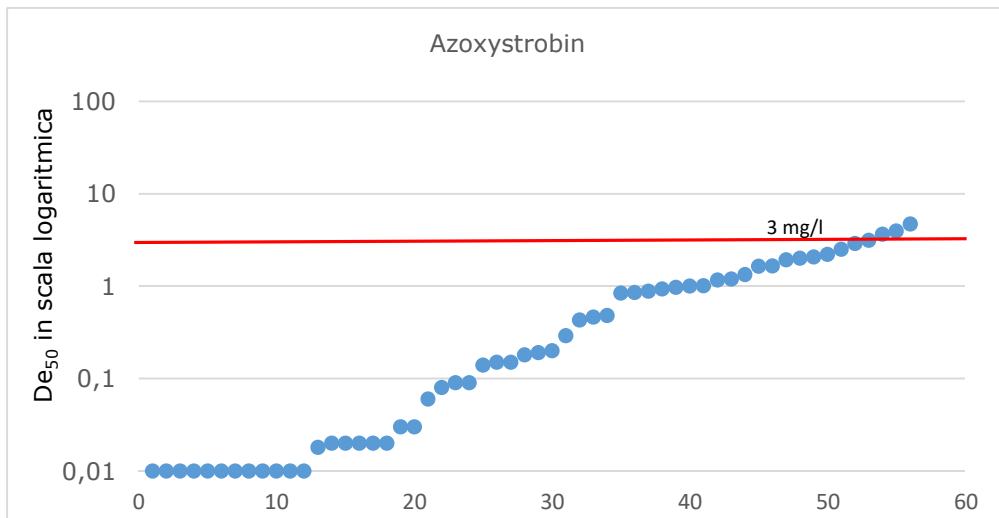
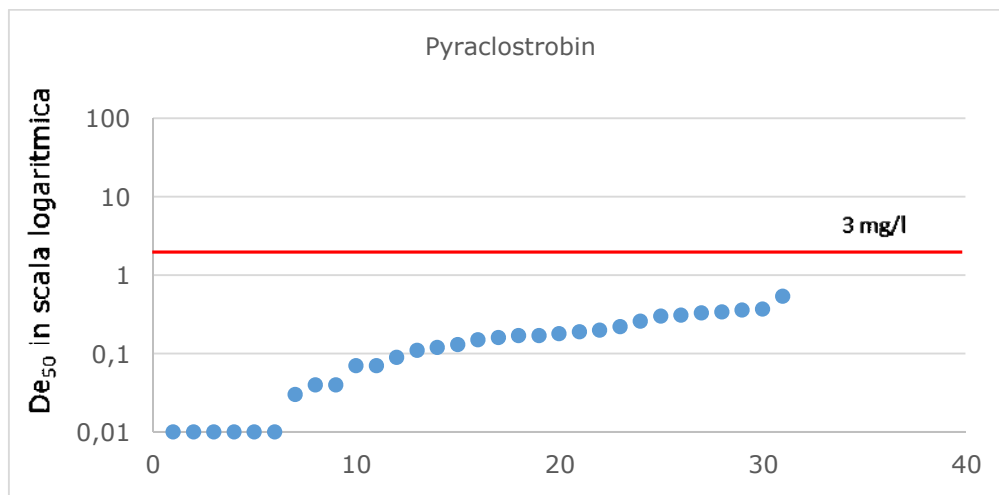


Grafico 2



TRIAZOLI

Come mostrato nella tabella 4 le DE₅₀ per i triazoli hanno un range che varia da: 0,0429 - 17,047 mg/l per cyproconazole, 0,002 - 11,085 mg/l per tebuconazole, 0,06 - 61,601 mg/l per prothioconazole, 0,002-0,89 mg/l per difenoconazole, 0,004 - 2,773 mg/l per epossiconazole, 0,001-0,964 mg/l per metconazole.

Tabella 4. Valori di DE50 di 56 isolati monoconidici di *Z. tritici* nei confronti di vari triazoli.

Isolato	Cyproconazole	Tebuconazole	Prothioconazole	Difenoconazole	Epossiconazole	Metconazole
3m2	4,410	0,980	0,870	0,150	0,044	0,420
5m1	2,670	0,530	0,610	0,290	0,150	0,450
5m2	4,540	4,210	0,590	0,350	0,190	0,320
5m3	1,170	1,710	0,480	0,380	0,230	0,250
6m1	1,390	5,170	0,320	0,710	0,370	0,270
6m2	0,500	1,700	0,320	0,890	0,190	0,220
6m3	5,000	5,730	0,150	0,600	0,350	0,290
6m4	1,490	7,010	0,240	0,480	0,200	0,180
6m5	0,580	2,910	0,090	0,550	0,310	0,170
7m2	0,655	0,200	0,670	0,070	0,780	0,226
8m1	11,657	0,320	0,140	0,105	0,410	0,092
8m2	14,495	0,020	0,230	0,089	0,782	0,062
9m1	7,355	3,170	0,130	0,058	0,050	0,158
10m1	3,065	0,600	0,100	0,009	0,013	<0>0.0098
10m2	1,615	0,970	0,060	0,007	0,004	<0>0.0098
11m3	13,984	2,590	0,230	0,130	0,380	0,599
11m4	0,852	3,070	0,220	0,110	0,279	0,635
11m5	0,230	2,600	0,250	0,140	0,748	0,463
11m6	0,716	0,260	0,190	0,100	0,273	0,300
12m1	17,047	0,020	0,090	0,110	0,176	0,128
12m2	0,730	1,868	0,6437	0,037	0,092	0,104
12m3	12,311	0,030	0,290	0,130	0,358	0,155
12m4	12,507	1,150	0,060	0,071	0,187	0,127
13m3	6,023	0,701	0,130	0,048	0,492	0,140
13m3	0,880	0,012	0,572	0,012	0,081	0,151
13m4	0,910	0,790	1,5141	0,073	0,119	0,133
14m1	6,232	0,023	3,195	0,023	0,508	0,483
14m2	-	0,018	5,719	0,018	1,002	0,706
14m3	2,454	0,016	1,783	0,016	0,443	0,395
14m4	4,811	0,018	4,873	0,018	2,773	0,370
14m5	7,980	0,013	6,072	0,015	2,226	0,629
14m6	3,124	0,016	2,480	0,016	0,381	0,393
16m2	6,581	0,034	3,572	0,034	0,483	0,697
16m3	2,785	0,023	1,724	0,023	0,519	0,350
16m4	1,318	0,009	0,410	0,009	0,181	0,197
18m1	0,135	>0<0.0024	0,179	>0<0.0024	0,025	0,001
18m2	0,104	>0<0.0024	0,144	>0<0.0024	0,024	0,01
18m3	0,142	>0<0.0024	0,107	>0<0.0024	0,022	0,004
18m4	0,083	0,040	0,3946	0,007	0,013	0,001
18m5	0,108	>0<0.0024	0,134	>0<0.0024	0,018	0,001
18m6	0,065	0,627	0,060	0,006	0,038	0,001
20m1	2,807	5,035	5,4132	0,252	0,178	0,343

20m2	5,568	9,809	6,3678	0,271	0,3576	0,639
20m4	3,722	9,000	9,1434	0,294	0,365	0,511
21m1	1,71	3,420	16,4985	0,092	0,202	0,169
21m2	1,5	3,091	14,6967	0,065	0,141	0,159
21m3	0,653	3,251	4,2518	0,079	0,073	0,140
21m4	0,839	1,541	33,5553	0,072	0,180	0,126
22m1	3,142	11,085	61,6013	0,381	2,027	0,964
22m3	1,028	1,836	5,941	0,044	0,141	0,239
22m4	1,537	8,141	33,7781	0,120	0,441	0,734
28m1	0,0429	0,0434	0,2881	0,0022	0,0049	0,01
28m2	0,065	0,0243	0,2894	0,0032	0,0045	0,01
28m5	0,082	0,043	0,2544	0,0036	0,01	0,01
29m2	4,5307	3,2251	5,5218	0,0556	0,1243	0,3957
29m5	3,3608	4,374	2,2339	0,0412	0,2343	0,1865

INIBITORI SUCCINATO DEIDROGENASI (SDHI)

Come mostrato nella tabella 5 le DE₅₀ per gli SDHI hanno un range che varia da: 0,031 - 7,813 mg/l per fluopyram, 0,008- 0,711 mg/l per isopyrazam, 0,007 - 0,420 mg/l per solatenol, 0,006 - 1,763 mg/l per bixafen.

Tabella 5. Valori di DE₅₀ dei 56 isolati monoconidici di *Z. tritici* nei confronti di vari SDHI.

Isolato	Fluopyram	Isopyrazam	Solatenol	Bixafen
3m2	1,58703	0,12802	0,1239	0,08721
5m1	0,32203	0,30909	0,21093	0,05271
5m2	0,40773	0,71103	0,00774	-
5m3	0,81848	0,18408	0,11459	0,0924
6m1	0,18449	0,04203	0,05641	0,05585
6m2	0,48904	0,14299	0,14663	0,12374
6m3	0,27892	0,06049	0,10996	0,15327
6m4	0,2728	0,06113	0,07587	0,15724
6m5	0,05117	0,17387	0,15739	0,14483
7m1	0,07005	0,01966	0,0428	0,02009
7m2	0,31623	0,02555	0,05555	0,06795
8m1	0,35469	0,42906	0,04422	0,74999
8m2	1,15653	0,3703	0,12998	0,36616
9m1	0,60116	0,20734	0,17588	0,02727
10m1	0,03403	0,01753	0,02176	0,01125
10m2	0,41631	0,07213	0,02857	0,07415
11m3	1,73308	0,0448	0,11574	0,06153
11m4	1,6529	0,15459	0,17806	0,12302
11m5	4,86695	0,25247	0,09404	0,13923
11m6	4,07448	0,50744	0,19115	0,13889
12m1	2,0594	0,09262	0,42021	0,13847
12m2	3,103	0,05435	0,21099	0,40473

12m3	0,30973	0,21894	0,33127	0,3155
12m4	1,54605	0,13251	0,13234	0,13846
13m3	0,30811	0,04232	0,0582	0,09359
13m4	4,84973	0,09662	0,05707	0,08041
14m1	0,28095	0,24097	0,17282	0,40622
14m2	3,77203	0,13679	0,26654	1,763
14m3	0,3775	0,06511	0,17833	0,115
14m4	2,52509	0,4596	0,39726	0,564
14m5	1,69642	0,19726	0,21136	0,357
14m6	0,2472	0,57435	0,17959	0,439
16m2	0,13106	0,03355	0,12	0,08365
16m3	0,25422	0,02575	0,02143	0,12196
16m4	0,28823	0,04577	0,03681	0,019
18m1	2,95995	0,01572	0,06935	0,016
18m2	0,65298	0,07771	0,0911	0,03687
18m3	1,17418	0,0232	0,0128	-
18m4	1,26343	0,03845	0,04247	-
18m5	0,35992	0,0405	0,03068	-
18m6	0,3047	0,095	0,06668	0,15562
20m1	0,3047	0,07439	0,09837	0,173
20m2	0,46449	0,0305	0,1908	0,006
20m4	0,44874	0,00878	0,01589	0,052
21m1	2,65834	0,359	0,08292	0,173
21m2	1,74237	0,0305	0,09456	0,006
21m3	7,813695	0,00878	0,01409	0,052
21m4	3,02233	0,08387	0,17907	0,024
22m1	-	0,03639	0,0519	0,010
22m3	-	0,07092	0,01151	0,243
22m4	1,58218	0,13805	0,02502	0,11669
28m1	0,27087	0,00927	0,03114	0,09489
28m2	0,11673	0,00975	0,07168	0,01057
28m5	0,29497	0,11254	0,17562	0,04948
29m2	3,81609	0,04482	0,31619	0,02594
29m5	0,03128	0,06302	0,03548	0,00949

CONCLUSIONI

Strobilurine

Tre su 55 isolati saggiati nei confronti di azoxystrobin hanno mostrato valori al di sopra della soglia dei 3 mg/l. Con il pyraclostrobin tutti gli isolati sono stati invece molto al di sotto della soglia. Considerando che le strobilurine sono prodotti monosito, sono molto soggetti a fenomeni di resistenza causati dalla mutazione G143A che se presente in maniera diffusa, causa livelli di DE50 molto al di sopra della soglia. Dal momento che alcuni dei campioni sono risultati leggermente al di sopra della soglia, è probabile che si stiano selezionando ceppi portanti la mutazione G143A seppure con frequenze molto basse.

Triazoli

Dei sei triazoli considerati, i valori di DE50 risultano in linea con le medie degli altri paesi europei e sostanzialmente di completa sensibilità. Solo per prothioconazole e tebuconazole alcuni ceppi mostrano valori più alti della norma che verranno particolarmente approfonditi attraverso saggi molecolari.

SDHI

I Valori di DE50 degli SDHI risultano essere in linea con gli altri studi europei delineando una situazione di completa sensibilità.

Nonostante l'analisi delle DE50 non faccia sostanzialmente emergere risultati critici per nessuna delle tre classi di fungicidi analizzati, questi dati non sono sufficienti a trarre delle conclusioni riguardanti l'attuale situazione di sensibilità in campo. Risulta quindi necessaria l'analisi delle sequenze degli isolati allo scopo di mettere in evidenza la presenza di eventuali mutazioni.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 641 (di cui 86 per strobilurine, 336 per i triazoli e 219 per gli SDHI): è stato quindi ben più che soddisfatto il numero riportato a livello progettuale (20 analisi/anno). La grande differenza tra quanto preventivato e ciò che è stato presentato a rendicontazione è stato causato dal fatto che, al momento della presentazione del progetto, non si pensava di poter lavorare su un così elevato numero di campioni e, soprattutto, su un così ampio numero di fungicidi fin dall'inizio del progetto.

ANNO 2 e ANNO 3

OBIETTIVI

Mychosphaerella graminicola anamorph. *Zymoseptoria tritici* è una delle più importanti avversità del frumento. La sua recente diffusione in Italia ha reso necessario l'inserimento di questo patogeno all'interno dei programmi di difesa. Le principali classi di fungicidi utilizzate sono: triazoli, strobilurine, SDHI che verranno considerati nelle analisi di sensibilità svolte nel biennio 2017-18.

MATERIALI E METODI

In questo biennio si è ritenuto opportuno effettuare i prelievi principalmente nei campi sperimentali allo scopo di individuare, se presenti, più facilmente eventuali spostamenti di sensibilità dei diversi fungicidi (**Tabella 9**). L'isolamento del patogeno è avvenuto partendo da foglie infette poste a incubare per 24 ore a elevata umidità. Da ogni macchia, con l'aiuto di un ago, sono stati prelevati i cirri che venivano poi piastrati su PDA addizionato di antibiotici (streptomina e neomicina). Questo ha permesso di ottenere una collezione che è stata valutata con analisi spettrofotometriche nei confronti dei fungicidi elencati nella **tabella 10**. Sono anche state messe a punto e condotte analisi molecolari alla ricerca delle mutazioni coinvolte con i fenomeni di resistenza.

Tabella 9. Localizzazione e tipo di appezzamento da cui sono stati prelevati i campioni di *Z. tritici* nel 2017 e 2018. Bis: prelievi successivi dal medesimo campo. FD Frumento Duro, FT Frumento Tenero

Codice campione	Località	Provincia	Origine	Trattato/non trattato	FD o FT
33	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Non trattato	FD
33bis	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Non trattato	FD
34bis	Mirabello	FE	Sperimentale	Non trattato	FD
35	Mirabello	FE	Sperimentale	Priaxor (fluxap+pyraclo)	FD

35bis	Mirabello	FE	Sperimentale	Priaxor (fluxap+pyraclo)	FD
36	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Aficionado (bixafen+tebuc)	FD
36bis	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Aficionado (bixafen+tebuc)	FD
37	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Priaxor (fluxap+pyraclo)	FD
37bis	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Priaxor (fluxap+pyraclo)	FD
38	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Comet (pyraclostrobin)	FD
38bis	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Comet (pyraclostrobin)	FD
39	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Horizon(tebuconazolo)	FD
39bis	Castel Guelfo	BO	Sperimentale	Horizon(tebuconazolo)	FD
40bis	Mirabello	FE	Sperimentale	Horizon(tebuconazolo)	FD
41bis	Mirabello	FE	Sperimentale	Aficionado (bixafen+tebuc)	FD
42bis	Mirabello	FE	Sperimentale	Comet (pyraclostrobin)	FD
43	Molinella	BO	Sperimentale	Aficionado (bixafen+tebuc) Enovit metile	FD
44	Molinella	BO	Sperimentale	Non trattato	FD
47	Finale Emilia	MO	Sperimentale	Non trattato	FD
48	Finale Emilia	MO	Sperimentale	bixafen+ Atelier (Protio+tebuc)	FD
49	Finale Emilia	MO	Sperimentale	bixafen+ Atelier (Protio+tebuc)	FD
51	Molinella	BO	Sperimentale	Non trattato	FD

Tabella 10. Fungicidi e relative concentrazioni usate nei saggi di sensibilità nei confronti di *Z. tritici*

FAMIGLIA CHIMICA	PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONI (mg/l)
Strobilurine	Azoxystrobin	0-0,001-0,003-0,01-0,03-0,1-0,3-1-3-10-30
	Pyraclostrobin	0-0,01-0,1-1-2-10
Triazoli	Cyproconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
	Tebuconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
	Prothioconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
	Difenoconazole	0-0,0024-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10
	Eposiconazole	0-0,0024-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10
	Metconazole	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
SDHI	Isopyrazam	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10
	Solatenol	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10
	Bixafen	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10
	Fluopyram	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10

RISULTATI e CONCLUSIONISTROBILURINE

Tutti gli isolati sono stati analizzati nei confronti di azoxystrobin e pyraclostrobin e, nel caso del primo principio attivo, quattro isolati hanno presentato valori di DE₅₀ superiori alla soglia di 3 mg/l convenzionalmente considerata come un livello medio al di sopra del quale gli isolati dovrebbero essere considerati a ridotta sensibilità alle strobilurine. Gli stessi campioni, saggiati con pyraclostrobin, hanno mostrato livelli compatibili con la sensibilità (**tabella 11**).

Tabella 11. Valori di DE₅₀ dei 20 isolati di *Z. tritici* nei confronti di azoxystrobin e pyraclostrobin

Codice campione	DE ₅₀ (mg/l) azoxystrobin	DE ₅₀ (mg/l) pyraclostrobin
33.3	0,21	0,87
33.1bis	1,56	0,52
34.2bis	0,2	0,33
35.5	0,75	0,24
35.2bis	0,11	0,11
36.2	3,12	0,29
36.2bis	0,63	0,33
37.2	0,33	0,31
37.4bis	0,12	0,11
38.1	2,19	0,71
39.1	1,54	0,16
40.1bis	1,93	0,17

41.1bis	0,71	0,22
42.1bis	1,2	0,91
43.1	4,12	0,68
44.3	7,2	0,92
47.4	9,66	0,64
48.1	0,35	0,19
49.2	0,43	0,24
51.3	0,62	0,33

Nonostante valori di DE50 non assimilabili con la resistenza, in realtà analisi molecolari messe a punto per la ricerca della mutazione G143A (alla base della resistenza alle strobilurine) ha mostrato la sua presenza in tutti gli isolati. Sono in corso valutazione sulla frequenza della mutazione per poter stabilire il reale impatto in campo del fenomeno.

TRIAZOLI

Le DE₅₀ per i triazoli dei 20 campioni hanno mostrato i seguenti range di variazione: cyproconazole da 0,04 a 12,5; difenoconazole da 0,01 a 0,89 mg/l; epossiconazole da 0,004 a 1,56 mg/l; metconazole da 0,001 a 0,85 mg/l; prothioconazole da 0,06 a >40 mg/l e il tebuconazole da 0,009 a 27 mg/l. Molteplici sono state le mutazioni riscontrate attraverso specifici protocolli innovativi messi a punto (A311G, A379G, I381V, Y459D, Y459S, Y461A, Y461S) di cui solo la I381V è legata a resistenza a tebuconazole che quindi potrebbe già causare dei cali di efficacia in campo con questo prodotto.

INIBITORI SUCCINATO DEIDROGENASI (SDHI)

I range di DE₅₀ mostrati da *Z. tritici* nei confronti degli SDHI sono stati: 0,03 – 3,92 mg/l per fluopyram; 0,003- 0,84 mg/l per isopyrazam; 0,002 – 3,7 mg/l per solatenol; 0,001 – 8,32 mg/l per bixafen. Anche in questo caso sono stati messi a punto protocolli per la ricerca delle mutazioni legate a resistenza ma nessuna di quelle evidenziate è legata al fenomeno. Ciò porta a concludere che non esistono al momento problematiche legate alla resistenza nei confronti di questi recenti fungicidi entrati nel mercato anche per i cereali.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 480 complessivi tra saggi allo spettrofotometro e molecolari. Più che soddisfatto è stato quindi il numero riportato a livello progettuale (20 analisi/anno).

1.8 CERCOSPORA DELLA BARBABIETOLA

ANNO 1

OBIETTIVI

Lo scopo, nel corso di questa prima fase del progetto, è stato quello di tenere sotto controllo la sensibilità del fungo in particolare a thiophanate methyl in seguito alla sua reintroduzione nella difesa da cercospora.

MATERIALI E METODI

In seguito al reperimento di tre campioni da un appezzamento nel quale era stata svolta una prova di efficacia prodotti nei confronti di *Cercospora beticola* (tabella 1), sono state ottenute numerose monoconidiche da sottoporre a saggi miceliari su substrato agarizzato addizionato con il principio attivo tecnico di thiophanate methyl a diverse concentrazioni (0-0,125-0,5-1-2,5-5 mg/L). Dopo 7-8 giorni dalla deposizione dei dischetti fogliari, sono stati eseguiti i rilievi misurando i diametri ortogonali delle colonie fungine cresciute. Questi dati sono stati usati per l'ottenimento delle DE50 tramite probit e stabilita la Concentrazione Minima Inibitoria (CMI).

Tabella 1. Caratteristiche e provenienza dei campioni infetti da *Cercospora beticola*.

Codice popolazione	Tipologia	Località
27	Campo sperimentale (testimone non trattato)	Passo Segni (FE)
28	Campo sperimentale (testimone non trattato)	Passo Segni (FE)
29	Campo sperimentale (tratt. In efficacia con TM)	Passo Segni (FE)

RISULTATI

Nella tabella 2 sono riportati i risultati dei saggi.

Tabella 2. Sensibilità (DE50, mg/L) dei campioni di *C. beticola* nei confronti di thiophanate methyl

Codice popolazione	N° monoconidiche totali	DE₅₀ mg/L media (n. monoc. Sensibili)	CMI mg/L isolati sensibili	CMI mg/L isolati resistenti (n. monoc. Resistenti)
27	13	0.18 (6)	< 1	> 5 (7)
28	17	0.24 (2)	< 1	> 5 (15)
29	21	> 5 (0)	-	> 5 (21)

CONCLUSIONI

Solo il 27% degli isolati monoconidici provenienti dai testimoni non trattati sono risultati sensibili a thiophanate methyl (TM) mentre addirittura la totalità di quelli provenienti dalle parcelle trattate con il prodotto risultarono resistenti. Ciò dimostra come l'attività di TM sia interessata dal fenomeno della resistenza e, seppure questo sia stato riscontrato in un appezzamento sperimentale, rappresenta comunque

un fenomeno importante che servirà per meglio comprendere gli eventuali spostamenti di sensibilità che in futuro potranno avvenire in campi commerciali.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 51, quindi è stato superato anche in questa attività il numero riportato a livello progettuale (30 analisi/anno).

ANNO 2 E ANNO 3

OBIETTIVI

Lo scopo, nel corso di questa prima fase del progetto, è stato quello di tenere sotto controllo la sensibilità del fungo in particolare a thiophanate methyl in seguito alla sua reintroduzione nella difesa da cercospora.

MATERIALI E METODI

Nel biennio 17-18 sono state reperite 4 popolazioni di *C. beticola* da 4 appezzamenti localizzati nelle province di Bologna, Modena e Ferrara. Sono state ottenute numerose monoconidiche da sottoporre a saggi miceliari su substrato agarizzato addizionato con il principio attivo tecnico di thiophanate methyl a diverse concentrazioni (0-0,125-0,5-1-2,5-5 mg/L). Dopo 7-8 giorni dalla deposizione dei dischetti fogliari, sono stati eseguiti i rilievi misurando i diametri ortogonali delle colonie fungine cresciute. Questi dati sono stati usati per l'ottenimento delle DE50 tramite probit e stabilita la Concentrazione Minima Inibitoria (CMI).

RISULTATI e CONCLUSIONI

Nella **tabella 12** sono riportati i risultati dei saggi eseguiti.

Tabella 12. Caratteristiche e Sensibilità (DE50 e CMI in mg/L) dei campioni di *C. beticola* nei confronti di thiophanate methyl.

Codice popolazione (Pv di provenienza)	Tipologia	N° monoconidiche	DE ₅₀ (mg/L) media (n. monoc. Sensibili)	CMI mg/L S	CMI (mg/L) R (n. monoc. Resistenti)
30 (BO)	Commerciale	22	0.22 (2)	< 1	> 5 (20)
32 (BO)	Commerciale	20	(0)	-	> 5 (20)
33 (MO)	Commerciale	21	0.24 (8)	< 1	> 5 (13)
35 (FE)	Commerciale	22	0.2 (1)	< 1	> 5 (21)

Solo il 14% degli isolati monoconidici sono risultati sensibili a thiophanate methyl (TM). Ciò mostra come l'attività di TM sia ormai profondamente interessata dal fenomeno della resistenza nei campi commerciali lasciando, dopo la resistenza a triazoli e strobilurine, la difesa da *C. beticola* scarsamente dotata di principi attivi utilizzabili.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 85 superando anche in questa attività il numero riportato a livello progettuale (30 analisi/anno).

1.9 PERONOSPORA DEL BASILICO

ANNO 1

OBIETTIVI

A partire dal 2013, casi di cali di efficacia a metalaxyl di *Peronospora belbahrii* motivati dalla presenza di resistenza del patogeno sono stati chiaramente dimostrati. E' oggi in atto, dopo la sospensione dell'uso di questo principio attivo sostituito con altri comunque a medio-elevato rischio di resistenza, un apparente fenomeno di regressione che sarebbe bene valutare e tenere sotto controllo anche per riuscire a "recuperare" un prodotto dalle ottime caratteristiche di efficacia nei confronti di questo temibile patogeno.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in ambiente controllato di serra su piante di basilico ex Genovese con 8-10 foglie allevate in vaso, trattate con il metalaxyl-M e, come confronto, con mandipropamid, dimethomorph e azoxystrobin autorizzati nella difesa da *P. belbahrii*. Nel caso del metalaxyl-M è stato utilizzato il formulato Ridomil Gold SL a 10 g/hl corrispondente alla dose di etichetta del formulato normalmente utilizzato sul basilico, per azoxystrobin, mandipropamid e dimethomorph sono stati utilizzati rispettivamente Ortiva, Pergado SC e Forum alle dosi previste in etichetta. Le piante venivano trattate con nebulizzatore manuale e dopo 24 ore erano inoculate con una sospensione di sporangi di *P. belbahrii* (100.000/mL) prelevate dai diversi campioni. Dopo la comparsa dei sintomi di peronospora sulle foglie, le piante erano immerse per una notte in camera umida (con 100% di UR) e il giorno successivo si procedeva al rilievo valutando la percentuale di superficie sporulata sulle singole foglie.

Sono stati valutati 4 campioni (più uno rappresentato da ceppo sensibile di riferimento) provenienti da appezzamenti nei quali era stata riscontrata resistenza a metalaxyl negli anni precedenti in seguito alla quale era stata consigliata l'interruzione del principio attivo.

RISULTATI

Nella tabella 1 sono riportati i risultati dei saggi.

Tabella 1. Media (%) della superficie fogliare sporulata su piante nelle tesi trattate con i diversi principi attivi rispetto a quella rilevata su piante non trattate (testimone)

Codice	Provenienza	Testimone non trattato	Metalaxyl	Azoxystrobin	Mandipropamid	Dimethomorph
17	Lugo (RA)	85	32	0	0	0
18	Cadriano (BO)	25	3	0	0	0
19	Gossolengo (PC)	62	4	0	0	0
20	Cesena (FC)	20	0	0	0	0
Ceppo sensibile riferimento	Serra BO	32	0	0	0	0

CONCLUSIONI

Tre dei 4 campioni saggiati mostrano un rientro in sensibilità molto netto mentre quello proveniente da Ravenna non consente la possibilità di reintroduzione del principio attivo in campo.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 16, quindi è stato superato anche in questa attività il numero riportato a livello progettuale (10 analisi/anno).

ANNO 2 E ANNO 3

Nel biennio 2017-18, i tecnici non hanno consegnato campioni di basilico con *Peronospora belbahrii* e quindi non si hanno campioni da rendicontare.

1.10 CANCRO BATTERICO DELL'ACTINIDIA

ANNO 1

OBIETTIVI

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (PSA) è l'agente causale del cancro batterico dell' actinidia una delle principali avversità che colpiscono questa coltura. Attualmente i prodotti rameici costituiscono la base della strategia di difesa contro la malattia: diventa quindi importante monitorare il livello di sensibilità del patogeno nei confronti del rame.

MATERIALI E METODI

Lo studio di sensibilità al rame è stato effettuato su una collezione di ceppi fornita dal Servizio fitosanitario provenienti da diverse provincie dell'Emilia- Romagna (RA- FC- RN -BO- FE), isolati in tre anni differenti 2014-2015-2016 come rappresentato in tabella 1. La sensibilità al rame è stata determinata attraverso saggi di laboratorio che prevedevano la crescita di una sospensione batterica a concentrazione nota (10^3 cfu/ml) su piastre avvelenate con rame ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.) Per la capacità del rame di venire immobilizzato nel substrato, per queste prove si è scelto di utilizzare un substrato minimale il CERIA132 che è stato avvelenato alle seguenti concentrazioni: 0-0,64,1,2-2,4 mM. Trascorsi dai 3 ai 5 gg dall'inoculazione è stata eseguita la conta delle colonie e il calcolo della Concentrazione Minima Inibitoria (CMI).

Tabella 1. Collezione di ceppi di PSA fornita dal Servizio fitosanitario dell'Emilia Romagna

ISOLATO	PROV.	ANNO DI ISOLAMENTO			ISOLATO	PROV.	ANNO DI ISOLAMENTO		
		2014	2015	2016			2014	2015	2016
AA1	RA			X	AS1	FC			X
AB1	FC	X			AT1	FC	X		
AC1	RA	X			AT2	FC	X		
AC2	RA	X			AT3	FC	X		
AD1	RA		X		AU1	FC			X
AD2	RA		X		AU2	FC		X	
AE1	FC		X		AU3	FC		X	
AE2	FC		X		AV1	FC		X	
AF1	RN			X	AZ1	RA			X
AF2	RN			X	BA1	RA		X	
AG1	FC	X			BA2	RA		X	
AG2	FC	X			BA3	RA	X		

AH1	RA		X		BA4	RA		X	
AH2	RA		X		BB1	RA			X
AH3	RA		X		BC1	BO			X
AH4	RA		X		BD1	FE		X	
AH5	RA		X		BE1	RA			X
AH6	RA		X		BE2	RA			X
AI1	RA		X		BF1	RA			X
AI2	RA		X		BG1	FC		X	
AL1	RA	X			BH1	RA		X	
AL2	RA	X			BI1	FC		X	
AM1	BO			X	BL1	RA	X		
AN1	BO			X	BL2	RA	X		
AO1	RA			X	BM1	FC	X		
AP1	RA			X	BN1	FC			X
AQ1	RA			X	BN2	FC			X
AQ2	RA			X	B01	RA			X
AQ3	RA			X	BP1	FE			X
AR1	RA		X						

RISULTATI

Su un totale di 59 isolati ne sono stati analizzati, per il momento, 30 e come rappresentato in tabella 2 hanno mostrato un range di CMI compreso fra 0 e 2,4 mM.

Tabella 2. Concentrazioni Minime Inibitorie (CMI) dei ceppi di PSA nei confronti del rame

CEPPO	CMI (mM)	CEPPO	CMI (mM)
AA	>0,64<1,2	AI	>0,64<1,2
AB	>1,2<2,4	AL1	>0,64<1,2
AC1	>0,64<1,2	AL2	>0,64<1,2
AC2	>0,64<1,2	AN	>0,64<1,2
AD1	>0<0,64	AQ1	>0,64<1,2
AD2	>0<0,64	AQ2	>0,64<1,2
AE1	>0,64<1,2	AR1	>1,2<2,4
AE2	>0,64<1,2	AS1	>0,64<1,2
AF1	>1,2<2,4	AT1	>1,2<2,4
AF2	>1,2<2,4	AT5	>0<0,64
AG1	>0<0,64	AU	>0,64<1,2
AG2	>1,2<2,4	AV	>1,2<2,4
AH1	>0,64<1,2	AZ1	>1,2<2,4
AH2	>0,64<1,2	BA1	>1,2<2,4
AH3	>0,64<1,2	BA4	>0,64<1,2

Dei 30 isolati analizzati: 4 hanno mostrato una CMI >0,64 <1,2 mM, 17 una CMI >0,64 <1,2 mM e 9 una CMI >1,2 <2,4 mM

CONCLUSIONI

Nessuno dei ceppi analizzati fino ad ora ha mostrato livelli di CMI preoccupanti in quanto la maggioranza degli isolati ricade in una CMI >0,64 <1,2 mM che corrispondono a una concentrazione di Cu⁺⁺ >3,25 < 7,5 g/hl molto lontana da quella normalmente utilizzata in campo pari a circa 30 g/hl. Le analisi sono in corso sugli altri isolati e verranno rendicontate il prossimo anno.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 30, quindi è stato superato anche in questa attività il numero riportato a livello progettuale (10 analisi/anno).

ANNO 2 E ANNO 3

OBIETTIVI

Pseudomonas syringae pv. actinidiae (PSA) è l'agente causale del cancro batterico dell'actinidia una delle principali avversità che colpiscono questa coltura. Attualmente i prodotti rameici costituiscono la base della strategia di difesa contro la malattia: diventa quindi importante monitorare il livello di sensibilità del patogeno nei confronti del rame.

MATERIALI E METODI

Lo studio di sensibilità al rame è stato effettuato su una collezione di ceppi fornita dal Servizio fitosanitario provenienti da diverse provincie dell'Emilia- Romagna (RA- FC- RN -BO- FE), isolati in tre anni differenti 2014-2015-2016 come rappresentato in **tabella 13**. La sensibilità al rame è stata determinata attraverso saggi di laboratorio che prevedevano la crescita di una sospensione batterica a concentrazione nota (10³cfu/ml) su piastre avvelenate con rame (CuSO₄ x 5H₂O.) Per la capacità del rame di venire immobilizzato nel substrato, per queste prove si è scelto di utilizzare un substrato minimale il CERIA132 che è stato avvelenato alle seguenti concentrazioni: 0-0,64,1,2-2,4 mM. Trascorsi dai 3 ai 5 gg dall'inoculazione è stata eseguita la conta delle colonie e il calcolo della Concentrazione Minima Inibitoria (CMI).

Tabella 13. Collezione di ceppi di PSA fornita dal Servizio fitosanitario dell'Emilia Romagna. In giallo i ceppi analizzati nel 2017-18.

ISOLATO	PROV.	ANNO DI ISOLAMENTO			ISOLATO	PROV.	ANNO DI ISOLAMENTO		
		2014	2015	2016			2014	2015	2016
AA1	RA			X	AS1	FC			X
AB1	FC	X			AT1	FC	X		
AC1	RA	X			AT2	FC	X		
AC2	RA	X			AT3	FC	X		
AD1	RA		X		AU1	FC			X
AD2	RA		X		AU2	FC		X	
AE1	FC		X		AU3	FC		X	
AE2	FC		X		AV1	FC		X	
AF1	RN			X	AZ1	RA			X
AF2	RN			X	BA1	RA		X	

AG1	FC	X			BA2	RA		X	
AG2	FC	X			BA3	RA	X		
AH1	RA		X		BA4	RA		X	
AH2	RA		X		BB1	RA			X
AH3	RA		X		BC1	BO			X
AH4	RA		X		BD1	FE		X	
AH5	RA		X		BE1	RA			X
AH6	RA		X		BE2	RA			X
AI1	RA		X		BF1	RA			X
AI2	RA		X		BG1	FC		X	
AL1	RA	X			BH1	RA		X	
AL2	RA	X			BI1	FC		X	
AM1	BO			X	BL1	RA	X		
AN1	BO			X	BL2	RA	X		
AO1	RA			X	BM1	FC	X		
AP1	RA			X	BN1	FC			X
AQ1	RA			X	BN2	FC			X
AQ2	RA			X	B01	RA			X
AQ3	RA			X	BP1	FE			X
AR1	RA		X						

RISULTATI e CONCLUSIONI

Su un totale di 60 isolati ne sono stati analizzati 30 nel 2016 e altrettanti nel biennio 17-18. In **tabella 14** sono mostrati i risultati delle analisi svolte nel biennio. In tutti i casi il range di CMI è sempre compreso fra 0 e 2,4 mM.

Tabella 14. Concentrazioni Minime Inibitorie (CMI) dei ceppi di PSA nei confronti del rame

CEPPO	CMI (mM)	CEPPO	CMI (mM)
AH4	>0,64<1,2	BC1	>0,64<1,2
AH5	>0,64<1,2	BD1	>0,64<1,2
AH6	>0,64<1,2	BE1	>0,64<1,2
AI2	>0,64<1,2	BE2	>0,64<1,2
AM1	>0<0,64	BF1	>0<0,64
AO1	>0,64<1,2	BG1	>0,64<1,2
AP1	>0,64<1,2	BH1	>0<0,64
AQ3	>0,64<1,2	BI1	>0,64<1,2
AT2	>1,2<2,4	BL1	>1,2<2,4
AT3	>0,64<1,2	BL2	>0<0,64
AU2	>0<0,64	BM1	>0,64<1,2
AU3	>1,2<2,4	BN1	>1,2<2,4
BA2	>0,64<1,2	BN2	>1,2<2,4
BA3	>0,64<1,2	B01	>1,2<2,4
BB1	>1,2<2,4	BP1	>1,2<2,4

Dei 30 ceppi di PSA analizzati: 5 hanno mostrato una CMI $>0 < 0,64$ mM, 17 una CMI $>0,64 < 1,2$ mM e 8 una CMI $>1,2 < 2,4$ mM. Nessuno dei ceppi analizzati fino ad ora ha mostrato livelli di CMI preoccupanti in quanto la maggioranza degli isolati ricade in una CMI $>0,64 < 1,2$ mM che corrispondono a una concentrazione di $\text{Cu}^{++} > 3,25 < 7,5$ g/hl molto lontana da quella normalmente utilizzata in campo pari a circa 30 g/hl.

Il numero complessivo di analisi effettuato in questa attività è stato pari a 30, quindi è stato superato anche in questa attività il numero riportato a livello progettuale (10 analisi/anno).

CONCLUSIONI TRIENNIO

L'ampia indagine (su migliaia di isolati) sulla sensibilità di molteplici patogeni fungini ai fungicidi a rischio resistenza correntemente utilizzati nella difesa di diverse colture, ha condotto a inquadrare con esattezza la situazione a livello regionale. Patogeni fondamentali come *S. vesicarium* e *V. inaequalis* rispettivamente su pero e melo hanno mostrato di aver acquisito e mantenere la resistenza nei confronti di strobilurine e triazoli (nel caso di *V. inaequalis*). L'agente della maculatura bruna del pero ha invece iniziato a assumere resistenza ai più recenti fungicidi entrati sul mercato quali gli SDHI che dovranno essere attentamente gestiti per non rischiare di perderne i benefici. Da notare come nel 2018 siano stati isolati molteplici ceppi di *Alternaria* spp. insieme a *S. vesicarium*: ciò che ha posto nuovamente l'interrogativo sul ruolo di questo fungo nel determinare i sintomi di maculatura bruna. La presenza di resistenza a boscalid degli isolati di *M. fructicola* porta a riconsiderare con attenzione il ricorso alla miscela boscalid+pyraclostrobin anche se quest'ultimo p.a. non ha mostrato alcuno spostamento. *Zymoseptoria tritici* ha mostrato resistenza alle strobilurine sulla base degli esiti molecolari mentre tra i triazoli solo per tebuconazole è stata rintracciata la mutazione coinvolta. Il thiophanate methyl, a tre anni dal suo reinserimento nella difesa da *C. beticola*, ha determinato una diffusa presenza di isolati resistenti. Al contrario, nonostante l'intenso uso del rame su actinidia, i ceppi batterici prelevati negli anni più recenti non sembrano mostrare spostamenti consistenti della sensibilità a questo metallo pesante.

SOTTO-AZIONE 2: METODI INNOVATIVI PER LA DIAGNOSTICA E LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI SVILUPPO DI RESISTENZA AI PRODOTTI FITOSANITARI PER I PRINCIPALI FITOFAGI IN EMILIA ROMAGNA.

2.1 MYZUS PERSICAE: VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI SELEZIONE DI MECCANISMI DI RESISTENZA DI NUOVI INSETTICIDI ALTERNATIVI AI NEONICOTINOIDI.

Uar: UCSC

OBIETTIVI

In Emilia Romagna l'afide verde del pesco, *Myzus persicae*, ha sviluppato resistenze a molti aficidi e recenti indagini dimostrano preoccupanti livelli di insensibilità anche verso i neonicotinoidi, con un ulteriore aggravamento della resistenza verso i piretroidi. Esistono prodotti alternativi a queste classi di insetticidi, con differenti meccanismi d'azione che sono stati ampiamente inseriti nelle strategie fitosanitarie ma è importante verificare la possibilità che si possano sviluppare resistenze nei confronti di queste molecole quando impiegate per lungo tempo.

Di seguito sono descritte le attività svolte sul triennio di progetto.

MATERIALI E METODI

La prova è stata avviata nell'inverno 2016/17 impiegando popolazioni di *Myzus persicae* raccolte nel corso della stagione precedente nelle aree peschicole romagnole e in allevamento presso il DIPROVES.

Per poter operare in condizioni controllate, dalle diverse popolazioni allevate su piantule di pisello sono stati prelevati 3 individui alati ciascuna. Questi individui sono stati allevati singolarmente su altrettante piantule. Sono stati preparati in questo modo 24 cloni.

Le femmine capostipite dei nuovi cloni sono state prelevate e, dopo aver estratto il DNA con una tecnica di salting out¹, sono state caratterizzate per la presenza delle mutazioni responsabili delle resistenze target-site a piretroidi (M918T, M918L, L1014F), neonicotinoidi (R81T) e dimetilcarbammmati (S431F) impiegando la tecnica PASA (Pcr allele specifica e una sua variante recentemente messa a punto denominata QSGG² (Qualitative Sybr Green Genotyping). Ulteriori esemplari (50) sono stati prelevati da ogni clone e conservati a -80 °C per effettuare successivamente le analisi biochimiche per caratterizzare l'attività esterasica totale.

Derivandole dalle popolazioni caratterizzate, in laboratorio sono state preparate 2 nuove popolazioni di identica composizione, inserendo in egual misura esemplari delle popolazioni precedentemente clonate. E' stata stimata mediante biosaggio la baseline per il flonicamide (Teppeki). Sono state applicate 6 concentrazioni + un testimone non trattato. Per ogni concentrazione sono stati trattati 60 individui separati in 3 repliche. Come metodica di biosaggio si è impiegato un "leaf dip test". Con quesot biosaggio sno stati stimati i vari valori di LC_{nn}. Quindi una delle due popolazioni è stata sottoposta con cadenza quindicinale a selezione impiegando una dose corrispondente all'incirca alla LC₂₅ / LC₃₀. A luglio 2017, dopo 4 cicli di selezione, la popolazione trattata è stata ulteriormente separata in due gruppi uniformi. Con il primo si è proseguito il ciclo di selezioni in corso mentre al secondo è stata applicata una pressione di selezione corrispondente alla concentrazione di campo (50 µg/mL di principio attivo).

La seconda popolazione è invece stata trattata solo con acqua. Al termine dei cicli di selezione è stato effettuato un biosaggio conclusivo e si è effettuata l'estrazione del DNA e la genotipizzazione delle popolazioni "non trattato" e "selezionato a bassa concentrazione". La genotipizzazione della popolazione "selezionato ad alta concentrazione", non inizialmente prevista non è stata effettuata anche a causa della scarsità di individui sopravvissuti alla fine dei cicli di selezione.

RISULTATI

¹ PANINI M., DRADI D., MARANI G., BUTTURINI A., MAZZONI E., 2014 - Detecting the presence of target-site resistance to neonicotinoids and pyrethroids in Italian populations of *Myzus persicae*. Pest Management Science. 70: 931-938. [doi: 10.1002/ps.3630]

² Puggioni, V., Chiesa, O., Panini, M., Mazzoni, E. 2017 - Qualitative Sybr Green real-time detection of single nucleotide polymorphisms responsible for target-site resistance in insect pests: The example of *Myzus persicae* and *Musca domestica*. Bulletin of Entomological Research 107 (1): 96-105. [doi:10.1017/S0007485316000675]

I risultati della genotipizzazione iniziale dei cloni è riportata nella tabella seguente (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati della genotipizzazione dei cloni precedente all'avvio dell'esperimento di selezione.

clone	kdr L1014F	s-kdr M918T atg→acg	new s-kdr M918L atg→ctg	R81T	MACE
196H1	RR	RR	SS	SS	SS
196H2	RR	RR	SS	SS	SS
196H3	SR	SS	SS	SS	SR
197H1	RR	RR	SS	SS	RR
197H2	RR	RR	SS	SS	RR
197H3	RR	RR	SS	SS	RR
200H1	RR	SR	SS	SR	SS
200H2	RR	SR	SS	SR	SS
200H3	RR	SR	SS	SR	SS
201H1	RR	SS	SS	SS	SR
201H2	RR	SS	SS	SS	SR
201H3	RR	SS	SS	SS	SR
202H1	SR	SR	SR	SS	SR
202H2	SR	SR	SR	SS	SR
202H3	SR	SR	SR	SS	SR
202H4	-	SR	SR	SS	SR
202H5	-	SR	SR	SS	SR
202H6	-	SR	SR	SS	SR
202H7	-	SR	SR	SS	SR
202H8	-	SR	SR	SS	SR
202H9	-	SR	SR	SS	SR
202H10	-	SR	SR	SS	SR
202H11	-	SR	SR	SS	SR
202H12	-	SR	SR	SS	SR

In base ai risultati indicati nella tabella 1 sono stati scelti i seguenti cloni (evidenziati in giallo in Tabella 1):

- 1) 196H1
- 2) 196H3
- 3) 197H1
- 4) 200H1
- 5) 201H1
- 6) 202H1

A questi cloni sono stati aggiunti i seguenti:

- 7) 1X
- 8) 62H2
- 9) 99H
- 10) 97H

Il clone 7 (1X) è lo standard di riferimento interno a DIPROVES per un clone completamente sensibile. I cloni da 8 a 10 sono cloni che presentano particolari combinazioni di mutazioni "target-site" e usati anch'essi usati come standard di riferimento nel nostro laboratorio (vedi Panini *et al.*, 2014; Puggioni *et al.*, 2017) come indicati nella tabella seguente (Tabella 2).

Tabella 2. Genotipi dei cloni di riferimento aggiunti alla popolazione mix.

clone	kdr L1014F	s-kdr M918T atg→acg	new s-kdr M918L atg→ctg	R81T	MACE
1X	SS	SS	SS	SS	SS
62H2	SR	SR	SS	SS	SS
97H	RR	RR	SS	SR	SS

99H	SR	SR	SS	RR	SS
-----	----	----	----	----	----

La mortalità a 72 ore dal trattamento, misurata nel biosaggio con Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguito sulla popolazione "mix" è stata analizzata con l'analisi dei probit mediante il software "Polo Plus" (Le Ora Software). La stima dei parametri della relazione "concentrazione - mortalità" è riportata in tabella 3. Nel grafico seguente (Figura 1) è stata tracciata la curva stimata dall'analisi dei probit.

Tabella 3. Baseline per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione "mix". Parametri stimati con l'analisi dei probit.

	parameter	standard error	t ratio
PRE	-1.313	0.439	-2.992
NATURAL	0.242	0.051	4.781
SLOPE	1.853	0.393	4.715

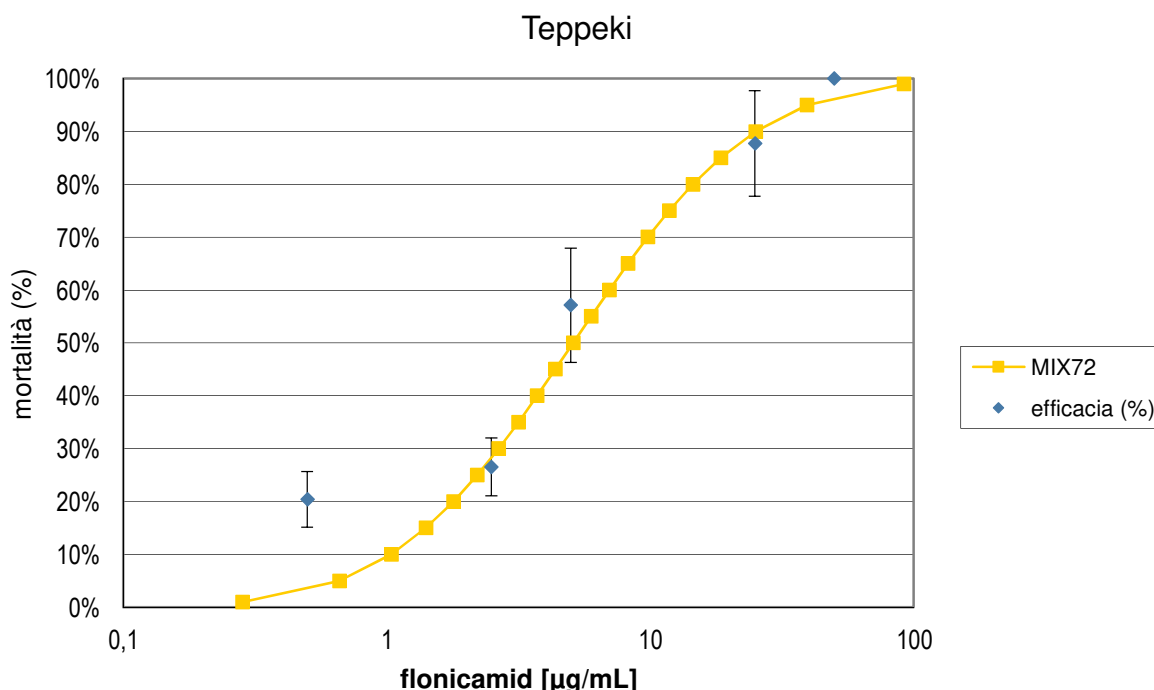


Figura 1. Baseline per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione "mix".

In base alle dosi efficaci stimate impiegando questa baseline è stato stabilito di usare per le successive applicazioni di selezione la concentrazione di 2 µg/mL di principio attivo corrispondente all'incirca alla LC₂₅. La popolazione è stata suddivisa e una parte è stata sottoposta a selezione trattando le piante con 2 µg/L di flonicamide mentre un'altra è stata tenuta come gruppo di controllo e trattata solo con acqua. Questa attività è stata avviata il 10/05/2017 e si sono susseguite, con intervallo all'incirca quindicinale, 16 cicli di selezione fino al 28/02/2018. Il biosaggio finale sia sulla popolazione trattata che quella non trattata è stato eseguito il 13/03/2018.

A luglio 2017, dopo 4 cicli di selezione, a una metà della popolazione trattata è stata applicata una pressione di selezione corrispondente alla concentrazione di campo (50 µg/mL). I sopravvissuti di questo gruppo hanno subito ulteriori 4 cicli di selezione con la stessa dose fino al 25/10/2017. Il 6/11/2017 su questa popolazione è stato effettuato il biosaggio finale.

I parametri delle baselines stimate sulle popolazioni risultanti dopo le serie dei trattamenti di selezione sono riportati nelle tabelle e nel grafico seguenti (Tabella 4 - Tabella 6; Figura 2).

Tabella 4. Baseline per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione non selezionata (PST_NT) al termine dell'esperimento (13/03/2018). Parametri stimati con l'analisi dei probit.

	parameter	standard error	t ratio
PST_NT	-1.085	0.488	-2.221
NATURAL	0.197	0.046	4.256
SLOPE	2.277	0.541	4.207

Tabella 5. Baseline per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione selezionata con la LC₂₅, (PST_T(L)), al termine dell'esperimento (13/03/2018). Parametri stimati con l'analisi dei probit.

	parameter	standard error	t ratio
PST_T(L)	-2.034	0.491	-4.142
NATURAL	0.161	0.038	4.224
SLOPE	2.859	0.586	4.880

Tabella 6. Baseline per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione selezionata con dose di etichetta (50 µg/mL) (PST_T(H)), al termine dell'esperimento (13/03/2018). Parametri stimati con l'analisi dei probit.

	parameter	standard error	t ratio
PST_T(H)	-1.178	0.477	-2.469
NATURAL	0.136	0.062	2.195
SLOPE	1.834	0.450	4.071

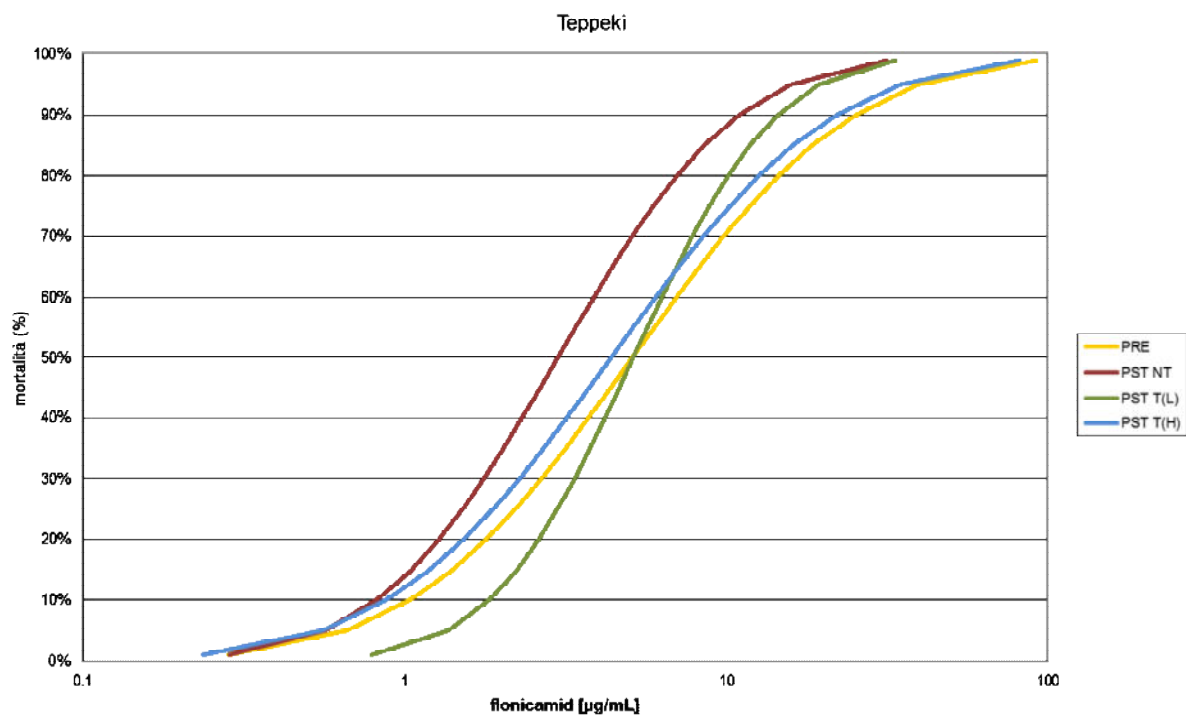


Figura 2. Baselines per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) stimate prima e dopo le sequenze di selezione.

Le varie baselines sono state messe a confronto a coppie per evidenziare eventuali differenze statisticamente significative tra le relazioni "concentrazione - mortalità" stimate prima e dopo la selezione e tra i differenti regimi di selezione. I risultati di tali confronti sono riportati nelle tabelle seguenti (Tabella 7 - Tabella 12).

Tabella 7. Confronto tra le baselines per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione di partenza (PRE) e la popolazione non selezionata al termine dell'esperimento (PST_NT).

<p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 5.33, degrees of freedom: 2, tail probability: 0.070)</p> <p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 0.54, degrees of freedom: 1, tail probability: 0.463)</p> <p>-----</p>

Tabella 8. Confronto tra le baselines per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione di partenza (PRE) e la popolazione selezionata con LC₂₅ al termine dell'esperimento (PST_T(L)).

<p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 2.84, degrees of freedom: 2, tail probability: 0.242)</p> <p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 2.70, degrees of freedom: 1, tail probability: 0.101)</p> <p>-----</p>

Tabella 9. Confronto tra le baselines per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione di partenza (PRE) e la popolazione selezionata con dose di etichetta al termine dell'esperimento (PST_T(H)).

<p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 0.33, degrees of freedom: 2, tail probability: 0.849)</p> <p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 0.00, degrees of freedom: 1, tail probability: 0.968)</p> <p>-----</p>

Tabella 10. Confronto tra le baselines per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione di non selezionata (PST_NT) e la popolazione selezionata con LC₂₅ al termine dell'esperimento (PST_T(L)).

<p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 3.16, degrees of freedom: 2, tail probability: 0.206)</p> <p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 0.54, degrees of freedom: 1, tail probability: 0.462)</p> <p>-----</p>

Tabella 11. Confronto tra le baselines per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione di non selezionata (PST_NT) e la popolazione selezionata con dose di etichetta al termine dell'esperimento (PST_T(H)).

<p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 3.02, degrees of freedom: 2, tail probability: 0.221)</p> <p>-----</p> <p>HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 0.52, degrees of freedom: 1, tail probability: 0.470)</p> <p>-----</p>

Tabella 12. Confronto tra le baselines per il Teppeki (p.a., Fluonicamid) eseguita sulla popolazione selezionata con LC₂₅ (PST_T(L)) e la popolazione selezionata con dose di etichetta al termine dell'esperimento (PST_T(H)).

HYPOTHESIS OF EQUALITY (equal slopes, equal intercepts): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 2.47, degrees of freedom: 2, tail probability: 0.290)
HYPOTHESIS OF PARALLELISM (equal slopes): NOT REJECTED (P>0.05) (chi-square: 2.43, degrees of freedom: 1, tail probability: 0.119)

La genotipizzazione delle popolazioni al termine dell'esperimento è stata eseguita, come previsto da progetto, sulla popolazione non trattata (PST_NT) e su quella selezionata con la LC₂₅ (PST_T(L)). I risultati di questa genotipizzazione sono riportati nelle tabelle seguenti (Tabelle 13 - 14).

Tabella 13. Risultati della genotipizzazione della popolazione non trattata (PST_NT) al termine dell'esperimento di selezione.

Genotipo	casi	%
L1014F RR /M918T SS /R81T SS /S431F n.d. x 2	2	5
L1014F RR /M918T SS /R81T SS /S431F SS	0	-
L1014F RR /M918T SS /R81T SS /S431F SR	25	62.5
L1014F SR /M918T SS /R81T SS /S431F n.d. x 2	1	2.5
L1014F SR /M918T SS /R81T SS /S431F SS	11	27.5
L1014F SR /M918T SS /R81T SS /S431F SR	1	2.5

Tabella 14. Risultati della genotipizzazione della popolazione selezionata con la LC₂₅ (PST_T(L)) al termine dell'esperimento di selezione.

genotipo	casi	%
L1014F RR /M918T SS /R81T SS /S431F n.d. x 2	0	-
L1014F RR /M918T SS /R81T SS /S431F SS	1	2.5
L1014F RR /M918T SS /R81T SS /S431F SR	17	42.5
L1014F SR /M918T SS /R81T SS /S431F n.d. x 2	0	-
L1014F SR /M918T SS /R81T SS /S431F SS	21	52.5
L1014F SR /M918T SS /R81T SS /S431F SR	1	2.5

La selezione e, probabilmente, anche la differente fitness hanno inciso significativamente sulla permanenza nelle popolazioni dei vari genotipi introdotti nel pool di partenza. Anche in assenza di selezione gli esemplari con i genotipi più resistenti a piretroidi, neonicotinoidi e dimetilcarbammati sono scomparsi dal pool della popolazione. In entrambi i casi (selezionato e non) i genotipi prevalenti risultano essere moderatamente/leggermente resistenti ai piretroidi e ai dimetilcarbammati. E' stata anche riscontrata la presenza di combinazioni genotipiche non presenti nel pool di partenza e che si ritiene possano essere dovute all'a comparsa casuale di mutazioni nei loci di interesse probabilmente causta dalle condizioni di stress dovute ai trattamenti a basso dosaggio come evidenziato in precedenti studi indicati in letteratura³.

³ GRESSEL J., 2011 - Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. Pest Management Science. 67:253-257. [doi: 10.1002/ps.2071].

Anche l'analisi delle attività esterasiche totali eseguite sui pool delle popolazioni non ha evidenziato significativi spostamenti tra le diverse popolazioni.

CONCLUSIONI

Al termine dell'attività, si evidenzia che, anche dopo una serie abbastanza significativa di cicli di selezione, il prodotto (flonicamid) mantiene la sua piena efficacia e non si è riscontrato un significativo spostamento delle baselines. Anche una selezione più energica, con la dose di campo, non ha modificato i livelli di sensibilità ma si è anzi verificata una costante difficoltà a mantenere vitale tale popolazione, motivo per il quale questa parte dell'esperimento, comunque inizialmente non prevista nel progetto, è stata terminata dopo una serie più limitata di cicli di selezione.

2.2 APHIS GOSSYPYI: INNOVAZIONE DELLE TECNICHE DI DETERMINAZIONE DEI MECCANISMI DI RESISTENZA

Uar: UCSC

OBIETTIVI

L'afide del melone (*Aphis gossypii*) è una specie polifaga in grado di danneggiare molte essenze ortive e ornamentali. I danni diretti causati dalle sue infestazioni sono ulteriormente aggravati dalla forte produzione di melata e dalla capacità di trasmettere varie virosi alle piante ospiti.

In Italia le problematiche correlate alla presenza e soprattutto alle difficoltà di lotta contro questo afide sono state saltuarie, le ultime risalgono al periodo 2012-13. Per queste ragioni non sono mai state condotte prove sperimentali adeguate e costanti nel tempo. La conoscenza della distribuzione e caratterizzazione dei meccanismi di resistenza rappresenterebbero un'eccellente innovazione nel migliorare e ottimizzare le strategie di difesa nei confronti di questa avversità. Per ottenere questo risultato si intende innovare il sistema di identificazione applicando e ottimizzando per questa specie le metodiche disponibili e già consolidate per identificare le stesse forme di resistenza in *M. persicae*. In particolare si vuole estendere anche ad *Aphis gossypii* una particolare tecnica di PCR che consente di evidenziare le differenze alleliche causate dalle mutazioni puntiformi responsabili delle resistenze target site. La tecnica denominata QSGG (Qualitative Sybr Green Genotyping), riportata da Puggioni e colleghi (2017) permette di effettuare una diagnosi molto veloce utilizzando una PCR allele specifica in tempo reale che usa primers "standard" invece delle costose sonde fluorescenti impiegate con la tecnica Taqman. La tecnica misura la differenza nel numero di cicli necessari a iniziare la visualizzazione della fluorescenza che si verifica quando si ha amplificazione del DNA.

Le attività svolte nell'intero progetto sono di seguito descritte.

MATERIALI E METODI

Durante tutta la durata del progetto sono state raccolte in tutto il territorio regionale, da vari ospiti, 23 popolazioni di *Aphis gossypii*. L'elenco e le caratteristiche delle varie popolazioni è riassunto nella tabella seguente (Tabella 15)

Tabella 15. Elenco delle popolazioni di *Aphis gossypii* utilizzate nel corso delle prove.

Popolazione	Ospite	Data di raccolta	Provincia	Località/Azienda
AG_1	Zucchini	25/08/2016	Cesena	Martorano
AG_2	Zucchini	25/08/2016	Cesena	Martorano
AG_3	Melanzana	25/08/2016	Cesena	Martorano
AG_5	Melanzana	20/07/2017	Cesena	Martorano
AG_6	Melanzana	22/07/2017	Cesena	Martorano
AG_7	Ibiscus	08/05/2018	Piacenza	Castelnovo
AG_8	Ibiscus	11/05/2018	Piacenza	Castelnovo
AG_9	Zucchini	18/06/2018	Bologna	Bologna
AG_10	Ibiscus	29/04/2019	Piacenza	Castelnovo
AG_11	Anguria	18/04/2019	Ravenna	Faenza
AG_12	Zucchini	26/04/2019	Piacenza	Mortizza
AG_13	Cetriolo	08/06/2019	Piacenza	Pontenure
AG_14	Zucchini	09/06/2019	Piacenza	Mucinasso
AG_15	Melone	10/06/2019	Piacenza	Caorso
AG_16	Melone	10/06/2019	Piacenza	Caorso
AG_17	Cetriolo	10/07/2019	Ravenna	San Pietro in Vincoli
AG_18	Melanzana	10/07/2019	Cesena	Martorano
AG_19	Melone	25/07/2019	Bologna	Casalmaggiore
AG_20	Melone	25/07/2019	Bologna	Casalmaggiore
AG_21	Melone	26/07/2019	Bologna	Casalmaggiore
AG_22	Cetriolo	25/07/2019	Bologna	Casalmaggiore
AG_23	Melone	25/07/2019	Bologna	Casalmaggiore
AG_24	Melone	25/07/2019	Bologna	Casalmaggiore

Gli afidi raccolti, dopo essere stati identificati, sono stati trasferiti in tubi eppendorf e quindi congelati in attesa dell'estrazione degli acidi nucleici.

E' stata quindi effettuata una ricerca in banca dati (NCBI) e in letteratura per identificare le sequenze genomiche dei bersagli di neonicotinoidi e piretroidi. Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante il software UNIPRO UGENE⁴ per l'individuazione dei loci delle mutazioni e la progettazione dei primers per le successive analisi di PCR.

In tutte le popolazioni delle quali è stato raccolto/ricevuto un numero sufficiente di esemplari vivi si è anche verificata la possibilità di analizzare, impiegando protocolli già validati con *Myzus persicae*, l'attività esterasica totale.

RISULTATI

Estrazione del DNA da singoli individui di *Aphis gossypii*

Le prove di estrazione con la tecnica "salting out" precedentemente utilizzata per l'estrazione di DNA da *Myzus persicae* hanno fornito risultati soddisfacenti nei test preliminari ed è pertanto stata adottata come standard per effettuare tutte le estrazioni.

Ricerca delle sequenze e dei primers

La ricerca in letteratura e in banca dati (NCBI) ha fornito le seguenti sequenze dei geni codificanti i target degli insetticidi:

a) *Recettore nicotinico – target degli insetticidi neonicotinoidi – mutazione R81T.*

La sequenza genomica è stata ricavata dalla pubblicazione di Toda e colleghi (2017)⁵ (Figura 3).

⁴ Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. 2012 - Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28: 1166-1167. [doi:10.1093/bioinformatics/bts091].

⁵ Toda S., Hirata K., Yamamoto A., Matsuura A. 2017 - Molecular diagnostics of the R81T mutation on the D-loop region of the $\beta 1$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor gene conferring resistance to neonicotinoids in the

Fig. 2 Sequences of the exon region including the nAChR $\beta 1$ loop-D region and introns flanking it in the neonicotinoid-resistant allele of *A. gossypii*. The protein coding sequence is presented in *uppercase*, and the intron sequence in *lowercase*. Underlined regions are the oligonucleotide primers. The R81T mutation site was squared. Actually the resistant strain was heterozygous for cytosine and guanine in this site. The susceptible allele has guanine in this site

```

aaaaaaaaatcaatcataaaaacacaacattcctctgctatggtgtatggttatgcatcattcatgaatagaagtgct
ataaatagaattattttgctgtctatatagttacatataataatataaatatogaatgaatatataatttttggtta
taagaataaatatatttaattgcttaatttaacattatttgcatacgtggtacgtacataatattatacattcttatt
tcataaggTTTTTTTaaatattattacataaattttttatacactgattaaaaacatacaaaattacactagtaagaatt
aaattattcatataattgtatgttttatttatataaatttaagttaaataagtttaataacagatttggtaaaaaata
aatagaataacaaactattaattttataaattattgctaattataaaatataaaataaaaaatattgttttactt
gttacagAACGAAAAGAGTCAAATAATGAAATCGAACGTTTGGTTGACACTTgtgagtaccaactaatatattatttt
cagtttgaatcagaaaaataaaaaataaacagttcttatcaggcgtattagacgtcttatccgactacgtattata
aacactaatatcgcttaaaaggaggaaacttacttagcaatttttctctttatatttgcctgactgcaaaccttca
tttatttttttcaattaatcaacgtaattgcogtgcctctatttcaatccgttattattatttatttataatttttaa
ttatttactgaatcattttgaaaatgtttacgtagttttatttataaattggtcagatccattttaaagggttc
tctttcacaaaatgccacatttatttaagttagtaaaacaaaataaaagtgatgataatgataatataatagatat
tttgttcacagtttttttaacctgttttaattatctcatttttaataaccgtaaatgtgatttttagaatagcca
agacaaatattagactaattaagtaacttattacgttctaaaatt

```

Figura 3. Sequenza genomica parziale della sub-unità beta 1 del recettore nicotinico come pubblicata da Toda et al., 2017.

Basandosi sulla sequenza e su alcuni dei primers indicati dagli autori sono stati sintetizzati i seguenti primers per essere impiegati secondo la metodica già sperimentata del QSGG:

Tipo primer	Nome primer	sequenza (5' – 3')
comune	Agb1MarkerR	GAACGGTTTGCAGTCAAGCAAATAT
allele sensibile	Agb1Mwt_F1	TAATGAAATCGAACGTTTGGTTGAG
allele resistente	Agb1MF1	TAATGAAATCGAACGTTTGGTTGAC

Le condizioni di amplificazione che hanno fornito i migliori risultati sono state le seguenti: a) riscaldamento iniziale a 95 °C per 15' seguito da una serie di 40 cicli termici così formati: a) 95 °C per 5" (denaturazione); b) 62 °C per 30" (appaiamento primers); c) 72 °C per 30" (estensione).

b) *Canale del sodio voltaggio dipendente – target degli insetticidi piretroidi – mutazioni M918L, M918T e L1014F.*

Partendo da una serie di sequenze disponibili in banca dati (NW_021007327⁶; AF412814.1⁷; HQ896737.1⁸) per mezzo del software bioinformatico UGENE, le sequenze sono state allineate e sono stati individuati i

cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) Appl Entomol Zool (2017) 52:147–151. DOI 10.1007/s13355-016-0449-9

⁶ Quan,Q., Hu,X., Pan,B., Zeng,B., Wu,N., Fang,G., Cao,Y., Chen,X., Li,X., Huang,Y. and Zhan,S., 2018 - Draft genome of the cotton aphid *Aphis gossypii*. Insect Biochem. Mol. Biol. 105: 25-32 (*Aphis gossypii* isolate AGOS-L3 breed cotton aphid unplaced genomic scaffold, ASM401081v1 AgSCF1250, whole genome shotgun sequence).

⁷ *Aphis gossypii* strain 171B voltage sodium channel protein (Super-kdr) mRNA, Super-kdr-2 allele, partial cds

⁸ *Aphis gossypii* strain Cu-Y&P voltage sensitive sodium channel mRNA, partial cds

loco delle mutazioni già descritte in *Aphis gossypii* e riportate nella letteratura internazionale^{9,10,11}

Sono state quindi sintetizzate alcune serie di primers per individuare le mutazioni al locus *s-kdr* (mutazione M918L) e *kdr* (mutazione L1014F).

I seguenti per individuare la mutazione al locus *kdr*:

Tipo primer	Nome primer	sequenza (5' – 3')
comune	AgKDR-FW	CCGTTATGGGTATGCAGTTA
allele sensibile	AgKDR-RE-s	TCGAAATACTATCATAAACGAG
allele resistente	AgKDR-RE-r	CTCGAAATACTATCATAAACGAA

Per questo set di primers sono state utilizzate le seguenti condizioni di amplificazione: a) riscaldamento iniziale a 95 °C per 15' seguito da una serie di 40 cicli termici così formati: a) 95 °C per 5" (denaturazione); b) 55 °C per 30" (appaiamento primers); c) 72 °C per 30" (estensione).

I seguenti primers sono stati scelti per individuare la mutazione al locus *s-kdr* che necessita a causa di una serie nota di polimorfismi la combinazione di 3 reazioni in cui si combinano 5 primers differenti:

Tipo primer	Nome primer	sequenza (5' – 3')
comune	AgSK-RE-r	TATACACGTTGGTTCTCCGAC
allele resistente (T)	AgSK-FW-rT1	CACACTTAATCTTTTAATATCAATAT
allele resistente (C)	AgSK-FW-rC1	CACACTTAATCTTTTAATATCAATAC
allele sensibile (A)	AgSK-RE-sA1	AGCACCAATGGTTCGACCCAT
comune	AgSK-FW-s	CTCTCTGCGGGTTACCAAGG

Per questi set di primers sono state utilizzate le seguenti condizioni di amplificazione: a) riscaldamento iniziale a 95 °C per 15' seguito da una serie di 40 cicli termici così formati: a) 95 °C per 5" (denaturazione); b) 60 °C per 30" (appaiamento primers); c) 72 °C per 30" (estensione).

c) *Acetilcolinesterasi – target degli insetticidi dimetilcarbammati – mutazione S431F.*

Anche per questo target, partendo da una serie di sequenze disponibili in banca dati (AF502082.1¹², KR024318.1¹³, KR024317.1¹⁴, KR024316.1¹⁵, KR024314.1¹⁶, AB158641.1¹⁷, AB158640.1¹⁸, AB158639.1¹⁹,

⁹ Marshall KL, Moran C, Chen Y, Herron GA, 2012 - Detection of *kdr* pyrethroid resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), using a PCR-RFLP assay *Journal of Pesticide Science*. 37: 169-172

¹⁰ Suann M, Bogema DR, Chen Y, Mansfield S, Barchia IM, Herron G.A., 2015 - A TaqMan qPCR method for detecting *kdr* resistance in *Aphis gossypii* demonstrates improved sensitivity compared to conventional PCR-RFLP. *Journal of Pest Science*. 88: 785-791

¹¹ Chen X, Tie M, Chen A, Ma K, Li F, Liang P, Liu Y, Song D, Gao X., 2017 - Pyrethroid resistance associated with M918 L mutation and detoxifying metabolism in *Aphis gossypii* from Bt cotton growing regions of China. *Pest Management Science*. 73: 2353-2359

¹² Li F, Han Z J, 2002 - Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*) *Genome* 45: 1134-1141 (*Aphis gossypii* clone ace2 acetylcholinesterase mRNA, complete cds)

¹³ *Aphis gossypii* voucher ORP SP-LK175 acetylcholinesterase (*ace2*) gene, partial cds

¹⁴ *Aphis gossypii* voucher ORP SP-LK174 acetylcholinesterase (*ace2*) gene, partial cds

¹⁵ *Aphis gossypii* voucher ORP SP-LK173 acetylcholinesterase (*ace2*) gene, partial cds

¹⁶ *Aphis gossypii* voucher ORP SP-LK171 acetylcholinesterase (*ace2*) gene, partial cds

¹⁷ *Aphis gossypii* Ace2 mRNA for acetylcholinesterase 2, complete cds, haplotype:GSM-2

¹⁸ *Aphis gossypii* Ace2 mRNA for acetylcholinesterase 2, complete cds, haplotype:GSM-1

¹⁹ *Aphis gossypii* Ace2 mRNA for acetylcholinesterase 2, complete cds, haplotype:H-16-2

AB158638.1²⁰, AB158637.1²¹), per mezzo del software bioinformatico UGENE, sono stati individuati i loci delle mutazioni note in *Aphis gossypii* dalla letteratura internazionale^{22,23,24}

Sono state quindi sintetizzate alcune serie di primers per individuare la mutazione S431F.

Tipo primer	Nome primer	sequenza (5' – 3')
comune	AgAceF	CAAGCCATCATGGAATCAGG
allele sensibile	MpACEs	GCTCCGTCAAATAATAAAATATTG
allele resistente	MpACEr	GCTCCGTCAAATAATAAAATATAA

Per questo set di primers sono state utilizzate le seguenti condizioni di amplificazione: a) riscaldamento iniziale a 95 °C per 15' seguito da una serie di 40 cicli termici così formati: a) 95 °C per 5" (denaturazione); b) 57 °C per 30" (appaiamento primers); c) 72 °C per 30" (estensione).

Verifica dei primers e analisi delle popolazioni

Per ognuna delle popolazioni, in funzione del materiale disponibile sono stati analizzati da 10 a 24 esemplari per un totale complessivo di 454 individui. Tutti gli individui analizzati sono risultati sensibili al locus *kdr* e non sono neppure state trovate mutazioni responsabili della resistenza ai neonicotinoidi. Percentuali importanti di esemplari portavano invece le mutazioni M918L (la mutazione M918T ampiamente diffusa nelle popolazioni di *Myzus persicae* e di *Musca domestica* non è stata individuata) solo in eterozigosi. La mutazione S431F è invece stata frequentemente individuata anche in omozigosi (Tabella 16; Figura 4). In una molto ridotta percentuale di casi non si è ottenuta amplificazione (etichette "negativo in tabella, "FL" nel grafico), soprattutto per quanto riguarda l'identificazione della mutazione S421F (Tabella 16).

Tabella 16. Percentuale di genotipi riscontrati nelle popolazioni analizzate (Legenda: ss: sensibile omozigote; rr: resistente omozigote; sr: eterozigote)

Genotipo	R81T	L1014F	M918L	S431F
ss	100.0%	100.0%	29.7%	9.5%
sr	0.0%	0.0%	69.8%	23.6%
rr	0.0%	0.0%	0.0%	62.3%
negativo	0.0%	0.0%	0.4%	4.6%

²⁰ *Aphis gossypii* Ace2 mRNA for acetylcholinesterase 2, complete cds, haplotype:H-16-1

²¹ *Aphis gossypii* Ace2 mRNA for acetylcholinesterase 2, complete cds

²² Andrews MC, Callaghan A, Field LM, Williamson MS, Moores GD, 2004 - Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Molecular Biology*. 13: 555-561

²³ Lokeshwari D, Krishna Kumar NK, Manjunatha H., 2016 - Multiple mutations on the second acetylcholinesterase gene associated with dimethoate resistance in the melon aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 109: 887-897

²⁴ Toda S, Komazaki S, Izawa H, Nakada K, Kanazaki S, Souda E, Shigehara T., 2008 - Development of molecular diagnostics of the two point mutations in acetylcholinesterase gene associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, (Homoptera: Aphididae) and a survey of genotypic frequency in field populations. *Applied Entomology and Zoology*, 43: 127-133

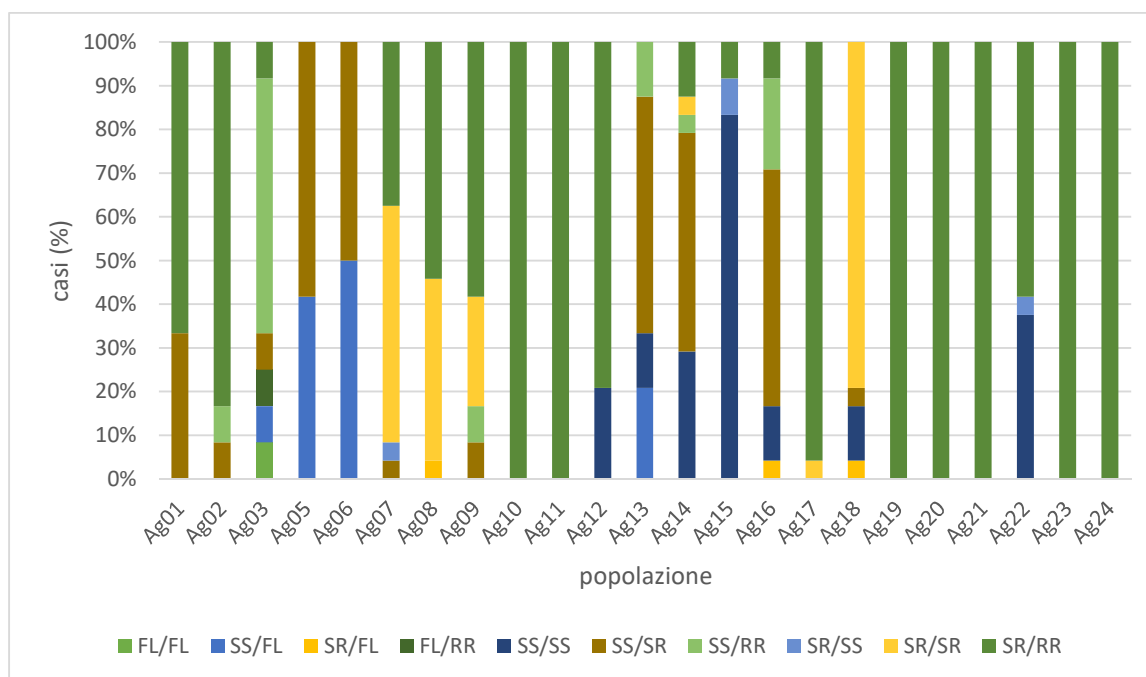


Figura 4. Distribuzione delle combinazioni genotipiche legate alla resistenza ai piretroidi (M918L) e ai dimetilcarbammati (S431F) nelle popolazioni indagate (Le etichette indicano il genotipo delle mutazioni in questo ordine M918L / S431F. FL: amplificazione negativa; SS: genotipo omozigote sensibile; RR: genotipo omozigote resistente; SR genotipo eterozigote).

Verifica dei protocolli di analisi biochimica dell'attività esterasica

Il protocollo di analisi biochimica dell'attività esterasica è stato verificato su un numero complessivo di 384 esemplari. I protocolli sono stati adattati per consentire, partendo dallo stesso omogenato (1 esemplare in 110 uL di tampone fosfato) di misurare l'attività esterasica totale, il contenuto proteico e di estrarre il DNA permettendo così di raccogliere informazioni multiple dallo stesso individuo. Le statistiche descrittive delle medie (esprese in OD/min/mg proteine) misurare su 16 delle popolazioni sono riportate nella tabella seguente (Tabella 17) e raffigurate nel grafico (Figura 5).

Tabella 17. Attività esterasiche misurate in 16 popolazioni di *A. gossypii*.

popolazione	N	media	es	Minimo	Massimo
7	33	15.78	1.12	4.57	27.58
8	33	20.45	1.56	4.68	37.57
10	32	22.50	2.16	7.03	50.34
12	33	24.70	1.55	7.17	37.21
13	15	11.54	1.65	4.00	26.11
14	27	21.51	3.39	0.87	77.49
15	9	8.32	2.30	1.01	20.63
16	30	37.39	3.57	4.72	75.86
17	22	29.57	1.94	20.57	51.30
18	22	9.95	0.93	6.20	26.84
19	20	28.70	1.70	16.24	46.19
20	21	32.46	3.18	22.62	92.64
21	22	30.41	1.54	22.64	57.52
22	22	23.34	1.62	12.45	40.95
23	22	24.26	1.90	16.89	60.23
24	21	29.98	3.28	17.00	72.16
Totale	384	23.83	0.68	0.87	92.64

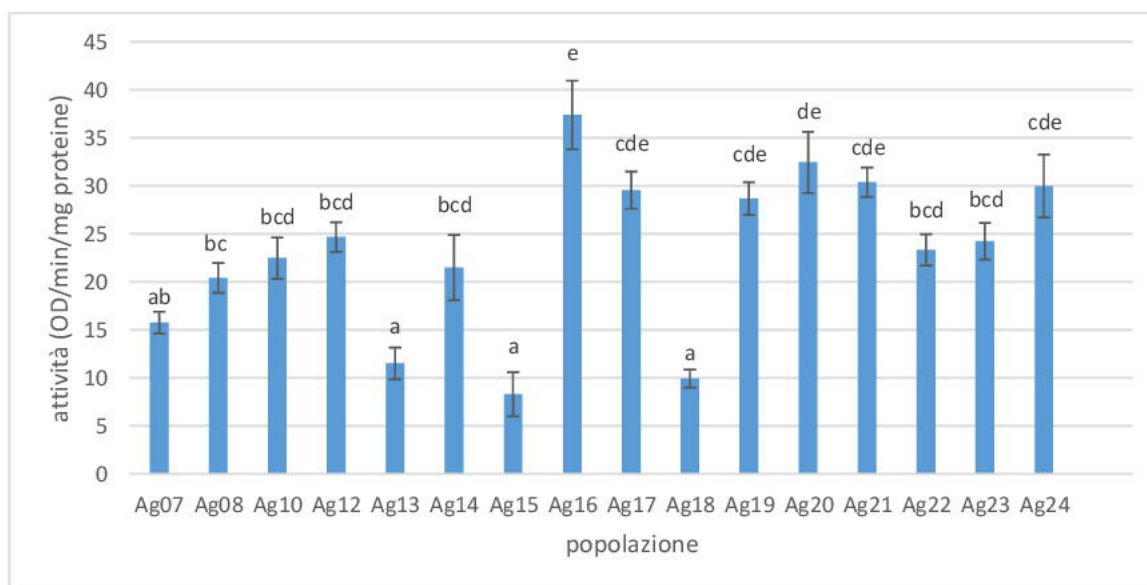


Figura 5. Attività esterasiche medie misurate nelle popolazioni di *Aphis gossypii*. Le medie con lo stesso insieme di lettere non differiscono significativamente (Test SNK; livello 5%)

CONCLUSIONI

La tecnica diagnostica sviluppata si è dimostrata in grado di individuare a costi estremamente contenuti e in tempi rapidi le principali mutazioni legate a importanti meccanismi di resistenza. E' inoltre possibile analizzare l'attività esterasica e successivamente effettuare con successo l'estrazione del DNA dal materiale rimanente.

2.3 TETRANYCHUS URTICAE: INNOVAZIONE DELLE TECNICHE DI DETERMINAZIONE DEI MECCANISMI DI RESISTENZA

Uar: UCSC

UNIMORE

OBIETTIVI

Le infestazioni del ragnetto rosso bimaculato (*Tetranychus urticae*) determinano in genere gravi problematiche a numerose colture di grande importanza economica e, in Emilia Romagna, la sua dannosità è soprattutto temuta per il pomodoro in pieno campo. Questa specie è anche particolarmente nota per la sua capacità di sviluppare resistenze in tempi estremamente rapidi nei confronti di prodotti aventi differenti meccanismi d'azione. Nonostante l'importanza e il grave impatto economico non ci sono lavori che documentino l'attuale stato di resistenza ai prodotti fitosanitari per *T. urticae* sul territorio italiano soprattutto considerando la tipologia di forme di resistenza presenti sia metaboliche che "target-site". L'elevato numero di richieste di deroghe ai disciplinari di protezione integrata evidenzia il livello di interesse e la difficoltà per il contenimento di questa specie. Il progetto vuole adattare nuove metodologie diagnostiche sviluppate per altri organismi ma non ancora applicate all'individuazione delle resistenze in questa specie.

Le attività svolte su questo aspetto nell'intero progetto sono di seguito descritte.

MATERIALI E METODI

A partire dall'estate 2017 sono state raccolte varie popolazioni di *Tetranychus urticae*, prevalentemente in provincia di Piacenza e in gran parte da appezzamenti di pomodoro in pieno campo anche se non sono state trascurate altre colture.

In laboratorio gli acari sono stati sottoposti a biosaggio mediante un vial test derivato dalla metodica descritta da Wang et al (2015)²⁵. Basandosi su dati di letteratura, è sono state scelte alcune concentrazioni discriminanti sia per abamectina che per bifenazate, corrispondenti a una concentrazione efficace nei confronti degli esemplari sensibili (Figura 6).

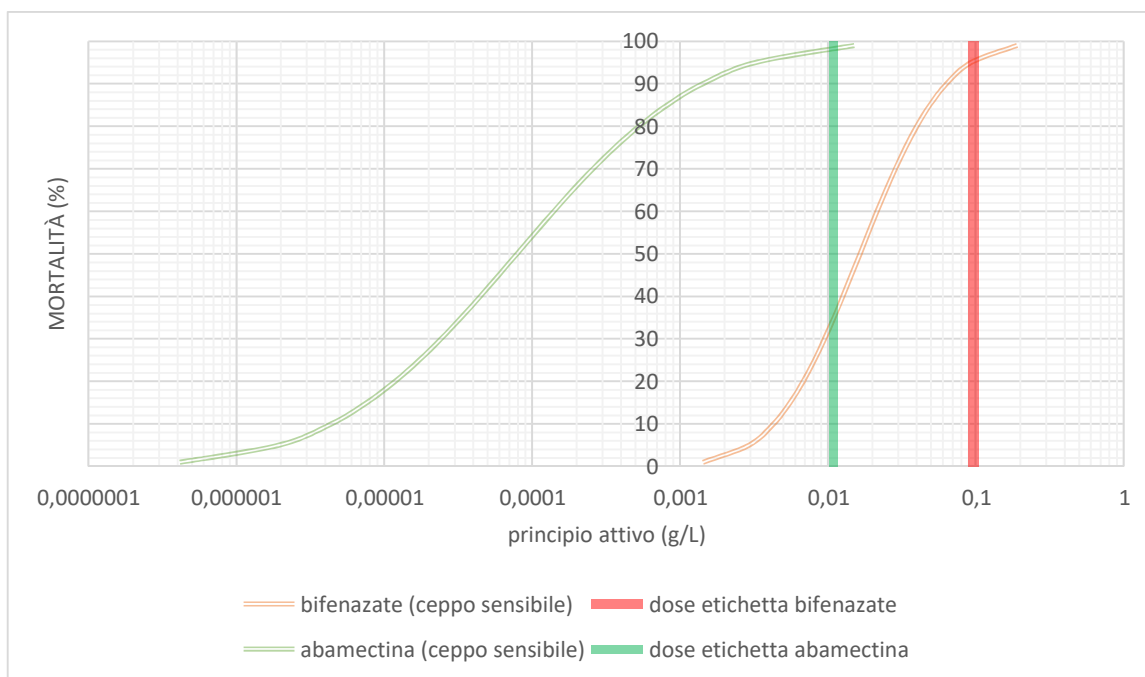


Figura 6. Baselines per abamectina e bifenazate derivate dalla metodica di Wang et al. (2015) applicata a una popolazione sensibile di *Tetranychus urticae*.

Le soluzioni, preparate fresche prima di ogni biosaggio sono state applicate a tubi "eppendorf" da 2 mL e sono stati trattati per immersione dischi di foglia del diametro di circa 10 mm. Dopo aver introdotto in ciascuna provetta il disco di foglia trattato con la concentrazione corrispondente di acaricida sono stati inseriti da 10 a 15 adulti. Dopo 24 ore è stata valutata la mortalità. I gruppi di controllo sono stati trattati solo con acqua. Nei test successivi al 2017, alla luce di una serie di criticità nell'uso dei dischi fogliari che causavano condensa all'interno del tubo eppendorf con il rischio di causare morte per affogamento degli acari trattati, i biosaggi sono stati eseguiti impiegando unicamente i tubi trattati, evitando di introdurre anche dischi di foglia.

Nel 2018 e soprattutto nel 2019 è stata anche valutata l'efficacia di alcune molecole con potenziale effetto sinergizzante.

RISULTATI

Complessivamente sono state raccolte 39 popolazioni e su 30 sono stati eseguiti biosaggi (Tabella 18). Esemplari di tutte le popolazioni sono stati anche trasferiti all'università di Reggio Emilia per le previste analisi molecolari.

I risultati di efficacia valutati con i biosaggi sono riportati nei grafici seguenti separati per anno e principio attivo. Nel 2017, sulla base dei dati di letteratura sono state utilizzate un paio di concentrazioni differenti sia per abamectina sia per bifenazate. Nel caso di abamectina le concentrazioni erano relativamente inferiori (rispettivamente 0.0018 g/L e 0.0036 g/L) rispetto alla concentrazione di etichetta (0.011 g/L). Nel caso del bifenazate si è applicata la concentrazione di etichetta (0.096 g/L) e un valore doppio (0.192 g/L). Avendo evidenziato una quasi generalizzata difficoltà ad ottenere un'efficacia del 100% con queste concentrazioni, a partire dal 2018, tutti i test sono stati effettuati a dose di etichetta al fine di avere un'indicazione più applicativa dell'effettiva sensibilità delle popolazioni. Inoltre è stata anche introdotta una

²⁵ WANG L, ZHANG Y, XIE W, WU Q, WANG S, 2015 - A bioassay for evaluation of the resistance of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) to selected acaricides. Systematic & Applied Acarology 20(6): 579-590.

valutazione a 48 ore dall'applicazione del trattamento per misurare gli effetti a più lungo termine dei prodotti impiegati.

Tabella 18. Elenco delle popolazioni di *Tetranychus urticae* raccolte nel corso del progetto

popolazione	data raccolta	località	Ospite	biosaggio
TU17-03	20/07/2017	Cesena	Cetriolo	Si
TU17-04	24/07/2017	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU17-05	24/07/2017	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU17-06	24/07/2017	Niviano (PC)	Pomodoro	Si
TU17-07	05/09/2017	Banco / Gossolengo (PC)	Pomodoro	Si
TU17-08	05/09/2017	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU18-01	24/07/2018	Settima (PC)	Pomodoro	Si
TU18-02	31/07/2018	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU18-03	31/07/2018	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU18-04	01/08/2018	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU18-05	01/08/2018	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU18-06	28/08/2018	Gossolengo (PC)	Pomodoro	Si
TU18-07	28/08/2018	Ottavello (PC)	Pomodoro	Si
TU18-08	04/09/2018	Baselica di Gossolengo (PC)	Pomodoro	Si
TU18-09	04/09/2018	Murafiori/Roveleto Landi (PC)	Pomodoro	Si
TU18-10	05/09/2018	San Lazzaro (PC)	Pomodoro	Si
TU18-11	05/09/2018	Gariga di Podenzano (PC)	Pomodoro	Si
TU18-12	05/09/2018	San Bonico (PC)	Pomodoro	Si
TU18-13	10/09/2018	Caorso (PC)	Pomodoro	No
TU18-14	19/09/2018	Caorso (PC)	Pomodoro	Si
TU19_01	19/06/2019	Baselica di Gossolengo (PC)	Pomodoro	No
TU19_02	19/06/2019	Barbieri (PC)	Pomodoro	no
TU19_03	19/06/2019	Cattivelli (PC)	Pomodoro	no
TU19_04	01/07/2019	Baselica di Gossolengo (PC)	Pomodoro	si
TU19_05	01/07/2019	Baselica di Gossolengo (PC)	Pomodoro	si
TU19_06	01/07/2019	Baselica di Gossolengo (PC)	Pomodoro	si
TU19_07	18/07/2019	I Vaccari (PC)	Pomodoro	si
TU19_08	22/07/2019	San Bonico (PC)	Pomodoro	si
TU19_09	23/07/2019	Ottavello (PC)	Pomodoro	si
TU19_10	24/07/2019	Castellaro (PC)	Pomodoro	si
TU19_11	29/07/2019	Baselica di Gossolengo (PC)	Pomodoro	si
TU19_12	05/08/2019	Quarto (PC)	Pomodoro	si
TU19_13	05/08/2019	Baselica di Gossolengo (PC)	Pomodoro	si
TU19_14	07/08/2019	Caorso (PC)	Pomodoro	si
TU19_15	01/08/2019	Ottavello (PC)	Pomodoro	no
TU19_16	01/08/2019	Caratta (PC)	Pomodoro	no
TU19_17	01/08/2019	Pieve Dugliara (PC)	Pomodoro	no
TU19_18	01/08/2019	Campremoldo sotto (PC)	Pomodoro	no
TU19_19	01/08/2019	Campremoldo - Centora (PC)	Pomodoro	no

Le percentuali di efficacia (calcolate con la formula di Abbot) dei due acaricidi indagati, relativi alle popolazioni raccolte nel 2017, sono riportati nella figura seguente (Figura 7). L'efficacia dell'abamectina si è dimostrata totale solo nei confronti della popolazione TU17-03. Al contrario l'efficacia di bifenazate applicato a dose di etichetta è risultata inferiore al 20%. Su tutte le altre popolazioni, raccolte da pomodoro in provincia di Piacenza, è stata valutata l'efficacia di due differenti dosaggi per i due acaricidi. Nessuno dei prodotti/dosi ha ottenuto un'efficacia totale. L'efficacia ottenuta per abamectina alla dose inferiore va da poco più del 3% al 42%. La dose maggiore ha ottenuto un'efficacia tra il circa il 21 e il 78 %. Nel caso del bifenazate i valori di efficacia sono compresi tra circa il 12% e il 73% per la dose di 96 ug/mL. L'efficacia della dose doppia è compresa all'incirca tra il 55% e il 96% (Figura 7).

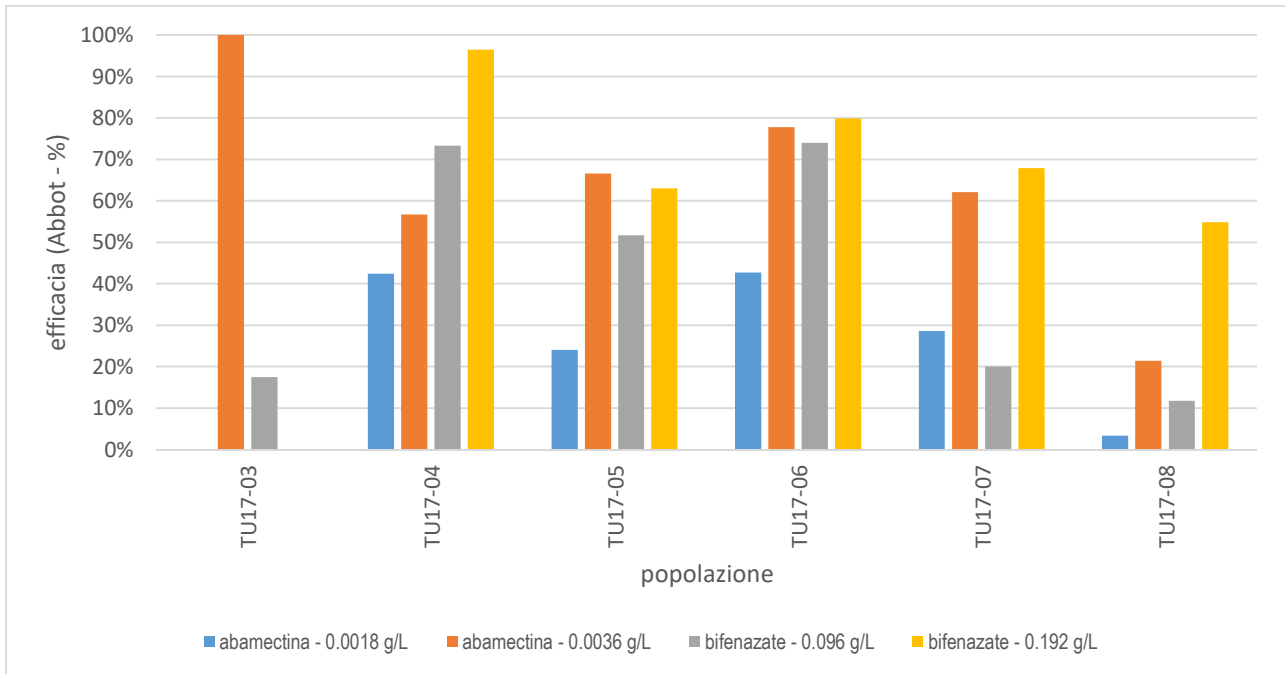


Figura 7. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti nei biosaggi effettuati nel 2017 (Popolazioni come da Tabella 18).

Nel 2018 i biosaggi effettuati su 11 popolazioni evidenziano una certa variabilità di risposta nei confronti di entrambi i principi attivi. Per 5 popolazioni su 11 abamectina ha avuto un'efficacia molto elevata ma di contro, verso le 6 popolazioni rimanenti, il principio attivo si è dimostrato scarsamente efficace fino al caso estremo della popolazione TU18-07 in cui l'efficacia del prodotto, applicato alla dose di etichetta, è stata nulla. Nei test con le popolazioni da TU18-06 a TU18-14 è stata introdotta anche una miscela estemporanea con una formulazione sperimentale di piperonilbutossido (PBO) applicando il prodotto a 1 g/L. Nei confronti delle popolazioni TU18-06 – TU18-07 si è osservato un importante sinergismo (da 6 a 16 volte circa) con una mortalità causata dal prodotto, quando applicato da solo, relativamente contenute (tra il 13% e il 23%). Nelle altre popolazioni invece il PBO ha mostrato una maggior tossicità intrinseca alla dose di applicazione. Nonostante ciò rimane evidente un incremento di mortalità causato dalla miscela (Figura 8). Nelle valutazioni a 48 ore si è in genere osservato solo una relativamente limitata crescita dell'efficacia (Figura 9).

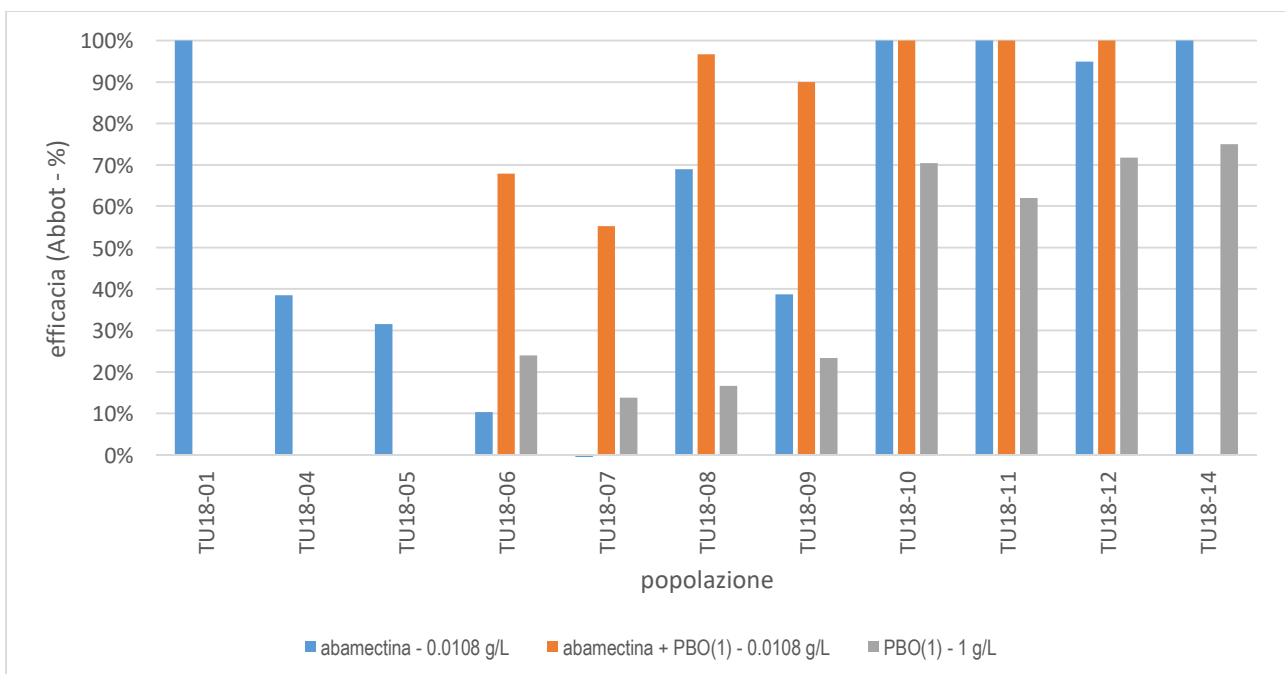


Figura 8. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 24 ore dal trattamento con abamectina o abamectina e PBO nei biosaggi effettuati nel 2018 (Popolazioni come da Tabella 18).

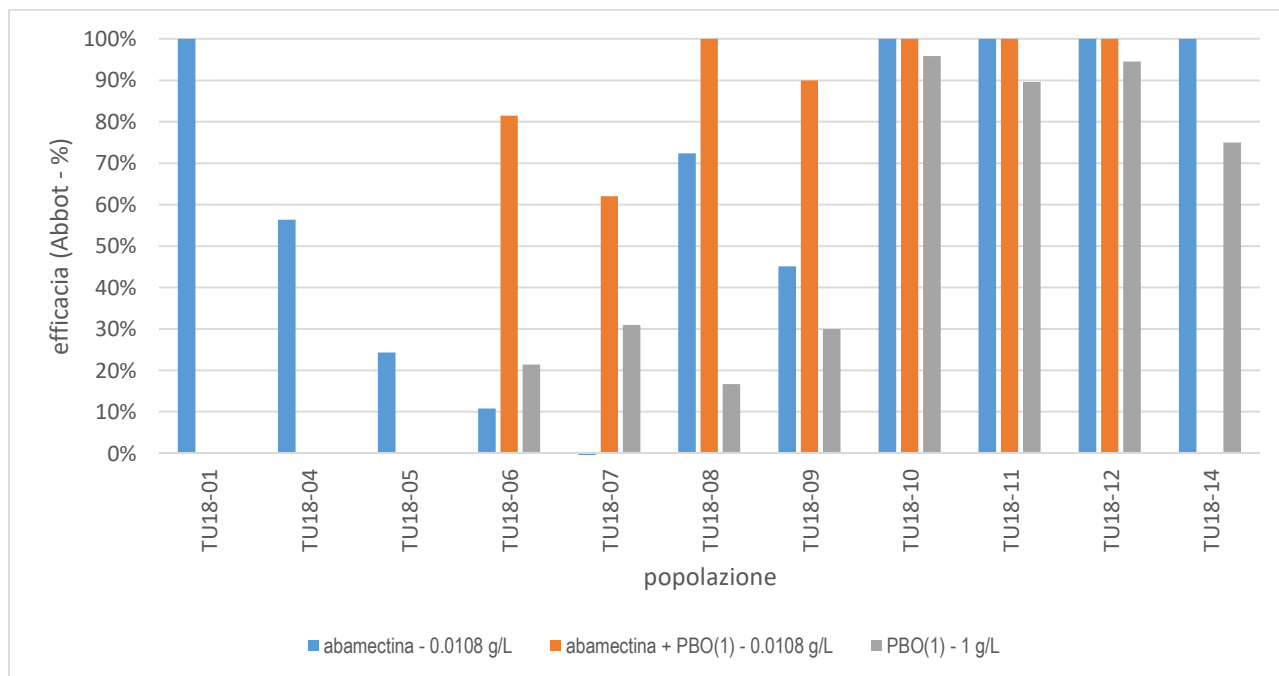


Figura 9. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 48 ore dal trattamento con abamectina o abamectina e PBO nei biosaggi effettuati nel 2018 (Popolazioni come da Tabella 18).

Il bifenazate ha invece mostrato una generalizzata minor efficacia con la sola eccezione data dalla popolazione TU18-14 raccolta in un areale lontano vari km dalla zona della provincia di Piacenza ove negli ultimi anni si è sono avute le maggiori criticità per la presenza ed aggressività di *Tetranychus urticae*. In tutti i casi in cui si è aggiunto alla miscela acaricida anche il PBO si è osservato un importante incremento di mortalità (Figura 10). Come per abamectina, anche con bifenazate il controllo a 48 ore dal trattamento ha evidenziato lievi incrementi di efficacia senza tuttavia ottenere in genere una mortalità completa degli esemplari trattati (Figura 11; Tabella 19).

Tabella 19. 2018. Valori percentuali di efficacia misurati e incrementi tra 24 e 48 ore dal trattamento.

popolazione	abamectina			abamectina/PBO			bifenazate			bifenazate/PBO			PBO		
	24	48	diff.	24	48	diff.	24	48	diff.	24	48	diff.	24	48	diff.
TU18-01	100.0	100.0	0.0				16.2	39.4	23.2						
TU18-02							17.5	24.0	6.5						
TU18-03							28.3	26.9	-1.5						
TU18-04	38.5	56.4	17.9												
TU18-05	31.6	24.4	-7.2												
TU18-06	10.3	10.8	0.5	67.9	81.5	13.7	10.0	24.1	14.1	70.0	100.0	30.0	24.0	21.4	-2.6
TU18-07	-3.4	-3.4	0.0	55.2	62.1	6.9	19.9	19.9	0.0	82.8	89.7	6.9	13.8	31.0	17.2
TU18-08	69.0	72.4	3.4	96.7	100.0	3.3	3.3	23.3	20.0	66.7	86.7	20.0	16.7	16.7	0.0
TU18-09	38.7	45.2	6.5	90.0	90.0	0.0	3.4	17.2	13.8	93.1	96.6	3.4	23.3	30.0	6.7
TU18-10	100.0	100.0	0.0	100.0	100.0	0.0	27.3	35.7	8.4	74.1	75.2	1.0	70.4	95.9	25.4
TU18-11	100.0	100.0	0.0	100.0	100.0	0.0	8.7	32.5	23.8	96.4	100.0	3.6	62.0	89.6	27.6
TU18-12	94.9	100.0	5.1	100.0	100.0	0.0	38.9	82.5	43.6	100.0	100.0	0.0	71.8	94.6	22.8
TU18-14	100.0	100.0	0.0				100.0	100.0	0.0				75.0	75.0	0.0

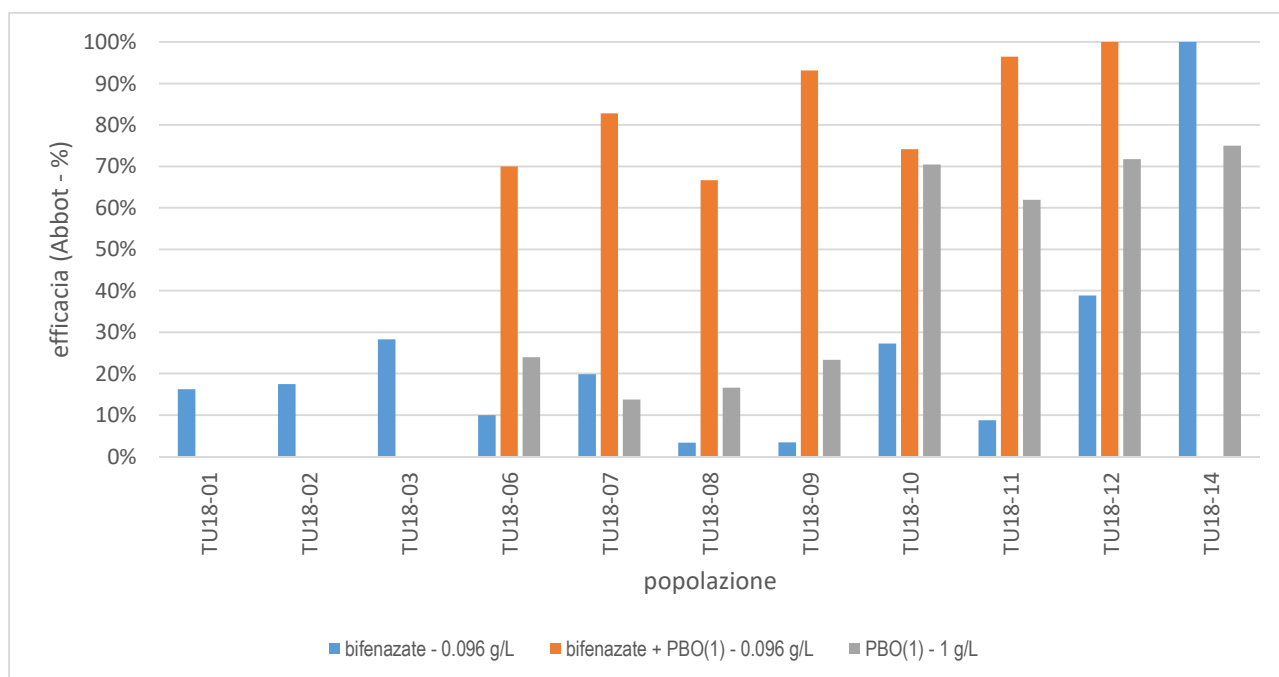


Figura 10. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 24 ore dal trattamento con bifentazate o bifentazate e PBO nei biosaggi effettuati nel 2018 (Popolazioni come da Tabella 18).

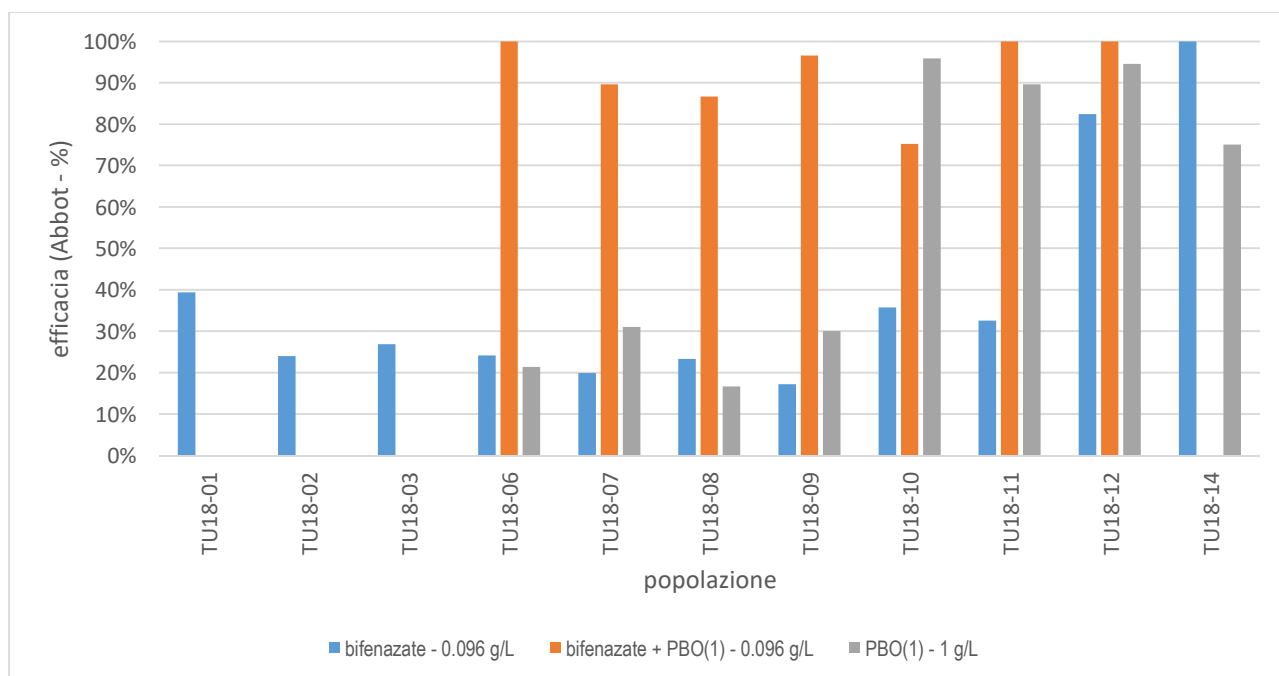


Figura 11. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 48 ore dal trattamento con bifentazate o bifentazate e PBO nei biosaggi effettuati nel 2018 (Popolazioni come da Tabella 18).

Nel 2019 i biosaggi sono stati effettuati su 8 popolazioni fino alla prima decade di agosto. I pesanti eventi meteorologici che si sono verificati nel pieno dell'estate 2019 in provincia di Piacenza hanno seriamente compromesso le popolazioni di campo di *Tetranychus urticae* rendendo non produttivi i campionamenti successivi. Nelle prove si è inoltre ridotta la concentrazione del sinergico, portato a 0.1 g/L, rispetto all'anno precedente (1 g/L), per evitare l'eccessiva mortalità che era stata riscontrata con alcune popolazioni. In generale l'efficacia dell'abamectina si è dimostrata piuttosto ridotta nei confronti della quasi totalità delle popolazioni, con la sola eccezione della popolazione TU19-14, raccolta nei dintorni di Caorso (PC), in un'areale relativamente distante dalla zona in cui negli anni precedenti si erano verificati i maggiori attacchi di *Tetranychus urticae* al pomodoro da industria (Figura 12). L'applicazione del PBO concentrazione

inferiore, con l'eccezione delle popolazioni TU19-04 e TU19-07 non ha prodotto importanti effetti sinergici. Un certo incremento di mortalità è stato in genere osservato a 48 ore dall'applicazione (Tabella 20; Figura 15).

Sempre nel corso del 2019 contro alcune popolazioni è stata valutata anche l'efficacia di una serie di molecole a potenziale effetto sinergizzante come pure si è indagato sugli effetti di un possibile incremento della concertazione di utilizza del PBO portandola a 0.5 g/L (Figura 16). La dose più elevata del PBO ha mostrato una certa efficacia acaricida. In termini assoluti l'efficacia maggiore è stata osservata nei trattamenti con sali di acidi grassi a 1 g/L (Figura 16).

Tabella 20. 2019. Valori percentuali di efficacia misurati e incrementi tra 24 e 48 ore dal trattamento.

popolazione	abamectina			abamectina + PBO			bifenazate			bifenazate+PBO			PBO		
	24	48	diff.	24	48	diff.	24	48	diff.	24	48	diff.	24	48	diff.
TU19-04	21.3	100.0	78.8	100.0	100.0	0.0	24.3	1.0	-23.3	91.3	1.0	-90.3	33.8	1.0	-32.8
TU19-07	19.2	61.7	42.5	60.7	82.1	21.4	22.6	60.7	38.1	56.7	100.0	43.3	0.0	87.1	87.1
TU19-08	48.1	52.9	4.7	28.1	71.9	43.8	19.4	50.3	30.9	10.7	23.3	12.6	3.4	20.0	16.6
TU19-09	20.7	18.8	-1.9	18.2	22.4	4.2	16.7	35.7	19.0	26.7	83.5	56.8	3.4	46.4	43.0
TU19-10	17.9	16.7	-1.2	15.8	23.4	7.6	39.3	63.0	23.7	35.7	96.3	60.6	0.0	0.0	0.0
TU19-11	33.3	11.1	-22.	11.1	66.7	55.6	11.1	66.7	55.6	33.3	88.9	55.6	-11.1	58.3	69.4
TU19-12	0.0	30.0	30.0	30.0	33.3	3.3	30.0	54.5	24.5	36.4	90.0	53.6	0.0	77.8	77.8
TU19-13							0.0	1.8	1.8				0.0	100.0	100.0
TU19-14	96.7	100.0	3.3	100.0	91.9	-8.1	34.4	87.1	52.6				-3.6	100.0	103.6

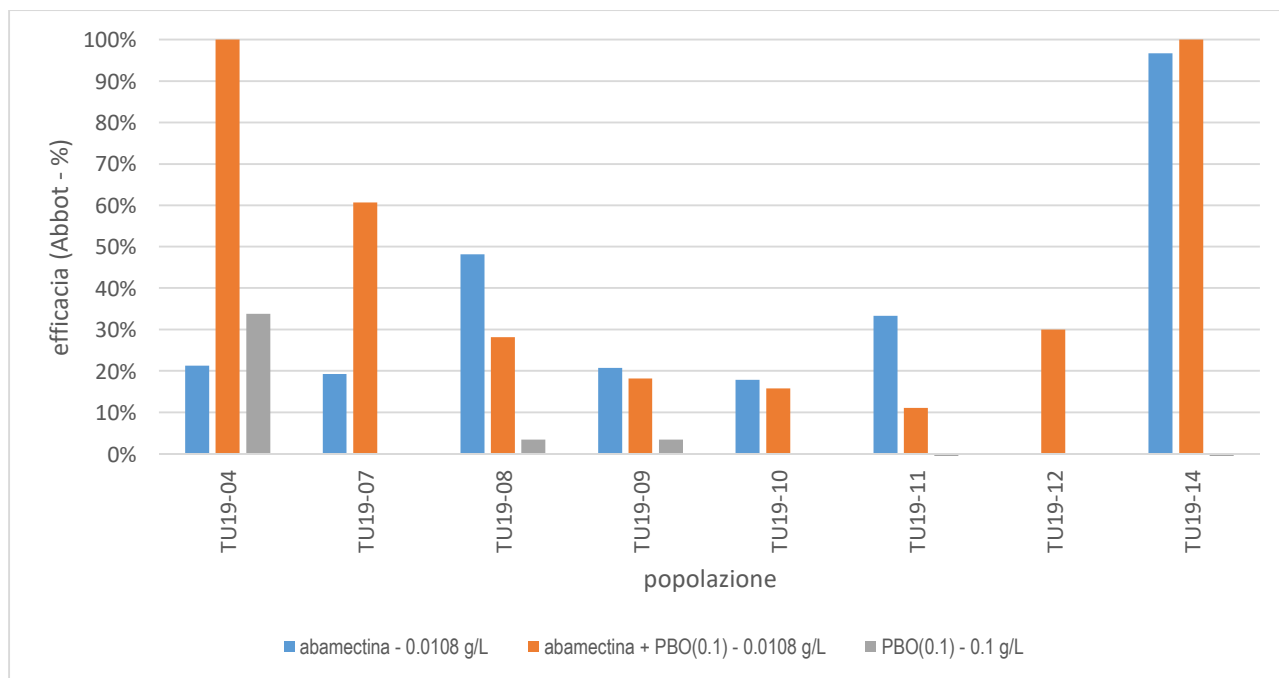


Figura 12. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 24 ore dal trattamento con abamectina o abamectina e PBO nei biosaggi effettuati nel 2019 (Popolazioni come da Tabella 18).

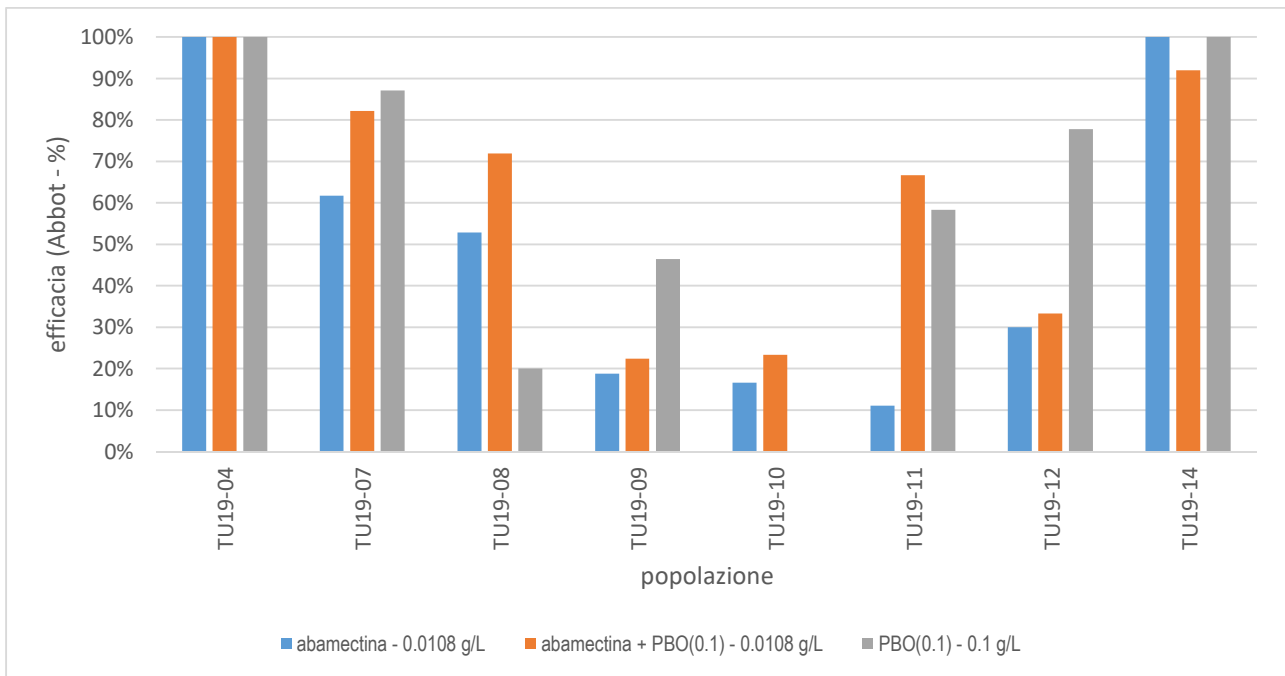


Figura 13. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 48 ore dal trattamento con abamectina o abamectina e PBO nei biosaggi effettuati nel 2019 (Popolazioni come da Tabella 18).

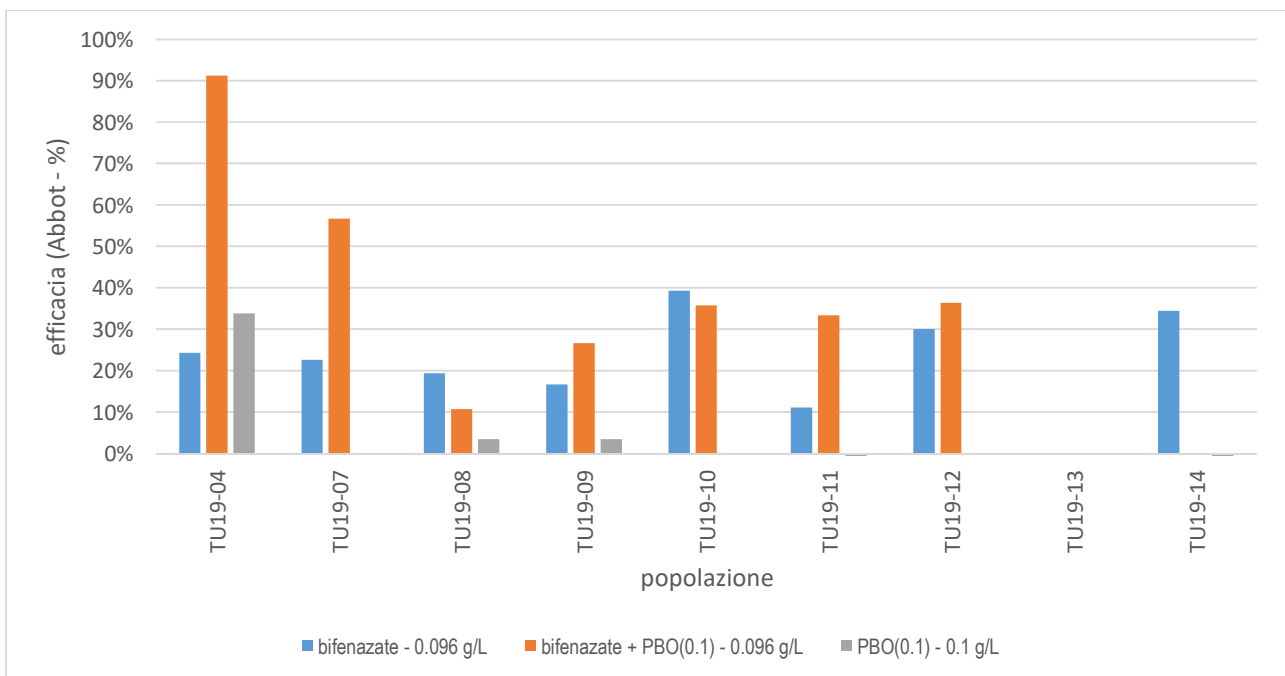


Figura 14. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 24 ore dal trattamento con bifentazate o bifentazate e PBO nei biosaggi effettuati nel 2019 (Popolazioni come da Tabella 18).

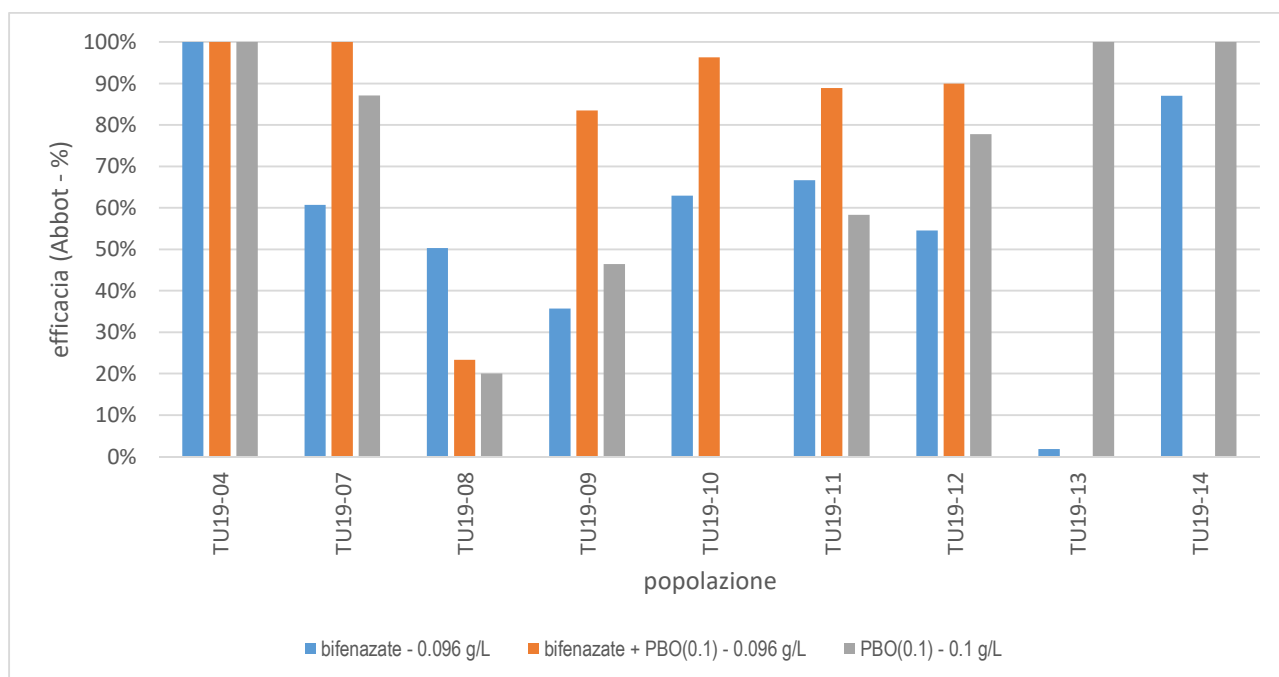


Figura 15. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 48 ore dal trattamento con bifenazate o bifenazate e PBO nei biosaggi effettuati nel 2019 (Popolazioni come da Tabella 18).

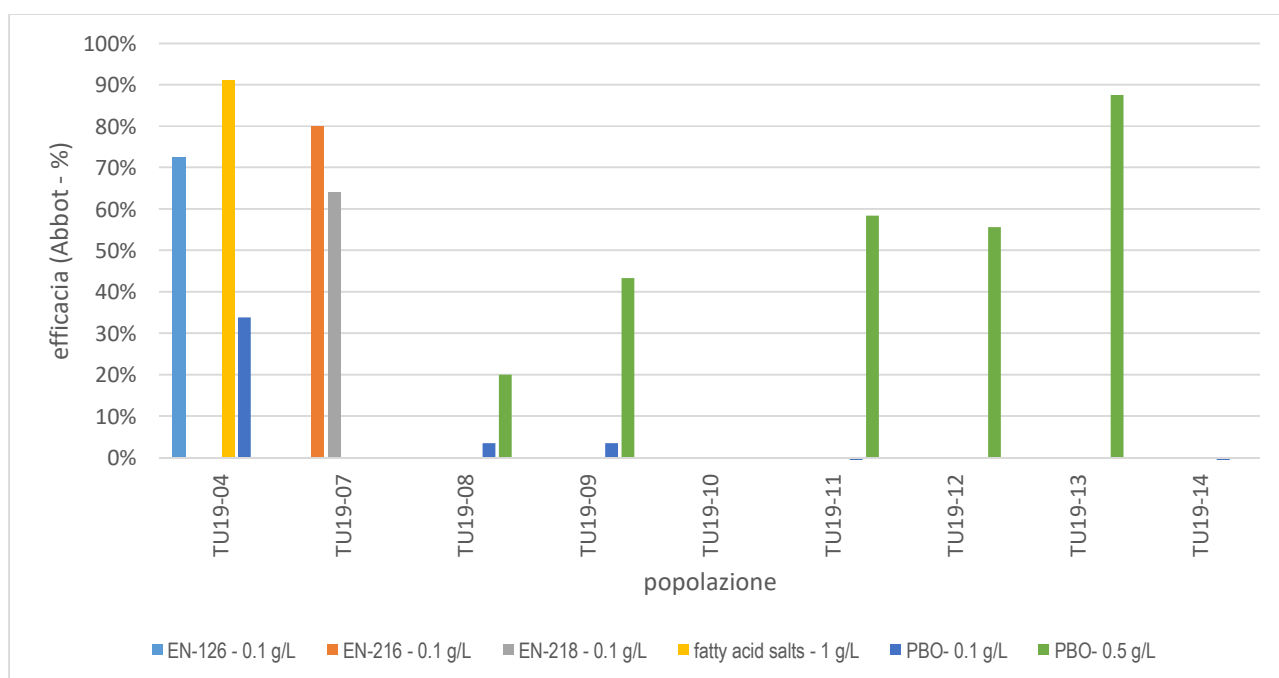


Figura 16. Valori di efficacia (%; Abbott) ottenuti a 24 ore dal trattamento, nell'estate del 2019, con varie molecole sperimentali con potenziale effetto sinergizzante (Popolazioni come da Tabella 18).

CONCLUSIONI

I risultati dei biosaggi impiegando due prodotti adulticidi dimostrano una certa variabilità di risposta tra le popolazioni di *Tetranychus urticae* indagate. In generale però in molti casi si è osservata una significativa riduzione dell'efficacia verso abamectina e bifenazate nelle popolazioni raccolte nella zona della provincia di Piacenza ove negli ultimi anni si sono avute le maggiori difficoltà di lotta contro il regnetto rosso. La situazione peggiore sembra però essere concentrata nell'area nei dintorni di Ottavello. E' invece positivo notare che esternamente all'area critica, prelevando da appezzamenti normalmente non trattati con acaricidi le popolazioni mantengono un buon livello di sensibilità. Infine il positivo effetto sinergizzante

ottenuto con il PBO suggerisce che i fenomeni di resistenza riscontrati siano dovuti soprattutto a forme di resistenza metabolica.

A integrazione di quanto sopra descritto, sono state svolte **ANALISI MOLECOLARI PER LA RICERCA MUTAZIONI RESPONSABILI DELLA RESISTENZA 'TARGET SITE', CONDOTTE SU POPOLAZIONI DI *T. urticae*** a cura di UniMORE

OBIETTIVI

Ricerca delle mutazioni nei geni che codificano per le proteine bersaglio dei principi attivi utilizzati nel biosaggio, precedentemente riportate in letteratura e associate alla resistenza ad abamectina e bifenazate. Allo scopo sono stati amplificati e sequenziati tratti del gene che codificano per due subunità GluCl1 e GluCl3, del canale ionico GABA (resistenza alla abamectina), e del Citocromo b (resistenza al bifenazate), potenzialmente portatrici delle mutazioni già descritte.

MATERIALI E METODI

Il DNA è stato estratto da *T. urticae* utilizzando un protocollo d'estrazione messo a punto dalla unità UCSC. In breve: in singolo individuo è stato manualmente omogenizzato 200 µL di tampone TNES (400 mM NaCl, 0.5% SDS, EDTA 20 mM, pH 7.5) utilizzando un micro omogenizzatore (Micro Tissue Grinder, Wheaton, USA). Dopo l'aggiunta di 2 µL di proteinasi K (10 mg/mL), l'omogenato è stato incubato a 55°C per 1 h; le proteine sono state precipitate utilizzando 75 µL di NaCl 5M e centrifugando a 14000 rpm per 5 min a +4°C; al surnatante sono stati successivamente addizionati 350 µL di etanolo 100%, per poi procedere ad una incubazione *overnight* a -20°C per consentire la precipitazione del DNA; il pellet di quest'ultimo è stato recuperato tramite centrifugazione (14000 rpm per 5 min a +4°C), sottoposto a due lavaggi con etanolo 70% v/v e risospeso in 20 14000 rpm per 5' µL di acqua sterile. Per ogni popolazione il DNA è stato estratto con successo da 6-10 individui. Due microlitri di estratto di DNA sono stati amplificati tramite il kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), utilizzando coppie di primers target specifici (1 µL di ciascun primer 10 µM in 20 µL di reazione d'amplificazione):

Resistenza	Gene target	Seq. Primers (5' → 3')	Mutazione	Rif.
abamectina	GABA recettore 1	GluCl1_F1: TTGGATTGACCCTAACTCAGCA GluCl1_R1: TTGCACCAACAATTCCTTGA	G314D	1
abamectina	GABA recettore 3	GluCl3_F1: CCGGGTCAGTCTTGGTGTTA GluCl3_R1: CACCACCAAGAACCTGTTGA	G326E	1
bifenazate	Citocromo Cytb	Cytb_F1: CGGAATAATTTACAAATAACTCATGC Cytb_R1: TGGTACAGATCGTAGAATTGCC	G126S I136T S141F D161G P262T	2

¹ Dermauw et al., 2012. The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 42(7):455-65.

² Khajehali et al., 2011. Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Manag Sci.* 67(11):1424-33.

Il profilo termico di amplificazione consisteva in: 94°C x 2 min 30 s; 35 cicli: (94°C x 30 s; 54°C(Cytb)/56°C (GABA) x 30 s; 72°C x 1 min); 72°C x 10 min. Il prodotto di amplificazione è stato controllato su gel di agarosio 1% TBE 10x, purificato col kit DNA clean & Concentrator-5 (Zymo Research) e inviato al servizio di sequenziamento (Bio-Fab Research, Roma).

RISULTATI

Sono state analizzate 5 popolazioni di *T. urticae* sottoposte a biosaggio nel corso dell'annualità 2017 (Fig. 1), denominate Neri, Maraudi, Repetti, Repetti (Mangialupo) e Rebecchi e 12 popolazioni raccolte sul territorio piacentino nel 2019 (siglate come TU 1-12). L'esito del sequenziamento è stato negativo per la ricerca delle mutazioni riportate in letteratura.

La resistenza di tipo bersaglio specifico, almeno per le mutazioni riportate in letteratura, non sembra essere un meccanismo comune nelle popolazioni di *T. urticae* esaminate nel corso delle ultime due annualità di progetto.

CONCLUSIONI DEL TRIENNIO PER LA PROVA

Il mancato riscontro di resistenza bersaglio specifico, potrebbe essere compatibile con l'osservazione di letteratura che riporta per le popolazioni portatrici delle mutazioni *target site* ricercate, fattori di resistenze molto elevati rispetto a quanto osservato al biosaggio. Non è da escludere a priori che tali mutazioni siano presenti nelle popolazioni esaminate ma non ancora fissate e quindi a una frequenza troppo bassa per essere individuate con l'ampiezza del campionamento adottato e permessa dalle risorse di progetto disponibili. In alternativa, altre mutazioni non ancora descritte in letteratura potrebbero essere responsabili della diminuzione della suscettibilità ai principi attivi testati. La ricerca *in cieco* di potenziali nuove mutazioni, per il recettore del GABA, sarebbe attualmente proibitiva nelle popolazioni di campo, per via dell'elevato numero di sub-unità che compongono il canale ionico e la loro probabile ridotta frequenza. Tale strategia richiederebbe la preselezione in laboratorio di una popolazione resistente, con costi non compatibili con le finalità del progetto.

2.4 DROSOPHILA SUZUKII: INNOVAZIONE PROTOCOLLI DIAGNOSTICI RESISTENZA AI PRODOTTI FITOSANITARI

Questa attività è sviluppata attraverso tre Fasi che si sviluppano sull'intero triennio:

- 1) Analisi del rischio di sviluppo resistenza in *D. suzukii* allo spinosad tramite selezione di laboratorio.
- 2) Allestimento di un protocollo diagnostico della resistenza metabolica ai prodotti fitosanitari e della resistenza bersaglio specifico all'insetticida spinosad, basato sull'analisi di espressione dei geni coinvolti nei due meccanismi tramite "low density array".
- 3) Definizione degli attuali livelli di suscettibilità al cyantraniliprole in popolazioni emiliano-romagnole del fitofago tramite biosaggio.

Di seguito è descritto per ciascuna fase lo stato di avanzamento dei lavori in questo primo periodo rendicontativo (1/9/2017 – 30/9/2017).

Fase 2.4.1: Selezione *D. suzukii* per la resistenza allo spinosad

Uar: CRPV (Consulente Innovaricerche)

OBIETTIVI

Il presente lavoro ha l'obiettivo di approfondire le conoscenze in merito al fenomeno della comparsa di resistenza all'insetticida spinosad (formulato commerciale Laser®) in *Drosophila suzukii*.

A seguito dell'inquinamento dell'allevamento di *D. suzukii* con la specie simile *D. melanogaster*, il lavoro di selezione previsto è stato prima effettuato su questo organismo modello molto simile a *D. suzukii* e poi continuato con il fitofago prestabilito. Come confronto è stata utilizzata sia la popolazione di *Drosophila* di partenza (G0) che una continua e parallela selezionata con l'insetticida cyazypyr (formulato commerciale Exirel®). Quest'ultimo principio attivo è stato scelto perché da indagini di laboratorio precedenti aveva mostrato riduzioni di efficacia in due popolazioni saggiate.

Nella prima fase di selezione è stata utilizzata una popolazione iniziale di *Drosophila* (sia *melanogaster* che *suzukii*) denominata G0 la quale è stata sottoposta alla stima delle CL (Concentrazione Letale). La CL indica la concentrazione di Laser espressa in ppm (o di qualsiasi altro insetticida), necessaria per causare la morte di una determinata percentuale di individui di una popolazione (spesso si utilizza quella che è letale per il 50 % degli individui). Il calcolo della CL è stato effettuato tramite biosaggio di laboratorio che prevedeva l'esposizione per contatto e feeding degli adulti di *Drosophila* a sei concentrazioni seriali di Laser (200 – 100 – 50 – 25 – 10 – 1 ppm) in piastre da 24 pozzetti. Ogni pozzetto è stato dotato precedentemente di 0,70 ml di terreno costituito da 1% agar e 5% saccarosio. Il ruolo del terreno era di facilitare il nutrimento ed il contatto con l'insetticida da parte degli adulti. In ogni piastra sono stati inseriti circa 15 adulti per ciascun pozzetto, previa anestesia con CO₂.

I risultati di mortalità sono stati visualizzati dopo 48 ore dalla introduzione degli adulti, tramite conteggio degli individui totali e morti per ogni concentrazione. Sono stati considerati morti tutti gli individui incapaci di muoversi e non reattivi a sollecitazioni meccaniche. Oltre alle sei concentrazioni di insetticida, è stato utilizzato il solo etanolo come controllo. In quest'ultimo caso la mortalità non deve superare il 10%, in caso contrario il biosaggio deve essere ripetuto. Il calcolo della CL è stato ottenuto utilizzando il software PoloPlus.

Successivamente la popolazione G0 è stata sottoposta alla prima selezione utilizzando una concentrazione sub-letale (la CL₅₀ di Laser) precedentemente calcolata. I sopravvissuti alla concentrazione sub-letale sono stati allevati ed i nuovi adulti fuoriusciti hanno subito una nuova selezione sempre con la CL₅₀ ricalcolata sulla nuova popolazione. Ciò è proseguito fino alla sesta generazione (G6) per *D. melanogaster* e fino alla quarta generazione per *D. sukukii*. L'applicazione della concentrazione sub-letale per la selezione prevedeva l'utilizzo di 2 piastre Petri, con diametro di 6 cm. Analogamente alla procedura utilizzata per il calcolo della CL con le piastre da 24 pozzetti, ogni piastra è stata dotata di 9 ml di terreno costituito da 1% agar e 5% saccarosio su cui sono stati depositati 0,26 ml della concentrazione letale precedentemente calcolata in laboratorio.

RISULTATI

I dati ottenuti dalla selezione su *D. melanogaster* con concentrazioni sub-letali del principio attivo spinosad, non hanno rivelato significativi e sostanziali cali di attività del principio attivo stesso (Fig. 1) durante i sei cicli di selezione. L'andamento poco crescente delle diverse CL₅₀ nelle diverse generazioni, non dimostra un effettivo incremento di resistenza all'insetticida. I valori hanno subito infatti una lieve variazione partendo da un valore di 6 ppm fino a 21 ppm (grafico 1), ottenendo un fattore di resistenza (FR) di poco superiore a 3. La lettura di tali dati porta alla conclusione che le generazioni di *D. melanogaster* non hanno subito in sei cicli di selezione con concentrazioni sub-letali la selezione da parte di spinosad. Contrariamente ciò è avvenuto per cyazypyr (figura 2) dove il fattore di resistenza (FR) è risultato maggiore di 10.

Fig. 1: CL₅₀ espresse in ppm di Laser su adulti di *D. melanogaster* durante la selezione.

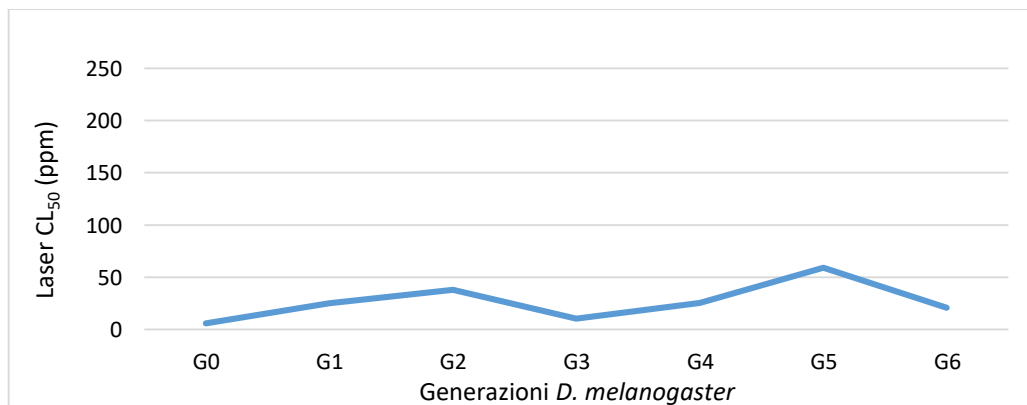
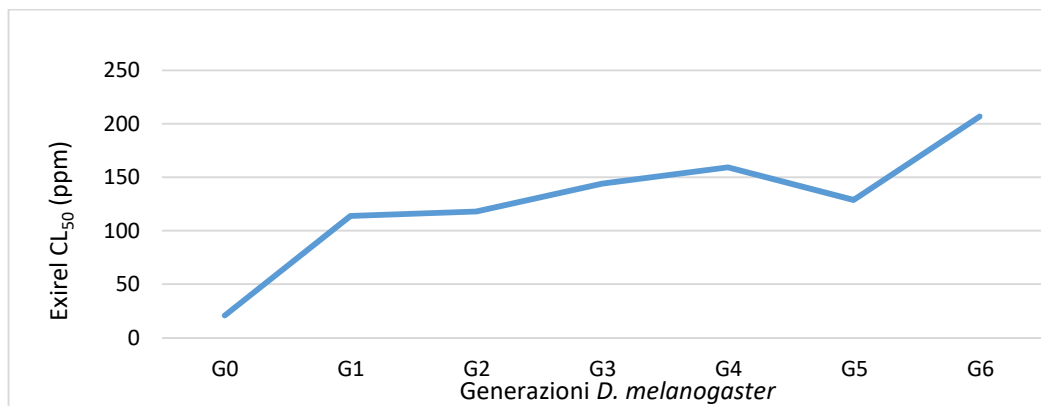


Fig. 2: CL₅₀ espresse in ppm di Exirel su adulti di *D. melanogaster* durante la selezione.



I dati ottenuti dalla selezione su *D. suzukii* con il principio attivo spinosad, allo stesso modo dei dati ottenuti sulla specie modello precedente, non mostrano significativi cali di attività del principio attivo stesso (figura 3) dopo i quattro cicli di selezione. L'andamento poco crescente delle diverse CL₅₀ nelle diverse generazioni, non mostra un effettivo incremento di resistenza all'insetticida. I valori hanno subito una blanda variazione lineare partendo da un valore di 10 ppm fino a 50 ppm (grafico 3), ottenendo un fattore di resistenza (FR) di 5. La lettura di tali dati porta alla probabile conclusione che le generazioni di *D. suzukii* non hanno subito in 4 cicli di selezione con concentrazioni sub-letali la selezione da parte di spinosad. Contrariamente come per *D. melanogaster* ciò è avvenuto per cyazypyr (grafico 4) dove il fattore di resistenza (FR) è stato pari a 14.

I dati ottenuti durante la selezione su *D. suzukii* con il principio attivo Exirel sono descritti come CL₅₀ espresse in ppm in figura 4.

Fig. 3: CL₅₀ espresse in ppm di Laser su adulti di *D. suzukii* durante la selezione

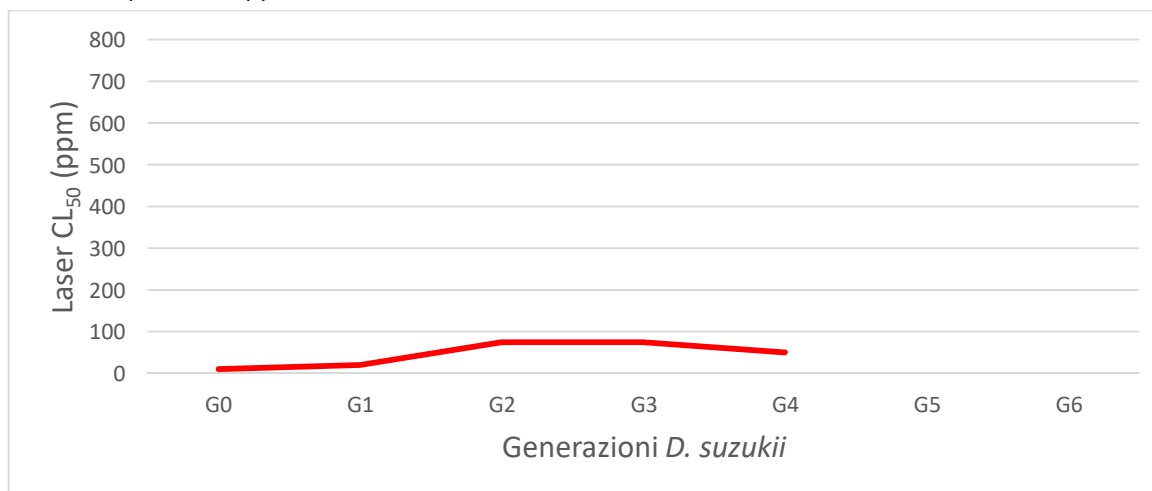
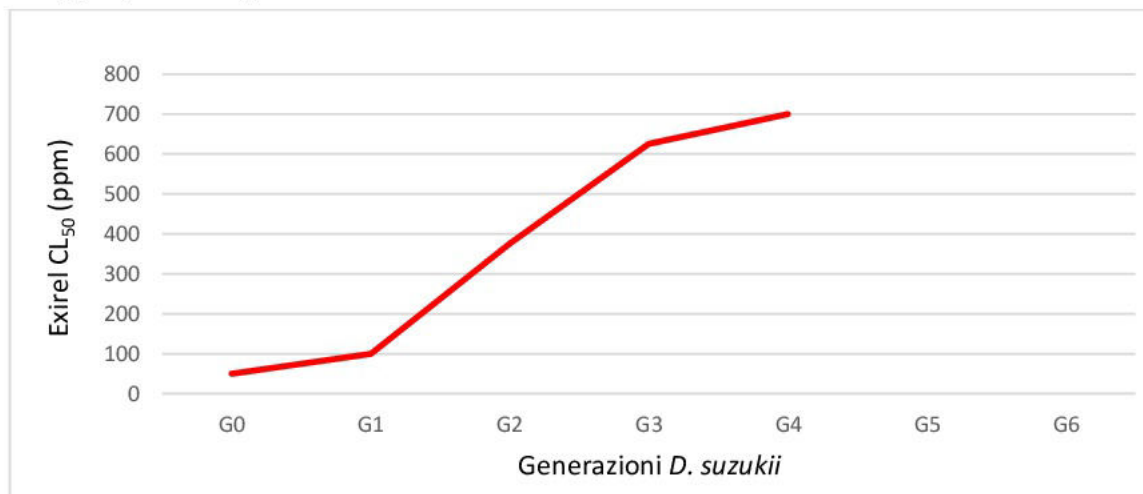


Fig. 4: CL₅₀ espresse in ppm di Exirel su adulti di *D. suzukii* durante la selezione.



CONCLUSIONI

Dall'indagine svolta si è cercato di analizzare i meccanismi iniziali che compaiono in una induzione di resistenza a spinosad sia nell'organismo modello *D. melanogaster* che sul fitofago *D. suzukii*. I dati preliminari mostrano come *D. suzukii* non è propensa a sostanziali diminuzioni di efficacia se sottoposta ad applicazioni continue del principio attivo spinosad contrariamente a quello che sembra avvenire per il principio attivo cyazypyr.

Fase 2.4.2: Allestimento di un protocollo diagnostico della resistenza metabolica agli agrofarmaci e bersaglio specifica per lo spinosad in *D. suzukii*.

Uar: UNIMORE

Questa fase si propone di allestire un protocollo diagnostico di tipo "low density array" adatto all'analisi di routine dell'espressione di un numero di geni candidati compreso fra 50-100, in parallelo al fine di contenere i costi d'analisi senza sacrificarne la sensibilità. La fase è articolata in tre prove che hanno una sequenzialità nel loro sviluppo:

- 2.4.2.1) individuazione dei geni candidati per la resistenza, prima annualità di progetto;
- 2.4.2.2) allestimento e validazione del protocollo di analisi d'espressione dei geni candidati in popolazioni suscettibili del fitofago, prima e seconda annualità di progetto;
- 2.4.2.3) applicazione del protocollo di analisi d'espressione dei geni candidati nella popolazione del fitofago selezionata per la resistenza al fitofago, terza annualità di progetto.

Per rendere più semplice la descrizione dell'attività svolta in questo periodo le prime 2 prove, dove la prima è propedeutica alla seconda, vengono descritte unitamente di seguito.

Prova 2.4.2.1 - Individuazione dei geni candidati per la resistenza metabolica agli insetticidi e bersaglio specifica allo spinosad nel fitofago.

e

Prova 2.4.2.2 - Ottimizzazione e validazione di un protocollo di misura del livello d'espressione dei geni candidati per la resistenza metabolica agli agrofarmaci e di tipo bersaglio specifica allo spinosad in una popolazione suscettibile.

OBIETTIVO

Obiettivo è l'analisi del genoma e trascrittoma di *D. suzukii* per l'individuazione *in-silico* dei geni candidati alla detossificazione degli agrofarmaci (resistenza metabolica) e in particolare a spinosad (resistenza bersaglio specifico). Validazione *in-vitro* dell'espressione dei geni candidati, in una popolazione di controllo suscettibile.

MATERIALI E METODI

L'identificazione *in-silico* dei geni potenzialmente coinvolti nella resistenza agli agrofarmaci è stata condotta interrogando due progetti genoma di *D. suzukii* disponibili in GenBank: da multiisolato (PRJNA213258, BGI BGI-Shenzhen, Cina) e monoisolato (PRJEB3367, CRI-FEM, Italia). Per la ricerca dei geni responsabili della detossificazione degli insetticidi sono stati utilizzati i termini d'annotazione genica *monossigenasi* (MFO), *carbossilesterasi* (EST) e *glutathione-S-transferasi* (GST). Per la ricerca dei geni responsabili della resistenza bersaglio specifica i termini d'annotazione genica *recettori colinergici nicotinici* (nAChr). Per eliminare dalla lista gli pseudo geni (geni non espressi) si è proceduto all'analisi dei trascrittomi disponibili in banca dati GenBank sia da multiisolati (PRJNA399652, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Cina) che monoisolati (PRJNA221549, UC Davis, USA). I dati relativi a geni iperespressi in popolazioni americane di *D. suzukii* con ridotta suscettibilità allo spinosad (PRJNA297377, Insect Science (2017) 00, 1-18) sono stati sfruttati per ridurre ulteriormente la lista dei geni candidati MFO, GST e EST potenzialmente coinvolti nel metabolismo del principio e per aggiungerne altri, appartenenti alle famiglie delle proteine cuticolari (Cpr), UDP-glucuronosil-transferasi (Ugt) e trasportatori di membrana (Mdr).

Si è proceduto al disegno di coppie primers per l'amplificazione specifica del RNA messaggero prodotto da ciascun gene (OligoIDT software). Dove è stato possibile, si è privilegiato la costruzione dei primers sulla giunzione esone-introne, per limitare la possibilità di contaminazione da parte di DNA genomico, aumentando l'affidabilità della successiva analisi d'espressione. L'RNA totale è stato estratto da un pool di esemplari della popolazione suscettibile (metodo Tri-reagent). Ogni coppia di primers è stata validata amplificando un tratto del trascritto per ogni gene candidato. L'identità di ogni amplificato è stata confermata per sequenziamento diretto (BMR genomics).

Le coppie di primers validate per ogni gene candidato sono state utilizzate per la messa a punto del metodo di analisi d'espressione genica tramite Real-Time qPCR (sistema ABI-7900HT, metodo Sybrgreen). Per l'ottimizzazione della quantificazione in qPCR sono state adottate le specifiche di validazione internazionali (MIQE Guidelines).

RISULTATI

Dall'analisi *in-silico* dei progetti genomi di *D. suzukii* sono stati individuati (annotati) 66 geni MFO, 20 geni GST e 27 EST e 6 geni nAChrs. L'analisi dei trascrittomi ha confermato che tutti i geni annotati erano espressi in popolazioni suscettibili di *D. suzukii*. Inoltre sia nei geni MFO che nAChrs sono stati individuati numerosi splicings alternativi (diverse isoforme di trascritto prodotte da un singolo gene). Questo ha costretto ad un'ulteriore analisi e al disegno di coppie di primers in grado di amplificare contemporaneamente tutte le isoforme prodotte da un singolo gene. Successivamente a questa *analisi in-silico*, sono stati resi noti, inizialmente come comunicazione personale e successivamente pubblicati sulla rivista *Insect Science*, i dati relativi ai geni sovraespressi in popolazioni americane di *D. suzukii*, con ridotta suscettibilità allo spinosad. Ipotizzando meccanismi di detossificazione del principio attivo analoghi anche nelle popolazioni locali di *D. suzukii* si è ristretto il numero di geni candidati MFO, GST ed EST da analizzare. Nel contempo, sempre sulla scorta del medesimo lavoro scientifico, si è estesa l'analisi ad altri geni coinvolti nei meccanismi di contrasto all'azione tossica degli agrofarmaci, sia di tipo aspecifico, quali le proteine cuticolari (Cprs), che responsabili della fase due di detossificazione, quali le famiglie delle UDP-glucuronosil-transferasi e dei trasportatori di membrana glicoproteine P (Mdr) (Tabelle 4-6). I dati riportati per *D. melanogaster*, associano meccanismi di resistenza bersaglio specifico a spinosad, la variazione dell'espressione del gene per la subunità 6 del recettore colinergico nicotinico (D6 α nAChr) e la presenza di isoforme dovute a splicing alternativi. L'analisi *in-silico* dei genomi e trascrittomi per *D. suzukii* ha evidenziato la presenza di un singolo gene D6 α nAChr che produce per splicing alternativo, due isoforme. Sono state quindi disegnate una coppia di primers comune ad entrambe le isoforme per l'analisi di espressione del gene D6 α nAChr, e altre due coppie per la verifica della presenza dei singoli splicing alternativi (Tabella 7). Le specifiche di validazione dell'analisi d'espressione MIQE hanno richiesto il disegno di ulteriori primers per amplificazione di tre geni costitutivamente espressi da usare come riferimento: arginina chinasi (AK), α -tubulina (TUB), TATA binding protein (TBP) (Tabella 8). Per ogni coppia di primers è stata calcolata l'efficienza di amplificazione attraverso la realizzazione di una curva standard. Tutte le

efficienze di amplificazione sono comprese nell'intervallo 90%-105%, come richiesto dalle specifiche di validazione MIQE (Tabelle 1-8).

Tabella 1. Primers validati per l'analisi dell'espressione dei geni monossigenasi (MFOs)

Gene	Codice [†]	Primers Senso / Antiseno sequenza 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
<i>Cyp4e3</i>	DS10_00001612	CAAAGCATCTGGAGCACATTT GCCATTTGCTGCCATAACTC	62 62	sì	117	97
<i>Cyp9b2</i>	DS10_00005633	ACTCGTCAGCACAAACTGG CGCTCGTTGGAGGTGATAAA	62 62	sì	143	94
<i>Cyp6d5</i>	DS10_00010146	CTACAGCATCCTTCACTCTAACG CCTTTGATCCCAGTAGCTAAAT	62 62	sì	147	101
<i>Cyp28c1</i>	DS10_00006283	CGGTATTCTCCACTTTGCTGAC GAATCGCAGGCCAAGATCAA	63 63	sì	146	95
<i>Cyp318a1</i>	DS10_00006479	CACCCGAGTCCTCTATATC CAATTTCCATCGCTGTCCTCT	62 62	sì	145	92
<i>Cyp4d8</i>	DS10_00007267	ACGTTCCAATTCTCGATCCT GGTAAACAGCAGCTCCACATC	63 63	sì	123	98
<i>Cyp313b1</i>	DS10_00011427	GATGATGAATCCGGAGACCTTT CCACACTATTGGGATCGTTGA	62 62	sì	122	98
<i>Cyp301a1</i>	DS10_00006671	GGTTGGAGTGCATGGAGAA CCAGGAAATCTTCGGTGATGA	62 62	sì	122	103
<i>Cyp6a14</i>	DS10_00006768	GATCAGGTGGTAGCCGAAAC TCTCAGGGTCGTGGTGAATA	62 62	sì	157	94
<i>Cyp4d14</i>	DS10_00005248	CCTGTTCGTGTGGGATTACA GAATTGCAGATCGAAGACAGTTT	62 62	sì	148	92
<i>Cyp4g15</i>	DS10_00005372	CATCGAGCTCTTCAACGAGAA CCATCGCAGTCTCCAATAGAAT	62 62	sì	128	98
<i>Cyp49a1</i>	DS10_00002822	GACATTGCCAGCGAGTTTATG GGAAACACGACCCACAGATT	62 62	sì	120	101
<i>Cyp308a1</i>	DS10_00008996	CGAGCAAATCTACAGGCAGAA TATCGGCACAGTCAGCAAAG	62 62	sì	140	105
<i>Cyp304a1</i>	DS10_00011958	CCGGATACCTAAGGATACCATTTG CAGAGAGACATCCAGCTTCAG	62 62	sì	145	96
<i>Cyp6d5</i>	DS10_00008996	CATGTTTCAAACCTCCGATTCC TCGATGGCATAGGTTGACATTA	62 62	sì	120	98

Tabella 2. Primers validati per l'analisi dell'espressione dei geni glutatione-S-transferasi (GSTs)

Gene	Codice [†]	Primers Senso / Antisenso 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
<i>GstE10</i>	DS10_00005732	TTGACCATCGCCGACTTTAG AGAAGGGCAATGAGGAAAGG	62 62	no	127	100
<i>GstD10</i>	DS10_00005633	GCGTGCTATCATGGTGTATCT TCTTGTAAGGGTGCCCATATC	62 62	no	143	94
<i>GstZ2</i>	DS10_00012547	GCGATGAACCTGAAGGAGATAC AGGGTGTGTCCATCGATCT	62 62	sì	140	97
<i>GstE14</i>	DS10_00005732	AAGTACGACAAAGGCGGAAG GACGATCGCCGACATGAAA	62	sì	126	102

Tabella 3. Primers validati per l'analisi dell'espressione dei geni carbossilsesterasi (ESTs)

Gene	Codice [†]	Primers Senso / Antisenso 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
<i>EST1</i>	DS10_00002107	TTGGGCGCCAAGGTTATT GATTCGCTGTCGTAGATGGT	62 62	sì	129	99

Tabella 4. Primers validati per l'analisi dell'espressione dei geni delle proteine cuticulari (Cprs)

Gene	Codice [†]	Primers Senso / Antisenso 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
<i>Cpr92F</i>	DS10_00012013	CCACACCTACTCCTACGGATAC GGACACCGATTGCACATGA	62 63	no	124	96
<i>Cpr100A</i>	DS10_00009142	GTTCAGATTTCTTGCACTGACC AGCTCCGAACCTTCCATCTC	62 62	sì	127	99
<i>Cpr76Bd</i>	DS10_00010970	GTATCCATGCGGGTGACTTAG CAGACCAGATCCATGTGACAG	62 62	sì	131	102
<i>Cpr50Cb</i>	DS10_00006544	CCAAGAACGGCTACGACTAC CATGGTCATCGGCTGGTT	62 62	sì	141	104
<i>Cpr49Ac</i>	DS10_00002609	AGTCCC GTTCCGGATAATAATG GATAGTAGCGACCTTCGTTCTG	62 62	sì	124	94
<i>Cpr49Ah</i>	DS10_00002617	CAGCACCTGGATACCCATAATC CTCCGTTTGGGTTTCGTATCA	62 62	no	140	105
<i>Cpr49Ae</i>	DS10_00002615	CTATGCATACGAAACGGCTAATG GAATAGTTCAGGGTGATCAGGT	62 62	sì	150	92
<i>Cpr47Ee</i>	DS10_00002668	GGTAGCTTCTCCTACGGATACT GTAGGAGCCTTGAATCACCTG	62 62	sì	117	98
<i>Cpr47Ec</i>	DS10_00002664	CCTGTTGTCATGGTCTTCCT TCCATCTGCACCTGAGTATTG	62 62	no	116	97
<i>Cpr62Bb</i>	DS10_00004445	CGGGATATGCCCTGGATTATT AGTATTGACCCTTGACCACATC	62 62	sì	129	101
<i>Cpr62Bc</i>	DS10_00004444	GGAATTGACTACCATGCCTACC AGTAGGATCCCTTACCACAT	62 63	sì	121	100
<i>Cpr73D</i>	DS10_00007831	GACATTGGCGGCTACTATCAC CCGTTACGCGAAATCCA	62 63	sì	140	93

Tabella 5. Primers validati per l'analisi dell'espressione dei geni UDP-glucuronosil-transferasi (Ugts)

Gene	Codice [†]	Primers Senso / Antisenso 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
<i>Ugt58Fa</i>	DS10_00011833	TTACGCATTATTCGTTTCGATCA GACTCAGGCTGGGAAATAGA	61 61	sì	134	98
<i>Ugt36Ba</i>	DS10_00000511	AGATGAACCAGATGTATGAGAAAG C GCTGGGCGAATGGTAATTGTA	62 63	sì	116	97
<i>Ugt37b1</i>	DS10_00007689	GCACTTGACTGTCGAACCT CGTCTCCATAGATCTCCCTGTA	62 62	sì	140	94
<i>Ugt58Fa</i>	DS10_00002120	GCCAGTCGTGAACACATAATTG ACCAAGATCAGCGAGGTTTC	62 62	sì	150	104
<i>Ugt35b</i>	DS10_00008650	GTGGACATTACCCGCTTAGTT ATGGGACGCAAATCCATAGTAG	62 62	no	132	97
<i>Ugt36Bb</i>	DS10_00008650	CAAGGAGGAGTCCCAGTTTATG AGGGTTTCGGCATTCTTCT	62 62	no	132	95

Tabella 6. Primers validati per l'analisi dell'espressione dei geni per i trasportatori di membrana (Mdrs)

Gene	Codice [†]	Primers Senso / Antisenso 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
<i>Mdr50</i>	DS10_00007689	TCGATCGCACAATCAGAGAAA CGTAGCCCAATGGAAGGTTAG	62 62	sì	129	98
<i>Mdr65</i>	DS10_00008650	TACGCATTACTGACAACATGGA AGAGCCAGTTTCCATCCATAAA	62 62	sì	130	102

Tabella 7. Primers validati per l'analisi dell'espressione e degli splicing alternativi del gene per il recettore nicotinico colinergico (nACh) subunità alpha 6 (GenBank: *XP_016936845*)

Gene	Analisi	Primers Senso / Antisenso 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
<i>nACh</i> (sub. 6 α)	espressione	TCGATCGCACAATCAGAGAAA CGTAGCCCAATGGAAGGTTAG	62 62	sì	120	102
	splicings alternativi	CACCTGCTCTCCACATACAA GAGAAACACTGTGAGCGATAGA CCATGCCGGGAAAGAAGAATA CTTCCAATCGCCAATCAATTCC	62 62 62 62	no	831	n.d.

Tabella 8. Primers validati per l'analisi dell'espressione dei geni costitutivamente espressi

Gene	Codice [†]	Primers Senso / Antisenso 5' -> 3'	Temp. (°C)	Giunzione Int/Esone	Dim. (bp)	Eff. (%)
AK	DS10_00003811	CTACCACAACGATGCCAAGA AAGGTCAGGAAGCCGAGA	61 62	no	180	105
TBP	DS10_00003466	CCACGGTGAATCTGTGCT GGAGTCGTCCTCGCTCTT	61 62	no	182	102
TUB	DS10_00003884	AGGATGCGGCGAATAACT CGGTGGATAGTCGCTCAA	60 60	no	189	97

Codice: riferito alla banca dati Spotted Wing Fly Base (<http://spottedwingflybase.oregonstate.edu>); n.d.: non determinato (l'analisi degli splicing alternativi è solo qualitativa); Temp. : temperatura di appaiamento dei primers; Giunzione Int/Esone: se almeno uno dei due primers si appoggia sulla giunzione esone/introne; Dim. : dimensione dell'amplificato in paia di basi (bp); Eff. : efficienza di amplificazione per quella data coppia di primers.

CONCLUSIONI

Sulla scorta della letteratura scientifica è stato messo a punto un sistema in Real-time PCR per l'analisi d'espressione di geni potenzialmente coinvolti nella resistenza allo spinosad in adulti di *D. suzukii*, considerando diversi possibili meccanismi. Per la resistenza di tipo metabolico il sistema permette di analizzare l'espressione di 30 geni coinvolti nelle tre fasi di metabolizzazione dell'agrofarmaco (fase I (ossidazione e/o idrolisi): 15 geni MFO e 1 gene EST; fase II (coniugazione con composti idrofilici): 4 geni GST e 8 Ugt; fase 3 (escrezione cellulare): 2 geni Mdr.

Per l'accertamento di una ridotta penetrazione cuticolare del principio attivo è stata validata l'analisi del livello d'espressione di 12 geni codificanti proteine cuticolari (Cprs). L'esistenza di una eventuale resistenza di tipo bersaglio specifico è verificata tramite l'analisi d'espressione del recettore bersaglio dell'agrofarmaco (D6α nChr) e della presenza di isoforme alternative del trascritto prodotte dallo stesso gene. Il metodo verrà applicato nelle successive fasi del progetto in merito allo studio di una popolazione selezionata in laboratorio per la resistenza a spinosad.

Prova 2.4.2.3 - Applicazione di un protocollo di misura del livello d'espressione dei geni per la resistenza metabolica ai prodotti fitosanitari e di tipo bersaglio specifica in una popolazione a spinosad.

Questa prova, successiva alle precedenti 2, che ha l'obiettivo di applicare il protocollo di analisi d'espressione dei geni candidati nella popolazione del fitofago selezionata per la resistenza al fitofago.

OBIETTIVO

Obiettivo è l'analisi del genoma e trascrittoma di *D. suzukii* per l'individuazione *in-silico* dei geni candidati alla detossificazione degli agrofarmaci (resistenza metabolica) e in particolare a spinosad (resistenza bersaglio specifico). Validazione *in-vitro* dell'espressione dei geni candidati, in una popolazione di controllo suscettibile. Per confermare la specificità dei geni differenzialmente espressi dopo selezione con Laser® è stata valutata anche l'espressione dei geni che, *in D. suzukii*, rispondono alla pressione selettiva con Exirel®, dato che il principio attivo di questo insetticida, il cyazypyr, ha un meccanismo d'azione alternativo a quello dello spinosad e appartiene ad una classe biochimica con diverso percorso di metabolizzazione.

MATERIALI E METODI

L'analisi dell'espressione genica ha previsto l'estrazione dell'RNA da un pool di 10 individui adulti in triplicato sia dalla popolazione di partenza (G0) sia da quella sottoposta a trattamento con Laser G4. Sono state condotte analisi qualitative (elettroforesi su gel d'agarosio) che quantitative (lettura al spettrofotometrica al Nanodrop). Dopo trattamento con l'enzima DNase RapidOut DNA Removal kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) per consentire la rimozione del DNA, 1 µg di RNAtot è stato retrotrascritto da ogni replicato utilizzando il kit RevertAid first strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Un controllo negativo per ogni reazione di retrotrascrizione è stato ottenuto omettendo la trascrittasi

inversa. Cinque microlitri di retrotrascritto (equivalenti a 8 ng di cDNA) sono stati utilizzati la reazione in RT-qPCR su piattaforma ABI-7900HT, metodo SybrGreen, seguendo il protocollo ottimizzato nella fase 2.4.2.2. Per ogni triplicato biologico (un retrotrascritto) sono stati svolti tre replicati tecnici di reazione di RT-qPCR. Il livello dell'espressione genica è stata misurato in ogni gene target e normalizzata sui tre geni *house keeping*. L'efficienza di amplificazione per ogni reazione è stata calcolata utilizzando il software LinReg (Ruijter et al., 2009). La variazione di espressione per ogni gene fra popolazione selezionata e non, così come la sua significatività statistica è stata ottenuta tramite il software REST (Qiagen, Hilden, Germany). L'analisi degli splicings alternativi per il gene che codifica il recettore recettore nicotinic coninergico (nAChR) subunità alpha 6, è stata condotta sui medesi trascritti, amplificando 2 µl di cDNA in 20 µl di reazione di amplificazione utilizzando il kit Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), secondo il profilo termico 98°C x 30 sec; 35 cicli: 98°C x 5 sec; 62°C x 5 sec; 72°C x 15 sec; 72°C x 5 min. Il prodotto di amplificazione (5 µl) è stato controllato mediante elettroforesi standard su gel di agarosio 1% w/v in TBE 0.5x, contenente 1x Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen).

RISULTATI

L'analisi dell'espressione genica sulla generazione G4 della popolazione di *D. sukuzii* selezionata con Laser® ha evidenziato 5 geni differenzialmente espressi rispetto alla popolazione di partenza, non selezionata (Figura 1A). Due geni appaiono sovraespressi dopo l'esposizione continuata al principio attivo spinosad, rispettivamente 2,1 e 1,8 rispetto a quella di partenza: il gene Cyp318a, appartenente alla famiglia delle monoossigenasi e il gene Ugt58F, appartenente alla famiglia delle uridina-difosfato-glucoronil-trasferasi sono più espressi. L'espressione è invece diminuita a seguito della selezione col Laser® per i geni codificanti le monoossigenasi Cyp92F e Cyp4ae3 di 1,7 e 1,9 volte rispetto alla popolazione di controllo. Anche l'espressione di una proteina cuticolare Cpr100, è negativamente correlata all'esposizione al principio attivo spinosad, con una diminuzione pari a 1,9 volte. Nei rimanenti geni analizzati non si è verificata alcuna variazione statisticamente significativa nella popolazione di controllo rispetto a quella selezionata.

Nella generazione G4 della popolazione di *D. sukuzii* selezionata con Exirel®, la variazione nel profilo d'espressione riguarda 7 geni. Quattro geni appaiono sovraespressi: si tratta delle monoossigenasi Cyp12d e Cyp65d (entrambe 1,9 più espresse rispetto alla popolazione di controllo), del trasportatore di membrana MDR50 (3,3 volte sovraespresso) e del recettore rianodinico RyR (1,8 volte sovraespresso), che rappresenta il target del principio attivo cyazypyr. L'espressione di tre geni è invece diminuita a seguito della esposizione continuata all'Exirel®: si tratta dei geni per le proteine cuticolari Cpr47 e Cpr42 (2,8 e 2,2 volte sottoespressi nella popolazione selezionata) e della glutatione-S-trasferasi GSTD10, interessata da un decremento della sua espressione pari a 1,9 volte. Nei rimanenti geni analizzati non si è verificata alcuna variazione statisticamente significativa nella popolazione di controllo rispetto a quella selezionata.

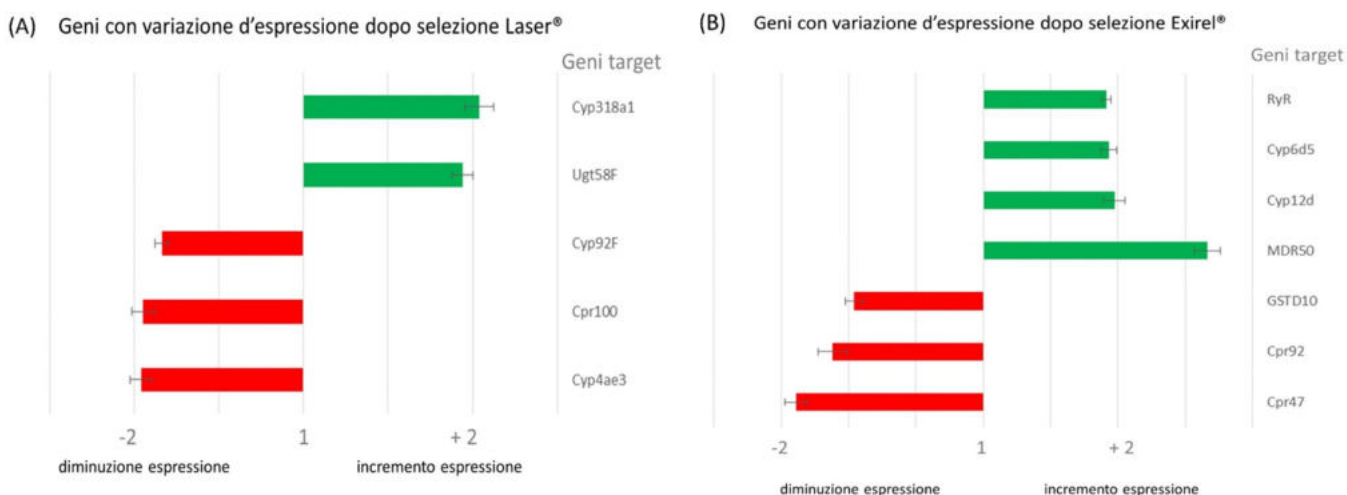


Figura 1. Rapporti d'espressione fra la popolazione selezionata e quella di partenza per i geni differenzialmente espressi ($p < 0.01$; boot-strapping method, REST® software) dopo trattamento con spinosad (A) e con cyazypyr (B). I risultati sono presentati come medie \pm errore standard.

La verifica degli *splicing* alternativi del trascritto per il recettore recettore nicotinico colinergico (nAChr), proteina target del principio attivo spinosad, ha evidenziato la presenza di entrambe le isoforme possibili, sia nella popolazione di partenza che in quella sottoposta a pressione selettiva con Laser® (Figura 2). Il trattamento con questo principio attivo non sembra influenzare l'utilizzo preferenziale di una delle due isoforme e pertanto l'esame degli *splicing* alternativi del trascritto per il recettore nAChr non rappresenta un suo possibile marcatore della risposta adattativa allo spinosad.

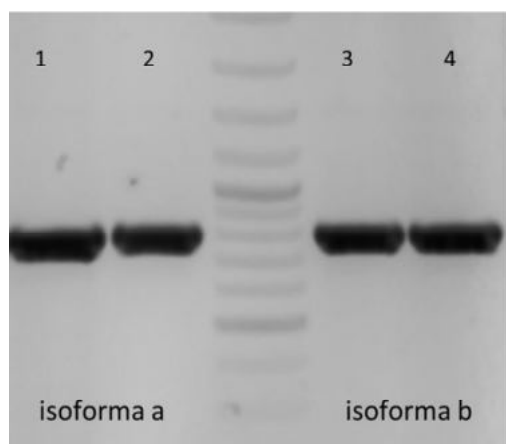


Figura 2. Elettroforesi su gel d'agarosio dei risultati di RT-PCR per l'analisi delle isoforme alternative (a e b) del recettore nicotinico colinergico (nAChr). Corsia 1 e 3: popolazione non selezionata; corsia 2 e 4 popolazione selezionata con Laser®; al centro marcatore di peso molecolare.

CONCLUSIONI

Il trattamento per quattro successive generazioni con Laser® in *D. sukii* ha comportato un variazione del profilo d'espressione in un numero limitato di geni. Il risultato può essere spiegato con un contenuto incremento della tolleranza osservata al biosaggio nel corso della selezione, misurato in termini di incremento della per la CL₅₀ (Fig. 1, Fase 2.4.1). Nonostante questo, è stato possibile evidenziare una risposta adattativa della popolazione sottoposta a pressione selettiva, con la variazione dell'espressione di 5 geni che governano sia sistemi metabolici detossificanti gli xenobiotici (tre monoossigenasi e glucuronil-trasferasi) che geni coinvolti nella sintesi delle proteine cuticolari. La specificità di risposta allo spinosad è stata confermata per confronto con la variazione del profilo d'espressione genica, ottenuto operando la selezione con un principio attivo dotato di un diverso meccanismo d'azione, il cyazypyr. In questo caso la risposta adattativa, pur facendo leva sull'espressione di geni che presiedono alla regolazione di percorsi metabolici detossificanti e la sintesi cuticolare, ugualmente a quanto accaduto per il trattamento con spinosad, ha riguardato un set di 7 geni diversi. I target genici, per i quali è stata riscontrata una variazione del livello d'espressione, potranno essere utilizzati come marcatori molecolari, per evidenziare una risposta adattativa nelle popolazioni di campo per i due principi attivi spinosad e cyazypyr. In presenza di un fitofago come la *D. sukii*, dotato di un breve periodo di generazione e di un potenziale adattativo elevato ai climi invernali, lo sviluppo anche solo di tolleranze ai principi attivi utilizzati, in presenza di condizioni climatiche favorevoli, potrebbe comportare un significativo incremento della densità di popolazione e ad un attacco economicamente quantificabile in una coltura come di pregio, come il ciliegio, che prevede una soglia di danno minima. E' quindi ugualmente utile disporre di presidi diagnostici in grado di evidenziare diminuzioni della suscettibilità ai principi attivi anche in assenza di una resistenza conclamata.

CONCLUSIONI PER IL TRIENNIO

Il rischio di sviluppo di resistenza in *D. sukii* a spinosad e cyantraniliprole valutata in una popolazione suscettibile di riferimento tramite selezione di laboratorio appare attualmente contenuto. Tuttavia si è registrata la possibilità di sviluppo di tolleranza alla diamide (incremento della CL₅₀ dopo selezione di un fattore superiore a 10 rispetto alla popolazione di partenza) ma non alla spinosina. L'analisi d'espressione genica ha permesso di individuare marcatori molecolari associati a questa tolleranza. In condizioni di campo, in presenza di fattori climatici particolarmente favorevoli, la rilevazione della tolleranza al cyantraniliprole tramite marcatori molecolari potrebbe orientare la strategia di difesa verso la sostituzione di un trattamento con Exirel® con uno di Laser® per contenere i rischi di aumento della popolazione del fitofago.

Fase 2.4.3: Realizzazione delle linee di base al cianiliprole su popolazioni di *Drosophila suzukii*

Uar: Terremerse

OBIETTIVO

Scopo di questo studio è stato determinare una curva dose-risposta di tre differenti popolazioni di *D. suzukii* in esame al principio attivo Cyantraniliprole che sta di recente entrando in uso per strategie di difesa verso questo insetto.

MATERIALI E METODI

Le popolazioni in esame sono state raccolte una in zona **Russi (Ravenna)** da fichi e susine infestate, una in zona **Sant'Alberto (Ravenna)** ed infine in zona **Ravenna** entrambe prelevate da ciliegie infestate. Dopo la raccolta, le popolazioni sono state mantenute in allevamento in condizioni di laboratorio su dieta specifica.

Gli adulti di *D. suzukii* sono stati poi testati esponendoli a 5 dosi crescenti di principio attivo Cyantraniliprole (0-10-100-1000-5000ppm).

Sono stati riempiti pozzetti entomologici con 0.75 ml di agar più saccarosio e in superficie sono stati distribuiti tramite pipetta Gilson 20 µl delle 5 diverse soluzioni a crescenti concentrazioni di principio attivo (Fig. 1).



Fig.1- Preparazione dei pozzetti trattati

Contemporaneamente, per ogni popolazione, è stato predisposto un testimone non trattato.

La prova con la popolazione proveniente da Russi (Ravenna) è stata impostata con due ripetizioni e, in ogni tesi sono stati utilizzati 48 adulti per la prima ripetizione e 32 per la seconda.

La prova con la popolazione prelevata nella zona di Sant'Alberto (RA) è stata impostata con tre ripetizioni con l'utilizzo di 16 adulti per ogni trattamento di ogni replica.

La prova con la popolazione catturata nella zona di Ravenna constava di due repliche con l'utilizzo di 16 adulti per ogni trattamento di ogni replica.

La difficoltà nell'allevamento artificiale di tale insetto non ha permesso di utilizzare lo stesso numero di individui e di repliche omogeneo per tutte e tre le popolazioni.

L'infestazione ha previsto che gli adulti, isolati ognuno in ogni singolo pozzetto, sul substrato alimentare trattato, venissero così esposti ad un test sia per contatto che per alimentazione (Fig.2).

I pozzetti sono poi stati incubati a condizioni standard (25°C, 75% RH, photoperiod 16:8) e la mortalità rilevata a 72 ore dal trattamento.



Fig.2 - Pozzetti infestati con adulti di *D.sukukii*

RISULTATI

Risultati Popolazione zona Russi (RA)

In tabella 1 sono descritti i dati grezzi relativi alla mortalità registrata dopo 72 ore dall'infestazione ed in tabella 2 le elaborazioni relative della popolazione di Russi (RA).

Tabella 21 dati grezzi relativi alla mortalità dopo 72 ore dall'infestazione popolazione Russi (RA)

	Ripetizione	Dose (ppm)	n° Trattati	Morti	Moribondi
<i>D.sukukii</i> Russi (RA) vs Cyantraniliprole	I rep	0	47	3	0
		10	48	19	4
		100	48	33	4
		500	48	47	1
		1000	48	47	1
		5000	48	48	0
	II rep	0	32	2	0
		10	32	7	0
		100	32	14	5
		500	32	25	6
		1000	32	27	4
		5000	32	29	3

Tabella 22 Dati finali elaborati con Analisi Probit-Logit POLO

Drosophila suzukii Russi (RA) vs Cyantraniliprole

Individui totali testati nei trattamenti: 400

Individui testati nel controllo: 79

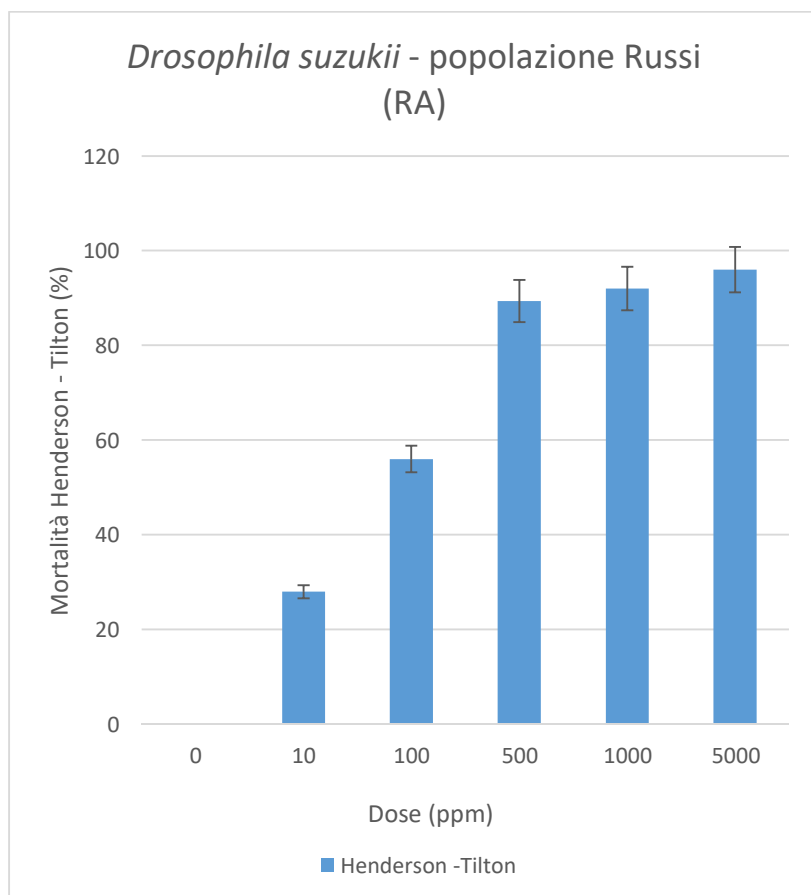
$\log(L) = -134.7$ slope = $1.333 + 0.145$

g : 0,140

LD50 = 27.403 limits: 9.967 to 52.884

LD90 = 250.719 limits: 129.567 to 698.096

Figura 17 Grafico Mortalità di *D. suzukii* popolazione di Russi (RA) calcolata con l'equazione di Henderson-Tilton



Risultati Popolazione zona Sant'Alberto (RA)

In tabella 3 sono descritti i dati grezzi relativi alla mortalità registrata dopo 72 ore dall'infestazione ed in tabella 4 le elaborazioni relative della popolazione Sant'Alberto (RA).

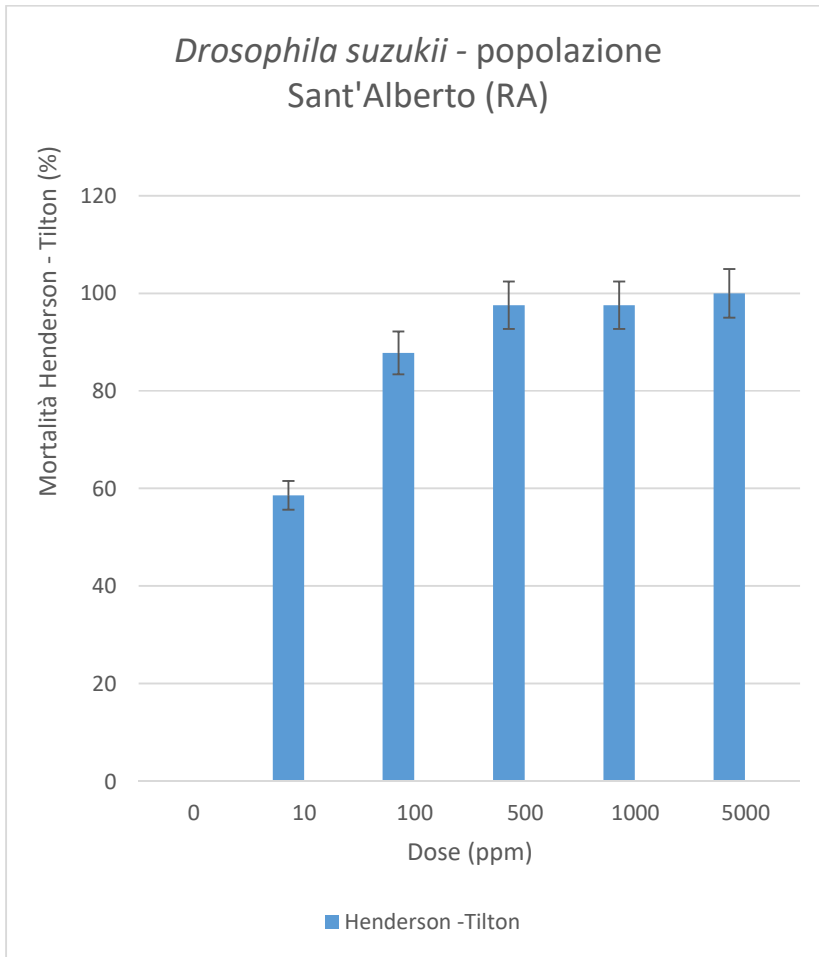
Tabella 23 dati grezzi relativi alla mortalità dopo 72 ore dall'infestazione popolazione Sant'Alberto (RA)

	Ripetizione	Dose (ppm)	Trattati n°	Morti n°	Vivi n°
<i>D.suzukii</i> Sant'Alberto (RA) vs Cyantraniliprole	I	0	16	2	14
		10	16	7	9
		100	16	13	3
		500	16	16	0
		1000	16	16	0
		5000	16	16	0
	II	0	16	3	13
		10	16	11	5
		100	16	16	0
		500	16	16	0
		1000	16	16	0
		5000	16	16	0
	III	0	16	2	14
		10	16	13	3
		100	16	14	2
		500	16	15	1
		1000	16	15	1
		5000	16	16	0

Tabella 24 Dati finali elaborati con Analisi Probit-Logit POLO

<p><i>Drosophila suzukii</i> Sant'Alberto (RA) vs Cyantraniliprole</p> <p>Individui totali testati nei trattamenti: 288</p> <p>Individui testati nel controllo: 48</p> <p>$\log(L) = -77.12 \text{ slope} = 0.969 + 0.184$</p> <p>$g : 0,172$</p> <p>LD50 = 6.059 limiti: 0.906-15.665</p> <p>LD90 = 127.501 limiti: 58.930-378.811</p>

Figura 18 Grafico Mortalità di *D. suzukii* popolazione di Sant'Alberto (RA) calcolata con l'equazione di Henderson-Tilton



Risultati Popolazione zona Ravenna

In tabella 5 sono descritti i dati grezzi relativi alla mortalità registrata dopo 72 ore dall'infestazione ed in tabella 6 le elaborazioni relative della popolazione Sant'Alberto (RA).

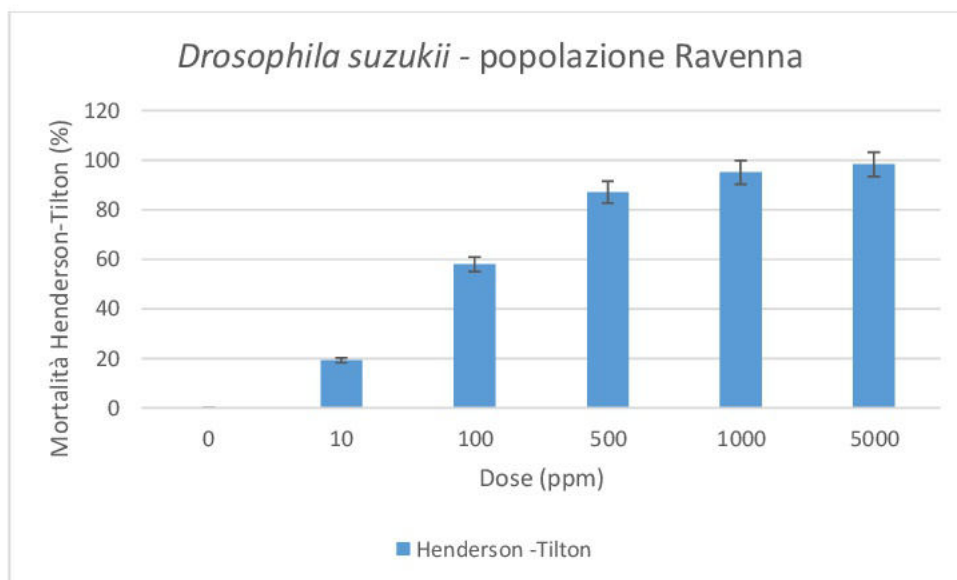
Tabella 5 dati grezzi relativi alla mortalità dopo 72 ore dall'infestazione popolazione zona Ravenna

	Ripetizione	Dose (ppm)	Trattati n°	Morti n°	Vivi n°
<i>D. suzukii</i> Ravenna vs Cyantraniliprole	I rep	0	32	2	30
		10	32	5	27
		100	32	18	14
		500	32	29	3
		1000	32	30	2
		5000	32	31	1
	II rep	0	32	0	32
		10	32	9	23
		100	32	20	12
		500	32	27	5
		1000	32	31	1
		5000	32	32	0

Tabella 6 Dati finali elaborati con Analisi Probit-Logit POLO

<p><i>Drosophila suzukii</i> zona Ravenna vs Cyantraniliprole</p> <p>Individui totali testati nei trattamenti: 384</p> <p>Individui testati nel controllo: 64</p> <p>$\log(L) = \text{slope} = 1.196 \pm 0.124$</p> <p>g : 0,64</p> <p>LD50 = 57,714 limiti: 36,689-84,097</p> <p>LD90 = 680,912 limiti: 442,816-1199,158</p>
--

Figura 19 Grafico Mortalità di *D. suzukii* popolazione di Ravenna calcolata con l'equazione di Henderson-Tilton



CONCLUSIONI DEL TRIENNIO

Lo studio condotto sulle tre popolazioni di *D. suzukii* testate con Cyantraniliprole ha permesso la definizione di una curva dose-risposta per ognuna da cui si possono ricavare le seguenti dosi letali:

- Popolazione proveniente da Russi (susine-fichi):
 - LD50: 27,403 ppm (limiti: 9,967-52,884)
 - LD90: 250,719 ppm (limiti 129,567-698,096)
- Popolazione proveniente da Sant'Alberto (ciliegie):
 - LD50 = 6.059 ppm (limiti: 0.906-15.665)
 - LD90 = 127.501 ppm (limiti: 58.930-378.811)
- Popolazione proveniente da Ravenna (ciliegie):
 - LD50 = 57,714 ppm (limiti: 36,689-84,097)
 - LD90 = 680,912 ppm (limiti: 442,816-1199,158)

2.5 - Realizzazione delle linee di base e definizione dei dosaggi discriminati la resistenza ai prodotti fitosanitari in popolazioni di *Lobesia botrana* in Emilia Romagna

Uar: Terremerse

OBIETTIVI

L'obiettivo di questo studio è definire una linea di base e le Dosi letali LD50 e LD90 su popolazioni di *Lobesia botrana* vs Rynaxypyr.

MATERIALI E METODI

Le 3 popolazioni al momento presenti presso il Laboratorio Biosaggi di Terremerse in fase di allevamento, sono state raccolte su vite in un'azienda di Alfonsine (Ravenna) alla fine di Agosto 2016, una di Filo (Ravenna) e una di Ravenna alla fine di Agosto 2017.

Dopo aver accuratamente estratto le larve presenti nei grappoli (Fig.1 e Fig.2), queste sono state messe in allevamento su substrato alimentare specifico e poste in cella climatizzata a condizioni controllate (temperatura circa 24°C, umidità relativa 60%, fotoperiodo luce-buio 16:8).

Lo scopo è incrementare il numero degli individui ed averne a sufficienza il prima possibile per poter condurre i test oltre a garantire la continuità in allevamento della popolazione per tutta la durata delle prove.

Il metodo che verrà seguito per l'esecuzione dei test è IRAC no. 017 per *L. botrana*.

Figura 1 e 2 Raccolta delle larve in campo



Sono state preparate soluzioni contenenti crescenti dosi di principio attivo Rynaxypyr e utilizzate per reidratare il premix standard Stonefly Heliiothis Diet. Contemporaneamente si preparerà un testimone non trattato reidratando il premix solo con acqua. Ogni dieta sarà poi distribuita nei pozzetti di specifici vassoio entomologici e infestata con larve neonate di *L. botrana*. Il rilievo di mortalità sarà effettuato dopo 96 ore dall'infestazione e di incubazione in cella a condizioni controllate (temperatura circa 22°C, umidità relativa 60%, fotoperiodo luce-buio 16:8). Questo sarà ripetuto per 2 volte allestendo così 2 ripetizioni da 16 insetti ciascuna. I dati saranno utilizzati per tracciare una curva dose-risposta e definire le concentrazioni letali DL50 e DL90.

RISULTATI

Popolazione Raccolta da zona Alfonsine (RA)

In tabella 1 sono descritti i dati grezzi relativi alla mortalità registrata dopo 96 ore dall'infestazione ed in tabella 2 le elaborazioni relative della popolazione di Alfonsine (RA).

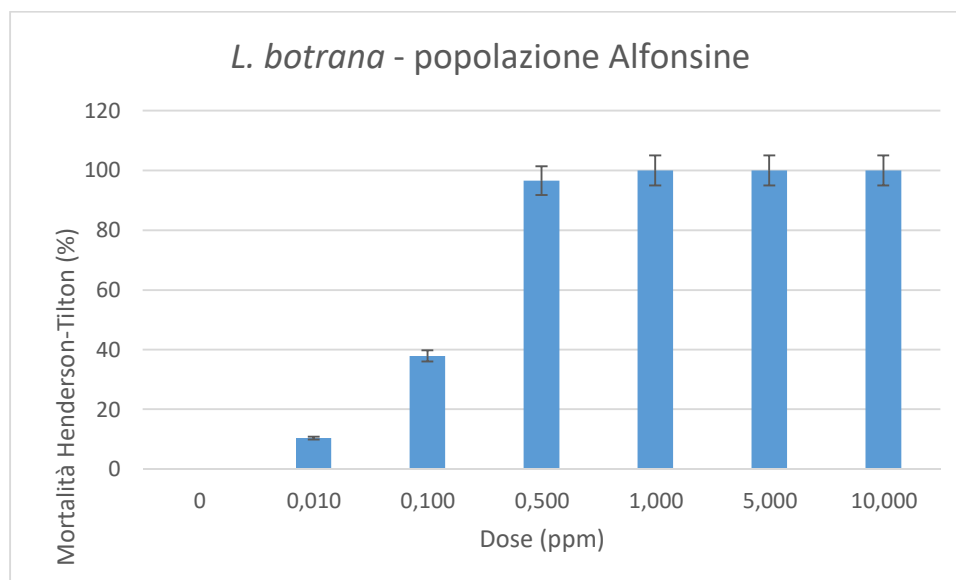
Tabella 1 dati grezzi relativi alla mortalità dopo 96 ore dall'infestazione popolazione zona Alfonsine

popolazione	ingrediente attivo	rep	Dose (ppm)	trattati	Morti	Morti	moribondi	vivi
Lb-IT-Alfonsine	Rynaxypyr	I	0	16	1	1	0	15
			0,010	16	3	0	3	13
			0,100	16	6	3	3	10
			0,500	16	15	13	2	1
			1,000	16	16	16	0	0
			5,000	16	16	16	0	0
			10,000	16	16	16	0	0
		II	0	16	2	2	0	14
			0,010	16	3	0	3	13
			0,100	16	8	2	6	8
			0,500	16	16	12	4	0
			1,000	16	16	16	0	0
			5,000	16	16	16	0	0
			10,000	16	16	16	0	0

Tabella 2 Dati finali elaborati con Analisi Probit-Logit POLO

<p><i>Lobesia botrana</i> Alfonsine vs Rynaxypyr</p> <p>Individui totali testati nei trattamenti: 224</p> <p>Individui testati nel controllo: 32</p> <p>$\log(L) = -52,44 \text{ slope} = 3,229 + 0,712$</p> <p>$g : 0,187$</p> <p>LD50 = 0,133 limiti: 0,085-0,188</p> <p>LD90 = 0,333 limiti: 0,230-0,658</p>

Figura 20 Grafico Mortalità di *L. botrana* popolazione di Alfonsine (RA) calcolata con l'equazione di Henderson-Tilton



Risultati Popolazione Filo

In tabella 3 sono descritti i dati grezzi relativi alla mortalità registrata dopo 96 ore dall'infestazione ed in tabella 4 le elaborazioni relative della popolazione di Filo (FE).

Tabella 3 dati grezzi relativi alla mortalità dopo 96 ore dall'infestazione popolazione zona Filo

popolazione	ingrediente attivo	rep	Dose (ppm)	trattati	Morti	Morti	moribondi
Lb-IT-Filo	Rynaxypyr	I	0	16	1	1	0
			0,010	16	0	0	0
			0,100	16	2	0	2
			0,500	16	10	2	8
			1,000	16	16	14	2
			5,000	16	16	16	0
			10,000	16	16	16	0
		II	0	16	0	0	0
			0,010	16	0	0	0
			0,100	16	4	4	0
			0,500	16	14	10	4
			1,000	16	16	14	2
			5,000	16	16	16	0
			10,000	16	16	16	0

Tabella 4 Dati finali elaborati con Analisi Probit-Logit POLO

Lobesia botrana Filo vs Rynaxypyr

Individui totali testati nei trattamenti: 224

Individui testati nel controllo: 32

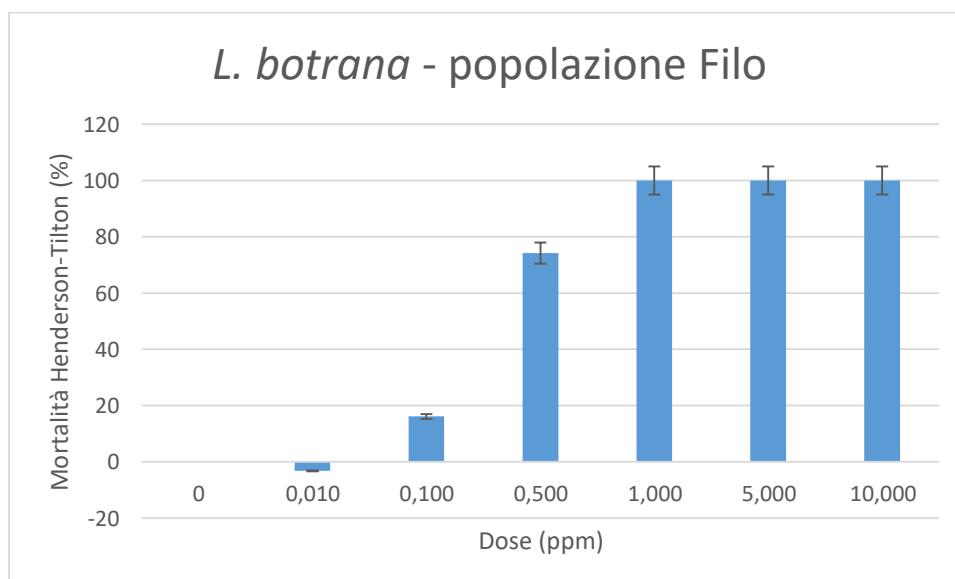
$\log(L) = -40,46$ slope = $2,787 + 0,446$

g : 0,98

LD50 = 0,235 limiti: 0,166-0,313

LD90 = 0,679 limiti: 0,493-1,104

Figura 21 Grafico Mortalità di *L. botrana* popolazione di Filo (FE) calcolata con l'equazione di Henderson-Tilton



Risultati Popolazione Ravenna

In tabella 5 sono descritti i dati grezzi relativi alla mortalità registrata dopo 96 ore dall'infestazione ed in tabella 6 le elaborazioni relative della popolazione di Ravenna.

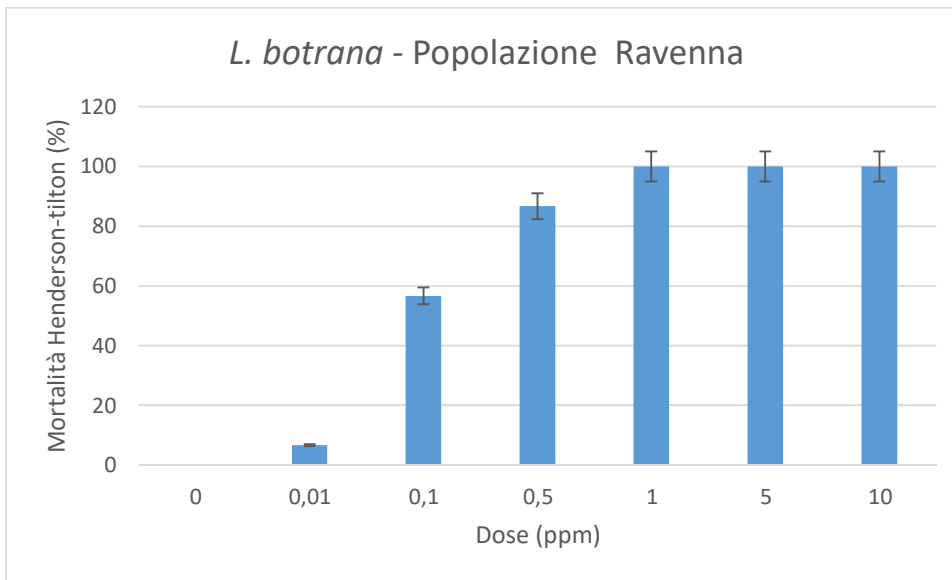
Tabella 25 dati grezzi relativi alla mortalità dopo 96 ore dall'infestazione popolazione zona Ravenna

popolazione	ingrediente attivo	rep	Dose (ppm)	trattati	Morti	Morti	moribondi	vivi
Lb-It-Ravenna	Rynaxypyr	I	0	16	1	1	0	15
			0,010	16	0	0	0	16
			0,100	16	12	4	8	4
			0,500	16	16	15	1	0
			1,000	16	16	16	0	0
			5,000	16	16	16	0	0
			10,000	16	16	16	0	0
		II	0	16	1	1	0	15
			0,050	16	4	1	3	12
			0,100	16	7	2	5	9
			0,250	16	12	9	3	4
			0,500	16	16	15	1	0
			1,000	16	16	16	0	0
			5,000	16	16	16	0	0

Tabella 26 Dati finali elaborati con Analisi Probit-Logit POLO

<i>Lobesia botrana</i> Filo vs Rynaxypyr
Individui totali testati nei trattamenti: 224
Individui testati nel controllo: 32
$\log(L) = -49.99$ slope = $2.769 \pm .491$ nat.resp. = $.042 \pm .029$
$g = 0,121$
LD50 = 0,095 limiti: 0,067-0,125
LD90 = 0,275 limiti: 0,200-0,470

Figura 22 Grafico Mortalità di *L. botrana* popolazione di Ravenna calcolata con l'equazione di Henderson-Tilton



CONCLUSIONI DEL TRIENNIO

Lo studio condotto sulle tre popolazioni di *L. botrana* testate con Rynaxypyr ha permesso la definizione di una curva dose-risposta per ognuna da cui si possono ricavare le seguenti dosi letali:

- Popolazione proveniente da Alfonsine:
- LD50 = 0,133 ppm limiti: 0,085-0,188
- LD90 = 0,333 ppm limiti: 0,230-0,658
- Popolazione proveniente da Filo:
- LD50 = 0,235 ppm limiti: 0,166-0,313
- LD90 = 0,679 ppm limiti: 0,493-1,104
- Popolazione proveniente da Ravenna:
- LD50 = 0,095 ppm limiti: 0,067-0,125
- LD90 = 0,275 ppm limiti: 0,200-0,470

SOTTO-AZIONE 3. TECNICHE DIAGNOSTICHE, DISTRIBUZIONE TERRITORIALE E GESTIONE DELLA RESISTENZA AGLI ERBICIDI NELLE PRINCIPALI MALERBE IN EMILIA-ROMAGNA.

3.1 MIGLIORAMENTO ED ADATTAMENTO DI TECNICHE DIAGNOSTICHE INNOVATIVE PER UNA VELOCE ED AFFIDABILE DETERMINAZIONE DELLO STATUS DI RESISTENZA AGLI ERBICIDI E PREPARAZIONE DI STRATEGIE DI GESTIONE SPECIFICHE.

Uar: IBAF-CNR

Terremerse

Cereali Padenna

OBIETTIVO

Acquisire le conoscenze sulle specie di infestanti interessate alla resistenza nei principali sistemi colturali caratteristici della regione Emilia Romagna. Le segnalazioni di scarso controllo delle infestanti in campo saranno monitorate e tramite saggi biologici condotti in serra la resistenza sarà verificata. Questo consentirà di capire se il mancato controllo in campo sia da attribuire all'evolversi della resistenza o ad altri fattori come l'errata tempistica degli interventi fitosanitari, l'inadeguata distribuzione o il sottodosaggio dell'erbicida impiegato. I nuovi casi di resistenza andranno ad aggiornare il database nazionale e le mappe di diffusione della resistenza agli erbicidi che saranno visualizzabili nel sito web del GIRE.

La raccolta delle informazioni storiche sulla gestione agronomica adottata dalle aziende dove sono stati accertati i casi di resistenza consentirà di valutare quali siano i principali fattori che hanno portato all'insorgenza della resistenza e di preparare delle strategie gestionali specifiche per infestanti e sistemi colturali coinvolti.

ANNO 1

MATERIALI E METODI

Campionamento

I campioni di infestanti sono stati raccolti da piante sopravvissute ad un trattamento erbicida in campo da parte di Terremerse e Cereali Padenna. I siti di campionamento sono stati individuati sulla base di segnalazioni di scarso controllo delle infestanti da parte degli agricoltori. Nel 2016, sono state campionate 2 popolazioni di *Echinochloa crus-galli*, una raccolta in mais ed un'altra in soia, 5 popolazioni di *Amaranthus* spp. raccolte in soia o pomodoro/soia, 2 popolazioni di *Avena* in frumento e 2 popolazioni di *Conyza* spp., 1 in vigneto ed 1 in un incolto (Tabella 1). I campioni di semi raccolti sono stati puliti e mantenuti a 4°C fino al momento del loro utilizzo. Il campionamento, eseguito da Terremerse e Cereali Padenna, è proseguito anche nel 2017, a giugno per le infestanti delle colture autunno-vernine e settembre per le colture estive (Tabella 2).

Tabella 1 Campioni di infestanti raccolte nel 2016 e testate e relative informazioni storiche

Genere	Specie	Codice	Comune e frazione	Coltura in atto	Informazioni storiche
ECH	CG	07-16L	Legnaro (IBAF)		Check suscettibile
ECH	CG	16-324	Argenta (FE) fraz. Longastrino	mais	2016: tembotrione + prosulfuron, pisello aclonifen + pendimetalin, imazamox + bentazone; 2015: mais tembotrione + prosulfuron; 2014: grano
ECH	CG	16-325	Codigoro (FE) fraz. Mezzogoro	soia	2016: propaquizafop+ quizalofop+ cicloxidim (x2); dal 2015 al 2012: riso (cialofop)
AMA	RE	11-01	Legnaro (IBAF)		Check suscettibile
AMA	RE	16-43	Comacchio (FE)	pomodoro	2016: rimsulfuron, metribuzin; 2015: soia tifenisulfuron, imazamox, bentazone; 2014: pomodoro; 2013: grano

AMA	RE	16-44a	Argenta (FE)	soia	2016:pisello aclonifen + pendimetalin (pre) imazamox (x2)+ bentazone (x2)+ tifensulfuron; 2015: idem; 2014: grano
AMA	RE	16-44b	Argenta (FE)	soia/pisello	2016: aclonifen + pendimetalin (pre) imazamox (x2)+ bentazone (x2)+ tifensulfuron; 2015: idem; 2014: grano
AMA	TU	16-48	Argenta (FE) fraz. Traghetto	soia	2016: imazamox, tifensulfuron; 2015: frumento (2,4-D + MCPA); 2014: mais (nicosulfuron, dicamba)
AMA	RE	16-49	Codigoro (FE)	soia	2016:imazamox + tifensulfuron, bifenox; 2015: mais (dicamba, mesotrione + terbutilazina); 2014 mais (S-metolachlor + terbutilazina)
AVE		95L	Legnaro (IBAF)		Check suscettibile
AVE		16-362	San Giorgio di Piano (BO)	frumento	Tri-allate + glufosinate, clopiralid + florasulam
AVE		16-353	Argenta (FE)	frumento	Clodinafop, clopiralid + fluroxipir+ MCPA
CON		11-9	Legnaro (IBAF)		Check suscettibile
CON		16-65	Argenta (FE)	incolto	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
CON		16-67	San Zaccaria (RA)	vigneto	Glifosate 2 volte all'anno + pyraflufen-etile

Tabella 2 Campioni di infestanti raccolte nel 2017 in corso di analisi ed informazioni storiche

Genere	Specie	Codice	Comune e frazione	Coltura in atto	Informazioni storiche
ALO	MYO	17-12	Ravenna (RA)	frumento	2017: clodinafop, 2015: fenoxaprop
ALO	MYO	17-13	Ravenna (RA)	frumento	2017 e 2016: clodinafop
ALO	MYO	17-16	Faenza (RA)	frumento	2017: clodinafop. 2016 propaquizafop e cicloxdim. 2015: clodinafop
AMA	RE	17-52	Argenta (FE) fraz. Longastrino	Soia/pisello	2017: bentazone+imazamox (2 volte) e aclonifen + pendimetalin; 2016: mais tembotrione,dicamba + prosulfuron; 2015: pomodoro rimsulfuron + mesozin (3 volte)
AMA	RE	17-53	Alfonsine (RA) fraz. Longastrino	soia	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: pomodoro pendimetalin + oxadiazon + metribuzin e rimsulfuron + metribuzin; 2015: frumento clodinafop + pinoxaden, florasulam
AMA	RE	17-54	Fiscaglia (FE)	soia	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: frumento clodinafop + florasulam + pinoxaden, MCPA; 2015: mais mesotrione + S-metolachlor + terbutilazina
AMA	SP	17-55	Ostellato (FE)	soia	2017: imazamox, tifensulfuron, cicloxdim; 2016: mais mesotrione + S-metolachlor + terbutilazina; 2015: pomodoro rimsulfuron, metribuzin
AMA	SP	17-56	Comacchio (FE)	soia	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: mais nicosulfuron, mesotrione, dicamba; 2015: soia imazamox, tifensulfuron, propaquizafop
AMA	SP	17-57	Lagosanto (FE)	soia	2017: imazamox, tifensulfuron, propaquizafop; 2016: frumento clodinafop + florasulam + pinoxaden; 2015: sorgo dicamba + prosulfuron, 2,4-D + MCPA
AMA	SP	17-58	Fiscaglia (FE)	soia	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: frumento clodinafop + florasulam + pinoxaden, MCPA; 2015: mais mesotrione + S-metolachlor + terbutilazina

AVE		17-363	Budrio (BO)	frumento	2017 Clodinafop
AVE		17-364	Valsamoggia (BO)	frumento	2017: clodinafop + Atlantis
AVE		17-365	Russi (RA)	frumento	2017: clodinafop
CON		17-70	Conselice (RA)	Vigneto	Glifosate 360 3L/ha 3 volte l'anno
CON		17-71	Ravenna (RA)	Vigneto	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
CON		17-72	Russi (RA)	Pescheto	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
CON		17-73	Lugo (RA)	Meleto	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
CON		17-74	Ravenna (RA)	Kiwi	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
ECH	CG	17-334	Ostellato (FE)	mais	2017 e 2016: nicosulfuron, dicamba, mesotrione; 2015: soia imazamox, tifensulfuron, propaquizafop
LOL		17-610	Bagnacavallo (RA)	frumento	2017: clodinafop
PAP	RH	17-114	Ravenna fraz. Piangipane	grano	2017: tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: sorgo S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano iodosulfuron + mesosulfuron
PAP	RH	17-115	Ravenna fraz. San Marco	grano	2017: tribenuron-metile, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: mais isoxaflutole, thiencazone; 2015: grano tribenuron, clodinafop
PAP	RH	17-116	Faenza (RA)	grano	2017: tribenuron; 2016: sorgo: S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano tribenuron
PAP	RH	17-117	Ravenna fraz. San Alberto	grano	2017: tribenuron; 2016 e 2015: grano/fagiolino tribenuron/imazamox, bentazone
PAP	RH	17-118	Ravenna fraz. Mandriole	grano	2017: tribenuron, iodo + mesosulfuron; 2016: mais S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano tribenuron, clodinafop
PAP	RH	17-119	Ravenna fraz. Mezzano	grano	2017: tribenuron; 2016: soia flufenacet + metribuzin, pendimetalin; 2015: grano tribenuron
PAP	RH	17-120	Ravenna fraz. S.Alberto	grano	2017: tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: girasole aclonifen, pendimetalin; 2015: grano tribenuron
PAP	RH	17-121	Ravenna fraz. San Bartolo	grano	2017: tribenuron, clodinafop; 2016: mais S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano/fagiolino tribenuron, clodinafop/imazamox, bentazone
PAP	RH	17-122	Forli (FC) fraz. Villanova	grano	2017: tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: sorgo S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron

Biosaggio

Per ogni specie di infestante è stato impiegato uno specifico protocollo per fare germinare i semi.

Echinochloa crus-galli: i semi di giavone sono stati scarificati in acido solforico 96% per 20 minuti, quindi seminati in torba umida e messi in germinatoio a 16/26 °C (notte/giorno) per 6 giorni. I semi germinati sono stati poi trapiantati in vaschette di plastica (325 x 265 x 95 mm) contenenti un miscuglio di 60% terra, 15% sabbia, 15% perlite e 10% torba. Due repliche di 15-20 piantine allo stadio di 2-3 foglie sono state trattate con gli erbicidi riportati in tabella 3 alla dose di campo (1x) e 3 volte la dose di campo (3x). Nell'esperimento è stata inserita anche una popolazione di riferimento (07-16L) suscettibile a tutti gli erbicidi.

Tabella 3 - Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento dei giavoni

Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose 1x)	Bagnante
fluazifop (Fusilade Max)	2 L/ha	250 g/ha	—
imazamox (Beyond)	0,9 L/ha	36 g/ha	Dash 0,5%
nicosulfuron (Ghibli)	1,5 L/ha	60 g/ha	—
cicloxidim (Stratos ultra)	2 L/ha	200 g/ha	—

Il trattamento è stato eseguito con uno specifico banco irroratore ad un volume della soluzione di 300L ha⁻¹, una pressione di esercizio di 215 kPa ed una velocità di avanzamento di 0.75 m s⁻¹. Dopo 4 settimane dal trattamento, è stata determinata la sopravvivenza ed è stata fatta una stima visiva della biomassa (VEB) rispetto al non trattato. Per ogni media delle 2 repliche è stato calcolato l'errore standard.

Amaranthus spp.: I semi di amaranto sono stati seminati direttamente in scatole di germinazione contenente un substrato di agar 0.6 % e quindi posti in germinatoio alle seguenti condizioni: 12 ore di luce a 26°C e 12 ore di buio a 15°C. Dopo 5-6 giorni, i semi germinati sono stati trapiantati in vaschette come descritto in precedenza e le piantine sono state trattate allo stadio di 2-4 vere foglie con gli erbicidi riportati in tabella 4 alle dose 1x e 3x. Il rilievo è stato eseguito dopo 4 settimane.

Tabella 4-Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento degli amaranti

Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose 1x)	Bagnante
tifensulfuron-metile (Harmony)	10 g/ha	7.5 g /ha	Trend 90 0.1%
imazamox (Altorex)	1L/ha	40 g/ha	—
bentazone (Basagran SG)	1 Kg/ha	403 g/ha	Dash 0,3 %
glifosate (Roundup platinum)	3 L/ha	1440 g/ha	—

Avena: I semi di avena sono stati seminati su torba in scatole di germinazione e poi vernalizzati per 3 giorni a 4°C e poi posti in germinatoio alle seguenti condizioni: 12 ore di luce a 26°C e 12 ore di buio a 15°C. Dopo 5-6 giorni, i semi germinati sono stati trapiantati in vaschette come descritto in precedenza e le piantine sono state trattate allo stadio di 2-4 vere foglie con gli erbicidi riportati in tabella 5 alle dose 1x e 3x per il solo Atlantis wg. Due repliche di 20 piantine sono state incluse per ogni popolazione e erbicida. Il rilievo per l'efficacia dell'erbicida è stato eseguito dopo 4 settimane dal trattamento.

Tabella 5 - Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento dell'avena

Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose 1x)	Bagnante
cicloxidim (Stratos ultra)	2 L/ha	200 g/ha	—
pinoxaden (Axial pronto)	0,75 L/ha	45 g/ha	—
iodosulfuron + mesosulfuron (Atlantis WG)	500 g/ha	3g/ha iodo+ 15 g/ha mesosulfuron	Biopower 1L/ha
glifosate (Mon 79351)	1,5 L/ha	720 g/ha	—
clodinafop (Topik)	0,25 L/ha	60 g/ha	—

Conyza: I semi di conyza sono stati seminati su torba in scatole di germinazione e posti direttamente a germinare in germinatoio alle seguenti condizioni: 12 ore di luce a 26 °C e 12 ore di buio a 15 °C. Dopo 15 giorni, i semi germinati sono stati trapiantati in vaschette come descritto in precedenza. Due repliche di 15 piantine sono state incluse per ogni popolazione e erbicida. Le piantine sono state trattate allo stadio di rosetta con 5-8 vere foglie con gli erbicidi riportati in tabella 6. Il rilievo per l'efficacia dell'erbicida è stato eseguito dopo 4 settimane dal trattamento.

Tabella 6 - Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento della Conyza

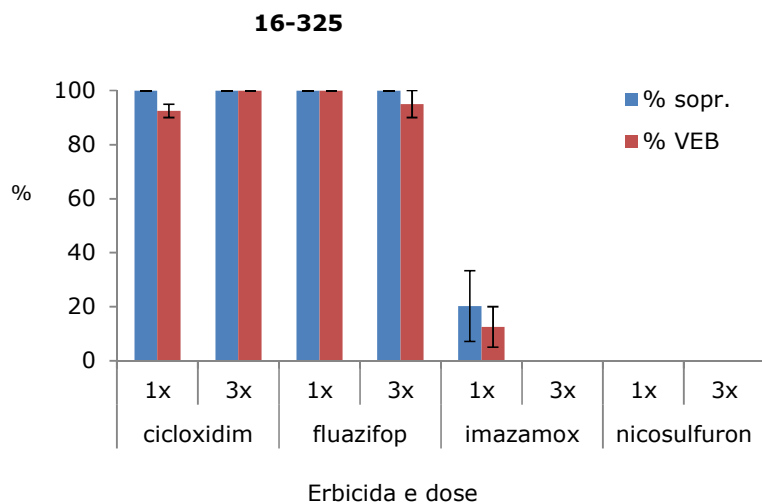
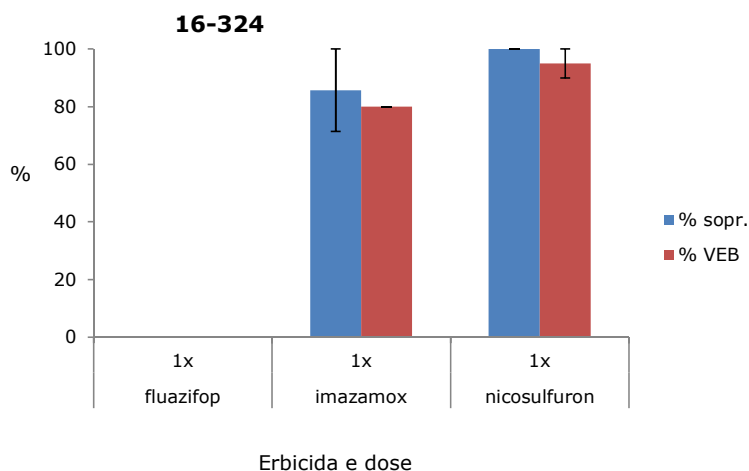
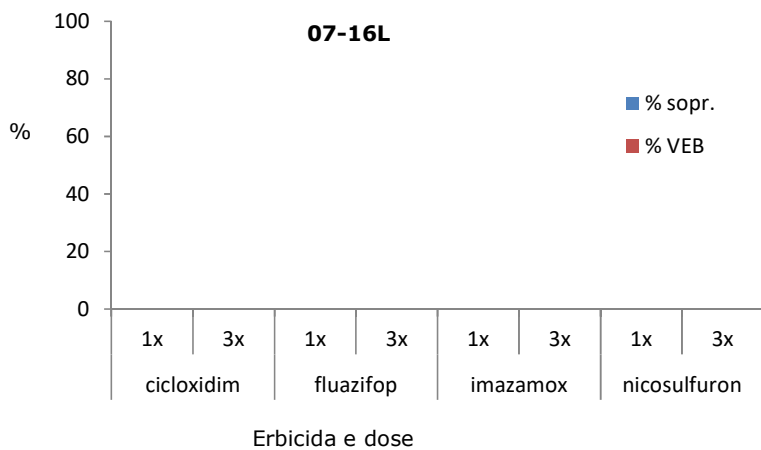
Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose1x)	Bagnante
glifosate (Roundup power 2.0)	3 L/ha	1080 g/ha	—
flazasulfuron (Chikara)	160 g/ha	40 g/ha	Adigor 1L/ha
oxifluorfen (Goal 480)	1 L/ha	480 g/ha	—
carfentrazone-etile (Spotlight plus)	0,3 L/ha	18 g /ha	—
glifosate + flazasulfuron (Roundup power 2.0 + Chikara)	3 L/ha + 80 g/ha	1080 g/ha glifo + 20 g/ha flazasulfuron	Adigor 1L/ha
glifosate + oxifluorfen (Roundup power 2.0 + Goal 480)	3 L/ha + 0,25 L/ha	1080 g/ha glifo + 120 g/ha oxifluorfen	
glifosate + carfentrazone-etile (Roundup power 2.0 + Spotlight plus)	3 L/ha + 0,3 L/ha	1080 g/ha glifo +18 g/ha carfentrazone	

RISULTATI***Echinochloa crus-galli***

La popolazione di giavone suscettibile (07-16L) è stata ben controllata da tutti gli erbicidi testati (Fig. 1). La popolazione 16-324, raccolta in mais è stata trattata con tutti gli erbicidi ma solo alla dose di campo in quanto i semi avevano una scarsa germinazione. Questa popolazione è stata pienamente controllata dal fluazifop, un erbicida appartenente agli inibitori dell'acetil coenzima A carbossilasi (ACCasi). Al contrario, più del 80% delle piante trattate sono sopravvissute all'imazamox e al nicosulfuron, 2 erbicidi inibitori dell'acetolattato sintetasi (ALS) (Fig.1).

La popolazione 16-325, raccolta in soia, è risultata altamente resistente ai 2 erbicidi inibitori dell'ACCasi testati, cicloxidim e fluazifop; anche alla dose 3x, il 100% delle piante sono sopravvissute al trattamento e la loro biomassa era molto elevata. Gli erbicidi inibitori dell'ALS, nicosulfuron ed imazamox hanno sostanzialmente controllato questa popolazione, solo poche piante sono sopravvissute ad imazamox alla dose di campo (Fig.1).

Figura 1- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 3 popolazioni di giavone dopo 4 settimane dal trattamento erbicida. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

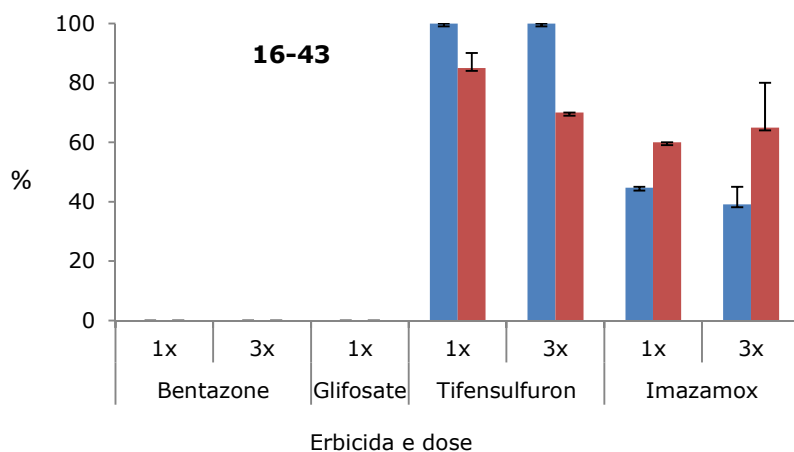
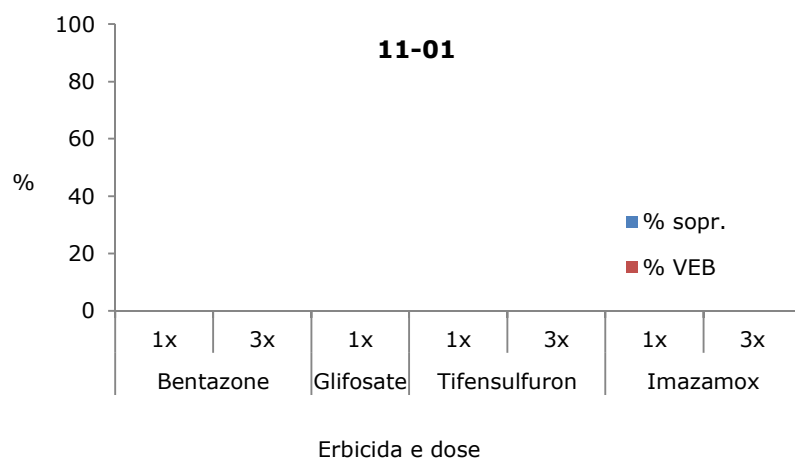


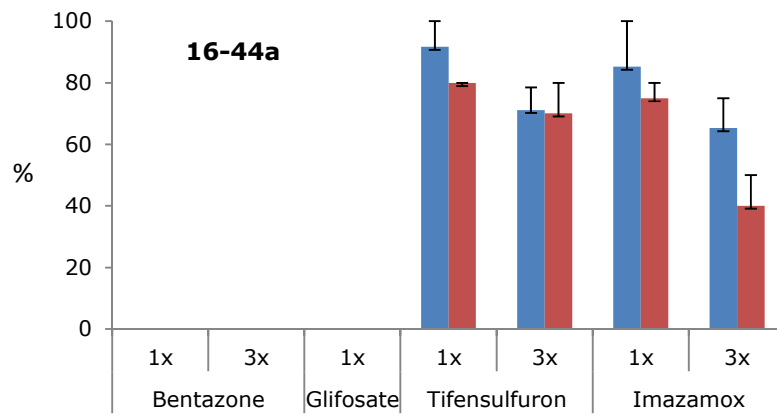
Amaranthus spp.

Le piante di amaranto mostrano una elevata variabilità fenotipica, rendendo difficile il riconoscimento della specie. Analizzando le caratteristiche delle infiorescenze è stato possibile individuare tra i campioni raccolti la presenza di due specie: *A. retroflexus* ed *A. tuberculatus*.

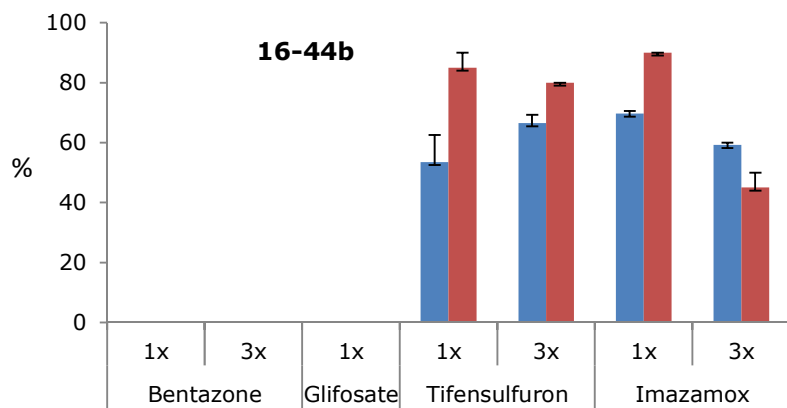
Nessuna pianta della popolazione suscettibile 11-01 è sopravvissuta ai trattamenti con i 4 erbicidi testati: tifensulfuron-metile, imazamox, bentazone e glifosate (Fig. 2). Le 5 popolazioni sospette resistenti 16-43, 16-44a, 16-44b, 16-48 e 16-49 hanno mostrato una % di sopravvivenza al tifensulfuron alla dose 1x che oscillava tra il 54 ed il 100% e con una % di biomassa (VEB) tra l'80 e 100% (Fig. 2). Valori simili sono stati registrati alla dose 3x. Anche il trattamento con imazamox ha mostrato una sopravvivenza tra il 45 ed il 93 % ed una stima visiva della biomassa compresa tra 60 e 95%. La risposta alla dose 3x di imazamox ha registrato valori molti simili o sensibilmente inferiori rispetto alla dose di campo. Al contrario tutte le popolazioni sono state pienamente controllate dal bentazone e dal glifosate alla dose di campo.

Figure 2- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 6 popolazioni di amaranto dopo 4 settimane dal trattamento erbicida. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

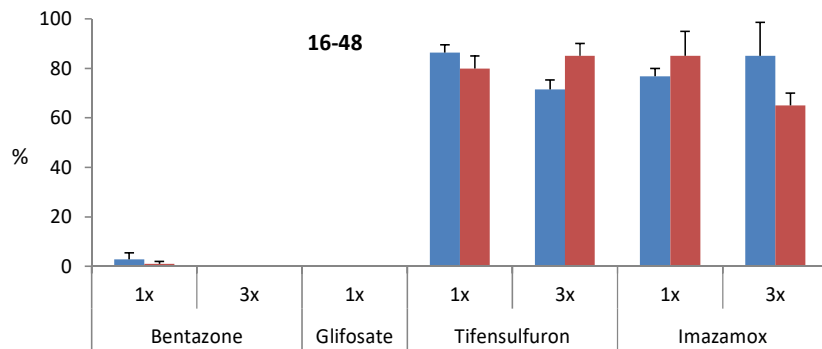




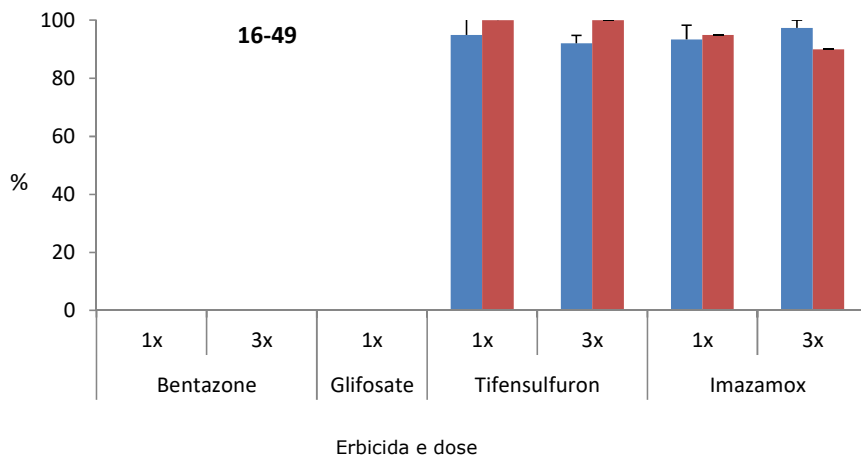
Erbicida e dose



Erbicida e dose



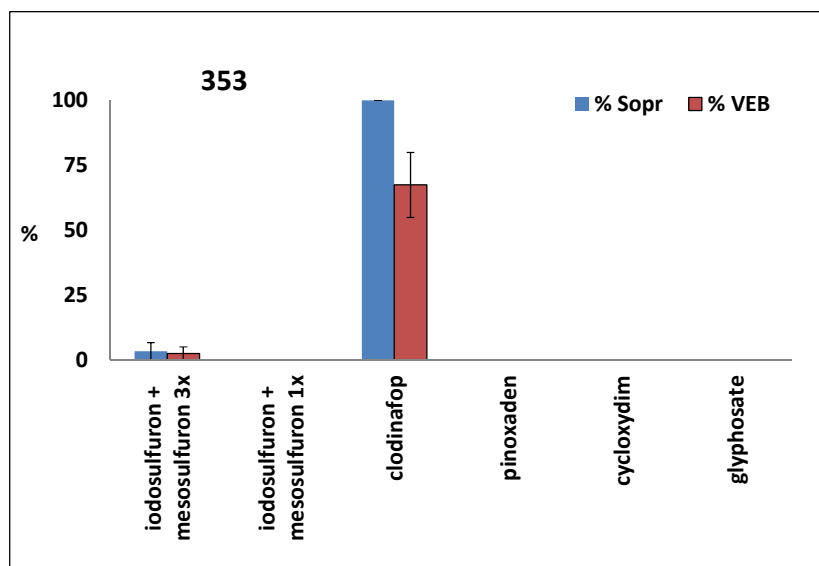
Erbicida e dose

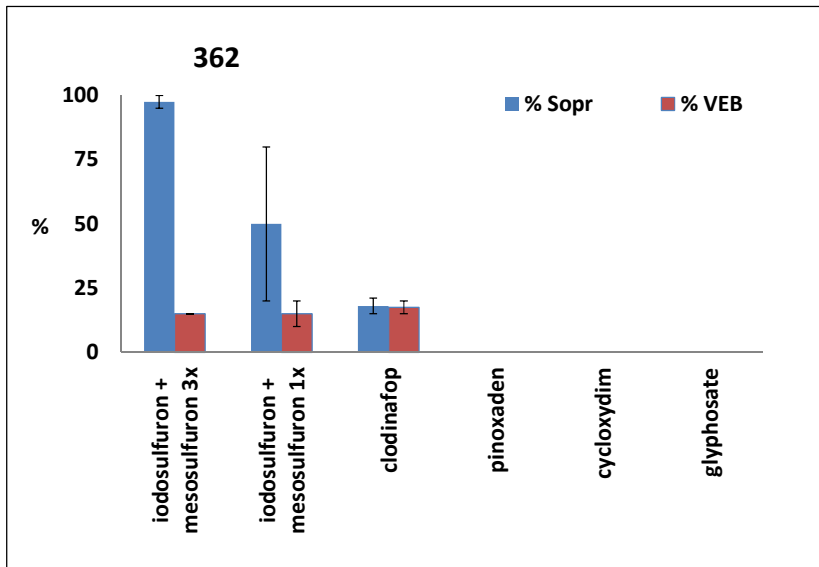


Avena

La popolazione 353 è risultata altamente resistente al clodinafop (Topik) mentre è stata controllata dal cicloxydim (Stratos Ultra) e dal pinoxaden (Axial pronto), tre erbicidi appartenenti agli inibitori dell'acetil coenzima A carbossilasi (ACCasi). Gli altri due erbicidi testati, glifosate (inibitore dell'EPSP) e la miscela mesosulfuron + iodosulfuron (Atlantis wg, inibitore dell'ALS) hanno pienamente controllato questa popolazione di avena. La seconda popolazione testata (362) ha mostrato un'elevata % di sopravvivenza al mesosulfuron + iodosulfuron (98% alla dose di campo e 50 % alla dose 3x) ma le piante sopravvissute presentavano una biomassa molto ridotta, compresa tra il 15-20% rispetto alle piante non trattate. Il 18% delle piante di questa popolazione sono sopravvissute anche al clodinafop con una % VEB molto ridotta (18%).

Figure 3- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 2 popolazioni di Avena dopo 4 settimane dal trattamento erbicida. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.



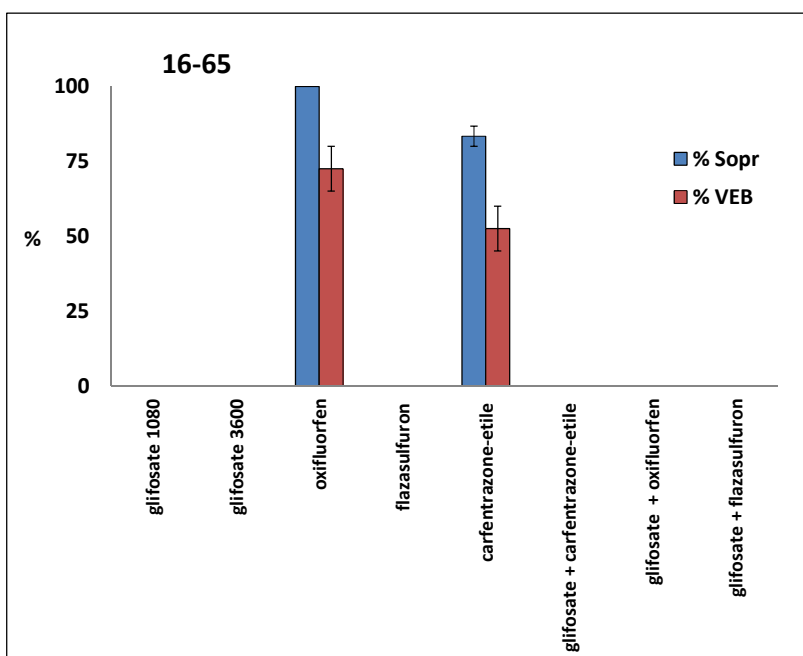


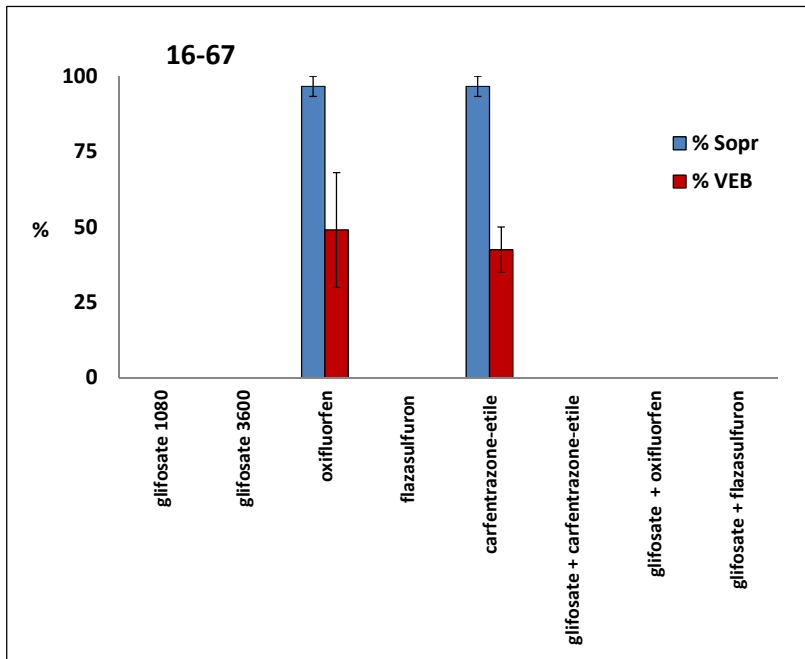
Conyza

I risultati mostrano che la popolazione suscettibile di *Conyza* (11-9) è stata pienamente controllata dal glifosate, dal flazasulfuron (Chikara) e dalle 3 miscele erbicida testate. Al contrario il controllo ottenuto con l'applicazione dei soli carfentrazone-etile (Spotlight) e dal oxifluorfen (Goal 480) non è stato soddisfacente (Fig.4). Questo risultato era comunque prevedibile dato che per i due principi attivi viene consigliato solamente l'uso in miscela con altri erbicidi di post-emergenza per il controllo di *Conyza*.

Le 2 popolazioni sospette resistenti hanno mostrato un pattern di risposta ai trattamenti erbicidi uguale alla popolazione suscettibile. Sono state pienamente controllate dal glifosate e dal flazasulfuron mentre la maggior parte delle piante sono sopravvissute al carfentrazone, 83% di sopravvivenza per la popolazione 16-65 e 97% per la popolazione 16-67 ed avevano una biomassa ridotta (VEB=53% per la popolazione 16-65 e 43% per la popolazione 16-67) (Fig. 4). Una risposta simile è stata osservata con l'oxifluorfen dove la % di sopravvivenza è risultata pari a 100% per la 16-65 e 97% per la 16-67 con biomassa del 73 e 49% rispettivamente. L'impiego di questi ultimi 2 erbicidi in miscele con il glifosate ha consentito di ottenere un pieno controllo delle piante di *Conyza* in queste 2 popolazioni.

Figure 4- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 3 popolazioni di *Conyza* testate dopo 4 settimane dal trattamento erbicida. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.





CONCLUSIONI

Durante questo primo periodo di attività sono state individuate e confermate resistenti agli erbicidi diverse specie di infestanti. La popolazione di giavone 16-324 è risultata altamente resistente agli erbicidi appartenenti agli inibitori dell'ALS (imazamox e nicosulfuron). Anche se nel corso degli anni sono state eseguite delle rotazioni colturali ciò non ha portato a nessun beneficio in termine di prevenzione dell'insorgenza della resistenza in quanto sono stati impiegati quasi ogni anno erbicidi inibitori dell'ALS in mais, pisello, soia e pomodoro. I risultati indicano che è necessario procedere non solo ad una rotazione colturale ma anche ad una rotazione di erbicidi con un diverso meccanismo d'azione per limitare l'evolversi della resistenza.

La seconda popolazione di giavone (16-325) è risultata resistente agli erbicidi inibitori delle ACCasi. Anche in questo caso sono stati impiegati per molti anni sia in soia che in riso erbicidi appartenente alla medesimo gruppo di erbicidi portando così alla selezione di piante resistenti.

Tra le popolazioni di *Amaranthus* spp raccolte nei campi di soia sono state identificate 2 diverse specie, *A. retroflexus* ed *A. tuberculatus* (solo la popolazione 16-48). Tutte le popolazioni testate sono risultate resistenti agli erbicidi inibitori dell'ALS testati, imazamox e tifensulfuron-metile. Mentre sono state tutte controllate dal bentazone e dal glifosate. Questi 2 erbicidi costituiscono pertanto una buona alternativa per il controllo di ambedue le specie di amaranto identificate. Tuttavia, il trattamento con bentazone necessita di essere eseguito in post-emergenza precoce quando le piantine hanno raggiunto uno stadio di crescita di 4-6 foglie. Trattamenti più tardivi rischiano di non essere così efficaci.

Dalle storie di campo degli appezzamenti dove sono state raccolte le popolazioni di amaranti emerge che l'impiego di questi erbicidi, ed in particolare tifensulfuron-metile ed imazamox, avviene ogni anno con 1 o 2 trattamenti all'anno. La pressione di selezione esercitata da questi erbicidi è pertanto costante e ripetuta nel tempo. Anche se si fanno rotazioni colturali si impiegano erbicidi con il medesimo meccanismo d'azione. Nella rotazione pomodoro/soia (Tab. 1, pop 16-43) sono impiegati erbicidi aventi un medesimo meccanismo di resistenza (rimsulfuron in pomodoro ed imazamox e tifensulfuron in soia). Anche nelle rotazione soia/pisello si impiegano erbicidi chimicamente simili (vedi Tab. 1). La rotazione colturale è una pratica agronomica consigliata per limitare l'insorgenza delle resistenza ma essa è priva di efficacia se non si ruotano anche gli erbicidi che si impiegano.

Una popolazione di *Avena* (353) è risultata molto resistente al clodinafop mentre l'altra (362) evidenzia una perdita di suscettibilità sia all'inibitore dell'ALS (meso + iodosulfuron) che all'inibitore dell'ACCasi (clodinafop). Quest'ultima popolazione potrebbe essere in evoluzione verso una resistenza multipla; al momento le piantine sopravvissute hanno una biomassa piuttosto ridotta, indicazione di una fase ancora iniziale dell'evoluzione della resistenza all'erbicida, e non sono molto competitive con la coltura. Comunque è importante in questo caso adottare delle specifiche strategie, utilizzando erbicidi ancora efficaci su questa popolazione, o altre pratiche agronomiche per mantenere un livello elevato di controllo in campo e minimizzare il rischio di ulteriore evoluzione di resistenza agli erbicidi.

Non è stata confermata la resistenza al glifosate nelle due popolazioni di *Conyza* testate, quindi lo scarso controllo osservato in campo è probabilmente dovuto ad altri fattori quali l'epoca di trattamento non idonea (piante ormai troppo grandi) oppure l'utilizzo di una dose ridotta di erbicida. Considerando gli altri erbicidi testati, il flazasulfuron può rappresentare un principio attivo valido per il controllo della *Conyza* nelle colture arboree, però è noto che la sua efficacia è limitata ad applicazioni di pre-emergenza o con piante ad uno stadio iniziale di sviluppo. Riveste quindi un'importanza elevata la scelta del momento adeguato del trattamento da decidere in base alla dimensione delle piante infestanti. Per quanto riguarda gli altri due principi attivi testati, carfentrazione-etile e dal oxifluorfen, i risultati di questa prova hanno confermato la loro ridotta efficacia se usati da soli per il controllo di *Conyza* in post-emergenza, mentre possono essere utili partner per il glifosate aumentandone l'efficacia in presenza di popolazioni di *Conyza* resistenti.

Nel corso del secondo anno, si continuerà il campionamento di infestanti sospette resistenti nei diversi sistemi colturali e si verificherà il pattern di resistenza tramite biosaggio. Tramite la raccolta delle informazioni storiche nelle aziende dove si sono verificati i casi di resistenza, si analizzerà quale siano state le gestioni agronomiche pregresse. Questo consentirà di preparare delle specifiche strategie di gestione atte a migliorare la gestione ed a limitare la diffusione e sviluppo di popolazioni di infestanti resistenti.

ANNO 2 E 3

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel corso del 2017 e 2018 sono proseguiti i campionamenti di infestanti, a giugno per le infestanti delle colture autunno-vernine e settembre per le colture estive. I siti di campionamento sono stati individuati sulla base di segnalazioni di scarso controllo delle infestanti da parte degli agricoltori e sono stati eseguiti da Terremerse e Cereali Padenna. Complessivamente sono stati raccolti 69 campioni, 7 popolazioni di *Alopecurus myosuroides* raccolte in frumento, 11 popolazioni di *Amaranthus* spp. raccolte in soia, 16 popolazioni di *Avena* in frumento, 10 popolazioni di *Conyza* spp. raccolte principalmente in vigneto ma anche in frutteti, 1 popolazione di *Echinochloa crus-galli* raccolta in mais, 6 popolazione di *Lolium* spp. in frumento e 18 popolazioni di *Papaver rhoeas* in frumento (Tabella 1 e 2). Parallelamente si sono acquisite le informazioni storiche sui trattamenti erbicidi fatti nei siti campionati.

I campioni di semi raccolti sono stati puliti e mantenuti a 4°C fino al momento del loro utilizzo.

Tabella 1 Campioni di infestanti raccolte nel 2017 con relative informazioni storiche

Genere	Specie	Codice	Comune e frazione	Coltura in atto	Informazioni storiche
ALO	MYO	02L			Check suscettibile CNR
ALO	MYO	17-12	Ravenna (RA)	frumento	2017: clodinafop, 2015: fenoxaprop
ALO	MYO	17-13	Ravenna (RA)	frumento	2017 e 2016: clodinafop
ALO	MYO	17-16	Faenza (RA)	frumento	2017: clodinafop. 2016 propaquizafop e cicloxdim. 2015: clodinafop
AMA	HY	11-01			Check suscettibile CNR
AMA	RE	17-74	Argenta (FE) fraz. Longastrino	Soia/pisello	2017: bentazone+imazamox (2 volte) e aclonifen + pendimetalin; 2016: mais tembotrione,dicamba + prosulfuron; 2015: pomodoro rimsulfuron + mesozin (3 volte)
AMA	RE	17-75	Alfonsine (RA) fraz. Longastrino	Soia/ pomodoro	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: pomodoro pendimetalin + oxadiazon + metribuzin e rimsulfuron + metribuzin; 2015:

					frumento clodinafop + pinoxaden, florasulam
AMA	RE	17-76	Fiscaglia (FE)	soia	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: frumento clodinafop + florasulam + pinoxaden, MCPA; 2015: mais mesotrione + S-metolachlor + terbutilazina
AMA	SP	17-77	Ostellato (FE)	soia	2017: imazamox, tifensulfuron, cicloxidim; 2016: mais mesotrione + S-metolachlor + terbutilazina; 2015: pomodoro rimsulfuron, metribuzin
AMA	SP	17-78	Comacchio (FE)	soia	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: mais nicosulfuron, mesotrione, dicamba; 2015: soia imazamox, tifensulfuron, propaquizafop
AMA	SP	17-79	Lagosanto (FE)	soia	2017: imazamox, tifensulfuron, propaquizafop; 2016: frumento clodinafop + florasulam + pinoxaden; 2015: sorgo dicamba + prosulfuron, 2,4-D + MCPA
AMA	SP	17-80	Fiscaglia (FE)	soia	2017: bentazone + imazamox, tifensulfuron; 2016: frumento clodinafop + florasulam + pinoxaden, MCPA; 2015: mais mesotrione + S-metolachlor + terbutilazina
AVE		095L			Check suscettibile CNR
AVE		17-363	Budrio (BO)	frumento	2017 Clodinafop
AVE		17-364	Valsamoggia (BO)	frumento	2017: clodinafop + Atlantis
AVE		17-365	Russi (RA)	frumento	2017: clodinafop
CON		11-9			Check suscettibile glifosate CNR
CON		17-71	Ravenna (RA)	Vigneto	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
CON		17-72	Russi (RA)	Pescheto	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
CON		17-73	Lugo (RA)	Meleto	Glifosate 360 3L/ha 2 volte l'anno
ECH	CG	07-16L			Check suscettibile CNR
ECH	CG	17-334	Ostellato (FE)	mais	2017 e 2016: nicosulfuron, dicamba, mesotrione; 2015: soia imazamox, tifensulfuron, propaquizafop
LOL		204-L			Check suscettibile CNR
LOL		17-610	Bagnacavallo (RA)	frumento	2017: clodinafop
PAP	RH	11-36L			Check suscettibile CNR
PAP	RH	17-114	Ravenna fraz. Piangipane	grano	2017: tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: sorgo S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano iodosulfuron + mesosulfuron
PAP	RH	17-115	Ravenna fraz. San Marco	grano	2017: tribenuron-metile, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: mais

					isoxaflutole, thiencarbazono; 2015: grano tribenuron, clodinafop
PAP	RH	17-116	Faenza (RA)	grano	2017: tribenuron; 2016: sorgo: S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano tribenuron
PAP	RH	17-117	Ravenna fraz. San Alberto	grano	2017: tribenuron; 2016 e 2015: grano/fagiolino tribenuron/imazamox, bentazone
PAP	RH	17-118	Ravenna fraz. Mandriole	grano	2017: tribenuron, iodo + mesosulfuron; 2016: mais S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano tribenuron, clodinafop
PAP	RH	17-119	Ravenna fraz. Mezzano	grano	2017: tribenuron; 2016: soia flufenacet + metribuzin, pendimetalin; 2015: grano tribenuron
PAP	RH	17-120	Ravenna fraz. S.Alberto	grano	2017: tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: girasole aclonifen, pendimetalin; 2015: grano tribenuron
PAP	RH	17-121	Ravenna fraz. San Bartolo	grano	2017: tribenuron, clodinafop; 2016: mais S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano/ fagiolino tribenuron, clodinafop/imazamox, bentazone
PAP	RH	17-122	Forli (FC) fraz. Villanova	grano	2017: tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron; 2016: sorgo S-metolachlor, terbutilazina; 2015: grano tribenuron, iodosulfuron + mesosulfuron

Tabella 2 Campioni di infestanti raccolte nel 2018 con relative informazioni storiche

Genere	Specie	Codice	Comune e frazione	Coltura in atto	Informazioni storiche
ALO	MYO	18-17	Ravenna Fornace Zarattini	frumento	2018 tenero Traxos one, 2017 Girasole, 2016 Frumento Traxos one, 2015 Mais
ALO	MYO	18-18	Ravenna San Zaccaria	frumento	2018 tenero Traxos one, 2017 cicoria da seme Pirat, 2016 Sorgo, 2015 Frumento Traxos one
ALO	MYO	18-19	Ravenna Osteria	frumento	2018 tenero Traxos one, 2017 colza Sultan, 2016 frumento Traxos one, 2015 girasole
ALO	MYO	18-20	Ravenna	frumento	2018 tenero Topik 240 ec + granstar Ultra, 2017 Mais, 2016 grano Topik + granstar
AMA	SP	18-101	Argenta (FE)	soia	Pisello/soia 2° raccolto; rotazione mais /pomodoro. Terreno organico
AMA	SP	18-102	Argenta (FE)	soia	Tuareg, Harmony; rotazione soia/frumento

AMA	SP	18-103	Codigoro (FE)	soia	Corum; soia/mais/pomodoro
AMA	SP	18-104	Codigoro (FE) Fraz. Ponte Maodino	soia	Corum; soia/pomodoro/frumento
AVE		18-375	Ferrara	frumento	2018 duro clodinafop 60 g ai/ha, 2017 barbabietola, 2016 mais
AVE		18-376	Copparo (FE)	frumento	2018 tenero clodinafop 60 g ai/ha, 2017 duro clodinafop+pinoxaden poi clodinafop, 2016 tenero clodinafop
AVE		18-377	Formignana (FE)	frumento	2018 tenero clodinafop 60 g ai/ha, 2017 soia
AVE		18-378	Ravenna	frumento	2018 duro Traxos poi Axial pronto, 2017 Lino Leopard, 2016 frumento Traxos one
AVE		18-379	Ravenna	frumento	2018 duro Atlantis wg + Biathlon, 2017 Barbabietola, 2016, duro Atlantis wg + Biathlon
AVE		18-380	Ravenna	frumento	2018 duro Celio + biathlon, 2017 sorgo, 2016 duro Topik + granstar ultra
AVE		18-381	Ferrara	frumento	2018 duro Serrate+ Ariane II, 2017 soia, 2016 mais, 2015 frumento Topik
AVE		18-382	Ferrara	frumento	2018 tenero Avadex + Pressing 500 poi Buguis, 2017 soia, 2016 tenero Hussar maxx
AVE		18-383	Formignana (FE)	frumento	2018 tenero Buguis + Biathlon 4d, 2017 soia, 2016 grano Vip 240 + kicker, 2015 soia, 2014 grano Profelis + Starane gold, 2013 soia, 2012 bietole
AVE		18-384	Ravenna	frumento	2018 tenero Topik 240 + Biathlon, 2017 mais, 2016 grano Topik + Granstar ultra, 2015 sorgo, 2014 grano Topik + Granstar ultra
AVE		18-385	Ravenna	frumento	2018 duro Topik 240 + Granstar ultra, 2017 pisello Stomp + Challenge, 2016 grano Topik + Granstar ultra, 2015 mais, 2014 grano Topik + Gran star ultra
AVE		18-386	Ravenna	frumento	2018 duro Topik 240+granstar ultra, 2017 sorgo, 2016 grano Topik + Granstar ultra, 2015 sorgo, 2014 Grano Topik + Granstar ultra
AVE		18-387	Russi (RA)	frumento	2018 duro Topik 240 + Elegant, 2017 sorgo, 2016 grano Topik, 2015 sorgo, 2014 Topik +Elegant
CON		18-76	Lugo (RA) Fraz. Santa Maria in Fabriago	Vigneto	glyphosate in primavera 2 volte (1440 g ae/ha a volta)
CON		18-77	Brisighella (RA) Fraz.Fognano	Vigneto	Glyphosate in primavera 1 volta (1440 g ae/ha)
CON		18-78	Argenta (RA) Fraz. Longastrino	Vigneto	Glyfosate 3 L/ha 2 volte a stagione
CON		18-79	Brisighella (RA) Fraz. Fognano	Vigneto	Glyphosate (1440 g ae/ha) 3 volte a stagione
CON		18-80	Argenta	Vigneto	Lenns (glifo + diflufenican) 5 L/ha marzo, Touchdown (glifo) 4 L/ha +

					Evolution (pyraflufen) 0,8 L/ha Aprile. Anni precedenti glifo 3 L/ha per 2 volte
CON		18-81	Ravenna Fraz. Fusignano	Vigneto	Glyphosate 6 L/ha, anni precedenti glyphosate 3 L/ha per 2 volte
CON		18-82	Ravenna Fraz. Lido di Dante	Vigneto	Glyphosate 3 L/ha x 2 volte poi Evolution (pyraflufen) 0,8 L/ha per 2 volte, 2017 Glyphosate 3 L/ha per 2 volte più Evolution 1 volta, 2016 Glyphosate 3 L/ha per 2 volte più Spotlight (Carfentrazone) 1 L/ha per 1 volta
LOL		18-624	Ravenna	frumento	2018 tenero Traxos one, 2017 Barbabetola, 2016 frumento Trace, 2015 Sorgo
LOL		18-625	Ravenna San Romualdo	frumento	2018 duro Traxos one, 2017 mais, 2016 pomodoro, 2015 frumento Granstar Ultra sx
LOL		18-626	Ravenna San Pietro in Vincoli	frumento	2018 duro Traxos one poi Axial pronto, 2017 Lino Leopard, 2016 frumento Traxos one
LOL		18-627	Ravenna Bassette	frumento	2018 Tenero Traxos one, 2017-15 medica leopard
LOL		18-628	Russi (RA)	frumento	2018 duro Traxos one, 2017 pisello industria stomp+challenge, 2016 duro Atlantis wg + Granstar ultra
PAP	RH	18-124	Ravenna loc. San Marco	grano	Rotazione grano/sorgo/grano 2018:tribenuron-metile + tifensulfuron-metile; 2017: S- metolachlor + terbutilazina; 2016: tribenuron-metile
PAP	RH	18-125	Russi (RA) fraz. Godo	grano	Rotazione grano/sorgo 2018: florasulam + tritosulfuron, tribenuron-metile + tifensulfuron- metile; 2017: S-metolachlor + terbutilazina
PAP	RH	18-126	Ravenna Fraz. Coccolia	grano	Rotazione grano/mais 2018:florasulam + tritosulfuron, clodinafop; 2017: isoxaflutolo e S- metolachlor + terbutilazina
PAP	RH	18-127	Ravenna Fraz. filetto	grano	Rotazione grano/cece 2018: florasulam + tritosulfuron, meso + iodossulfuron; 2017: pendimetalin + aclonifen
PAP	RH	18-128	Ravenna fraz. Piangipane	grano	Rotazione grano/sorgo 2018:florasulam + tritosulfuron, clodinafop; 2017: S-metolachlor + terbutilazina
PAP	RH	18-129	Lugo (RA)	grano	Rotazione grano/mais 2018: florasulam + tritosulfuron; 2017: isoxaflutolo + thien carbazone- metile
PAP	RH	18-130	Russi (RA)	grano	Rotazione grano/sorgo/grano

			Fraz. San Pancrazio		2018:florasulam + tritosulfuron; 2017: S-metolachlor + terbutilazina; 2016:tribenuron-metile
PAP	RH	18-131	Ravenna fraz. Piangipane	grano	Rotazione grano/sorgo/grano 2018: florasulam + tritosulfuron; 2017: terbutilazina + pendimetalin; 2016: tribenuron-metile
PAP	RH	18-132	Forli (FC) fraz. Pievequinta	grano	Rotazione grano/mais 2018: tribenuron-metile + tifensulfuron-metile; 2017: S- metolachlor + terbutilazina; 2016: tribenuron-metile

Biosaggio

Per ogni specie di infestante è stato impiegato uno specifico protocollo per interrompere la dormienza dei semi e farli germinare.

Alopecurus myosuroides, Avena sp. e Lolium sp.: i semi sono stati seminati su torba in scatole di germinazione e poi vernalizzati per 3 giorni a 4°C e poi posti in germinatoio alle seguenti condizioni: 12 ore di luce a 25°C e 12 ore di buio a 15°C. Dopo 5-6 giorni, i semi germinati sono stati trapiantati in vaschette e le piantine sono state trattate allo stadio di 2-4 vere foglie con gli erbicidi riportati in tabella 3 alle dosi 1x e 3x per Atlantis wg e Axial pronto e solo 1x per gli altri erbicidi. Due repliche di 20 piantine sono state incluse per ogni popolazione e erbicida. Il rilievo per l'efficacia dell'erbicida è stato eseguito dopo 4 settimane dal trattamento.

Tabella 3-Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento di *Alopecurus myosuroides, Avena sp.* e *Lolium sp.*

Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose 1x)	Bagnante
cicloxdim (Stratos ultra)	2 L/ha	200 g/ha	—
pinoxaden (Axial pronto)	0,75 L/ha	45 g/ha	—
iodosulfuron + mesosulfuron (Atlantis WG)	500 g/ha	3g/ha iodo+ 15 g/ha mesosulfuron	Biopower 1L/ha
glifosate (Roundup platinum)	1,5 L/ha	720 g/ha	—
clodinafop (Topik)	0,25 L/ha	60 g/ha	—

Amaranthus spp.: I semi di amaranto sono stati seminati direttamente in scatole di germinazione contenente un substrato di agar 0.6 % e quindi posti in germinatoio alle seguenti condizioni: 12 ore di luce a 26°C e 12 ore di buio a 15°C. Dopo 5-6 giorni, i semi germinati sono stati trapiantati in vaschette di plastica (325 x 265 x 95 mm) contenenti un miscuglio di 60% terra, 15% sabbia, 15% perlite e 10% torba. Due repliche di 15-20 piantine allo stadio di 2-4 foglie sono state trattate con gli erbicidi riportati in tabella 4 alle dosi 1x e 3x. Il rilievo è stato eseguito dopo 4 settimane.

Tabella 4-Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento degli amaranti

Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose 1x)	Bagnante
tifensulfuron-metile (Harmony)	10 g/ha	7.5 g /ha	Trend 90 0.1%
imazamox (Altorex)	1L/ha	40 g/ha	—
bentazone (Basagran SG)	1 Kg/ha	403 g/ha	Dash 0,3 %
glifosate (Roundup platinum)	3 L/ha	1440 g/ha	—

Conyza: I semi di *Conyza* sono stati seminati su torba in scatole di germinazione e posti direttamente a germinare in germinatoio alle seguenti condizioni: 12 ore di luce a 26 °C e 12 ore di buio a 15 °C. Dopo 15 giorni, i semi germinati sono stati trapiantati in vaschette come descritto in precedenza. Due repliche di 15 piantine sono state incluse per ogni popolazione e erbicida. Le piantine sono state trattate allo stadio di rosetta con 5-8 vere foglie con gli erbicidi riportati in tabella 5. Tutti gli erbicidi sono stati utilizzati alla sola dose 1x tranne il glifosate per cui sono state testate due dosi (1080 g ae/ha e 3600 g ae/ha) per valutare l'eventuale livello di resistenza delle popolazioni testate. Il rilievo per l'efficacia dell'erbicida è stato eseguito dopo 4 settimane dal trattamento.

Tabella 5 - Erbicidi impiegati in questo progetto per il trattamento della *Conyza*

Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose1x)	Bagnante
glifosate (Roundup power 2.0)	3 L/ha	1080 g/ha	—
flazasulfuron (Chikara)	160 g/ha	40 g/ha	Adigor 1L/ha
glifosate + flazasulfuron (Roundup power 2.0 + Chikara)	3 L/ha + 80 g/ha	1080 g/ha glifo + 20 g/ha flazasulfuron	Adigor 1L/ha

Echinochloa crus-galli: i semi di giavone sono stati scarificati in acido solforico 96% per 20 minuti, quindi seminati in torba umida e messi in germinatoio a 16/26 °C (notte/giorno) per 6 giorni. I semi germinati sono stati poi trapiantati in vaschette di plastica (325 x 265 x 95 mm) contenenti un miscuglio di 60% terra, 15% sabbia, 15% perlite e 10% torba. Due repliche di 15-20 piantine allo stadio di 2-3 foglie sono state trattate con gli erbicidi riportati in tabella 6 alla dose di campo (1x) e 3 volte la dose di campo (3x). Nell'esperimento è stata inserita anche una popolazione di riferimento (07-16L) suscettibile a tutti gli erbicidi.

Tabella 6 - Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento dei giavoni

Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose 1x)	Bagnante
fluazifop (Fusilade Max)	2 L/ha	250 g/ha	—
imazamox (Beyond)	0,9 L/ha	36 g/ha	Dash 0,5%

nicosulfuron (Ghibli)	1,5 L/ha	60 g/ha	—
glifosate	1,7 L/ha	800 g/ha	—

Papaver rhoeas: i semi di papavero sono stati vernalizzati per 10 giorni a 4°C, poi sono stati messi in scatole di germinazione contenente un substrato di agar 0.6% e 0.2 % di KNO₃ e posti in germinatoio alle seguenti condizioni: 12 ore di luce a 24°C e 12 ore di buio a 14°C. Dopo 1 settimana, i semi germinati sono stati trapiantati in vaschette come descritto in precedenza e le piantine sono state trattate allo stadio di 2-4 vere foglie con gli erbicidi riportati in tabella 7 alla dose 1x e 3x. Il rilievo è stato eseguito dopo 4 settimane.

Tabella 7 - Erbicidi impiegati in post-emergenza per il trattamento dei papaveri

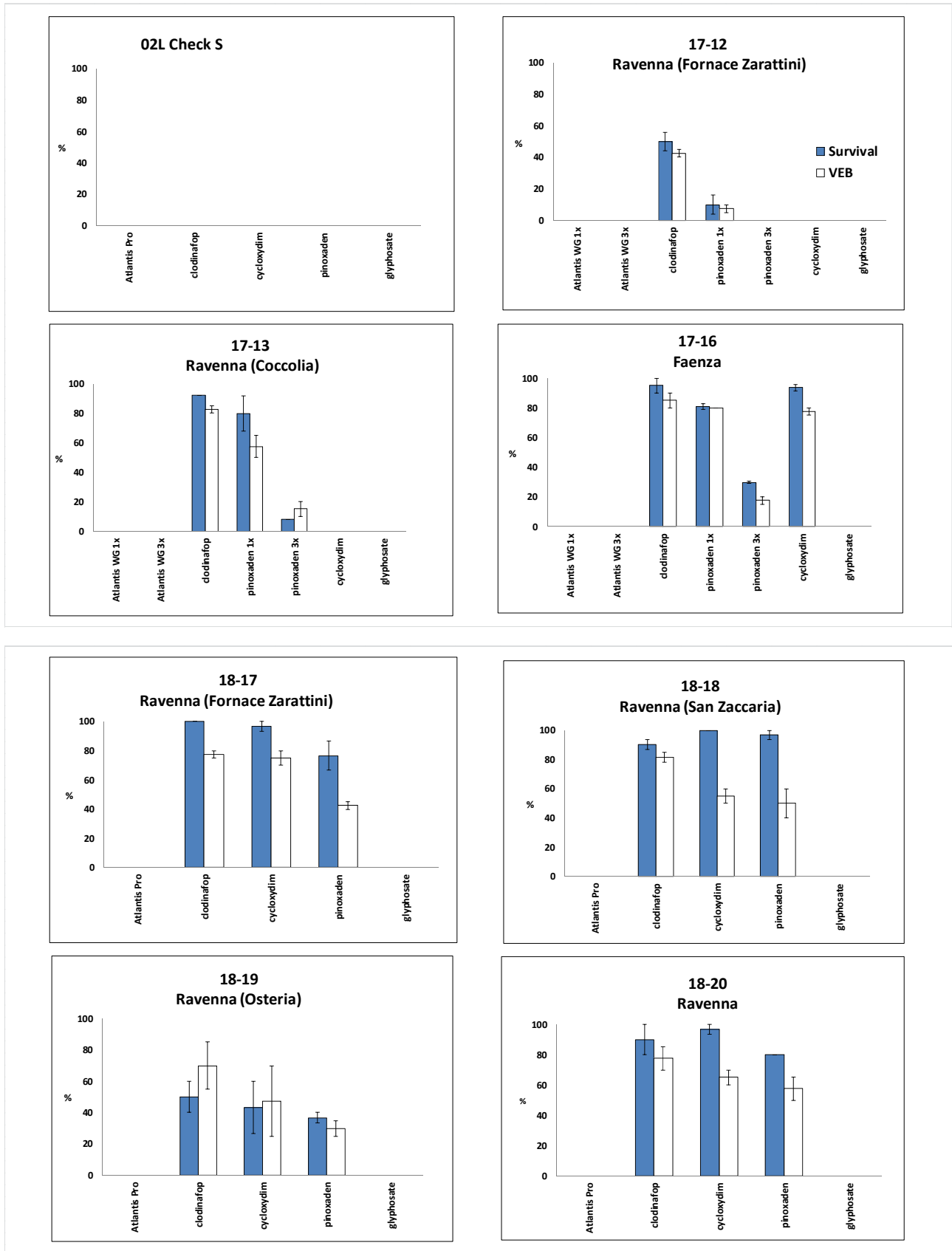
Principi attivi impiegati (nome commerciale)	Prodotto commerciale (dose 1x)	Principio attivo (dose 1x)	Bagnante
tribenuron-metile (Express SX)	20 g/ha	10 g /ha	Trend 90 0,1%
iodosulfuron + mesosulfuron (Hussar maxx)	0,25 Kg/ha	7,5 g iodosulfuron + 7,5 g mesosulfuron/ha	Biopower 1L/ha
florasulam (Primus WG)	25 g/ha	6,25 g/ha	—
2,4-D LV600	0,6 L/ha (campioni 2017) 1 L/ha (campioni 2018)	360 g p.a./ha 600 g/ha	—

RISULTATI

Alopecurus myosuroides

La popolazione 02L (Check S) è stata completamente controllata da tutti gli erbicidi utilizzati. Allo stesso modo, tutte le popolazioni testate sono state completamente controllate dalla miscela mesosulfuron + iodosulfuron (Atlantis WG o Pro, inibitore ALS) e da glifosate. Tutte le popolazioni testate hanno invece mostrato sopravvivenza ai vari erbicidi inibitori del ACCasi utilizzati (clodinafop, cycloxydim, pinoxaden) anche se con livelli e pattern di resistenza diversi. La popolazione 17-12 ha mostrato una resistenza intermedia a clodinafop ma non a pinoxaden e cycloxydim, la 17-13 è sopravvissuta a clodinafop e pinoxaden ma non a cycloxydim, mentre le altre (17-16, 18-17, 18-18, 18-20 e in modo minore la 18-19) sono risultate cross-resistenti ai tre inibitori del ACCasi testati.

Figure 1- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) riferiti al non trattato delle popolazioni di *Alopecurus myosuroides* ai vari erbicidi. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.



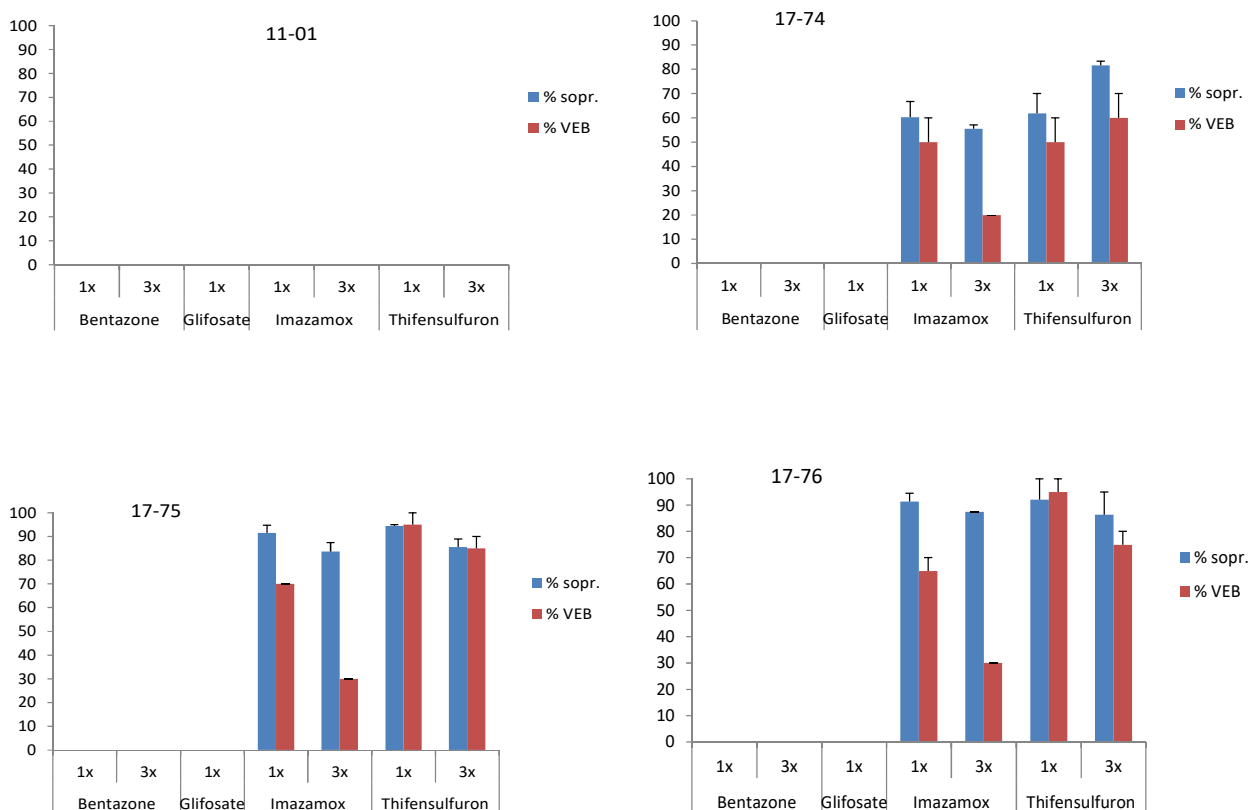
Amaranthus spp.:

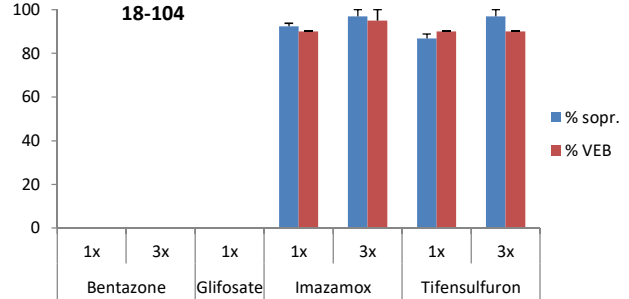
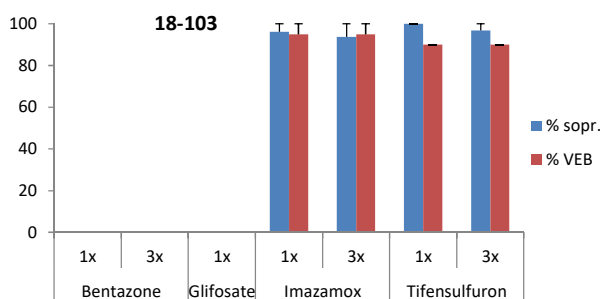
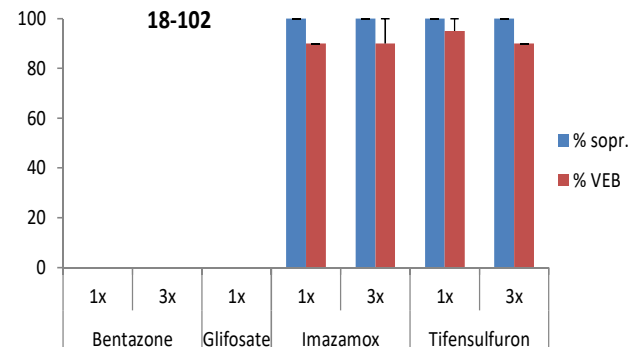
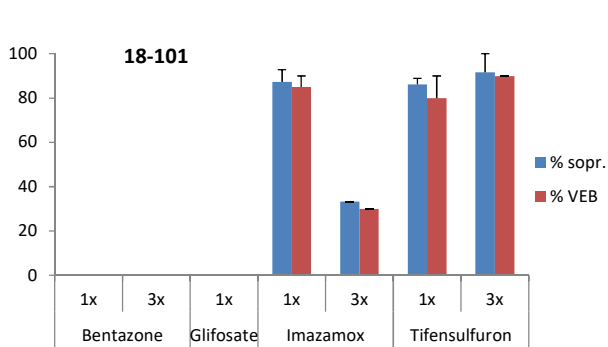
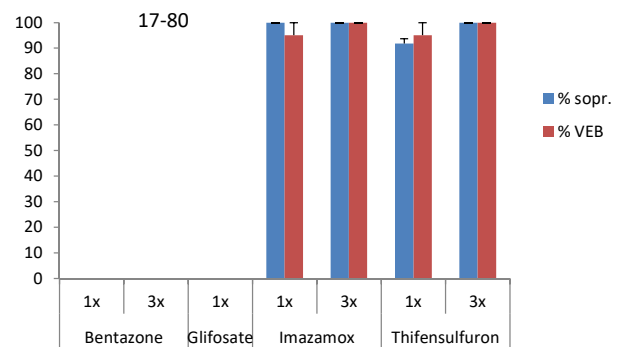
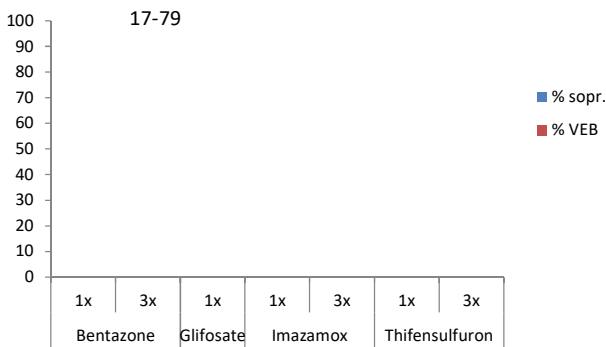
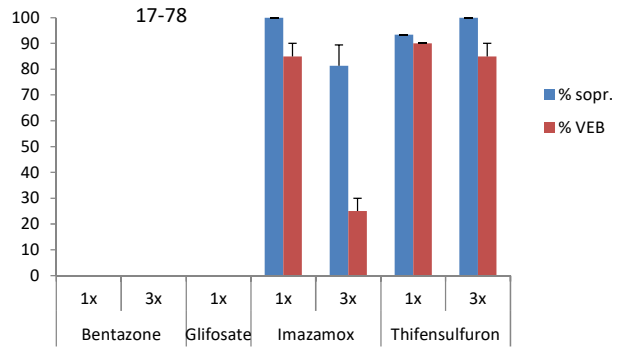
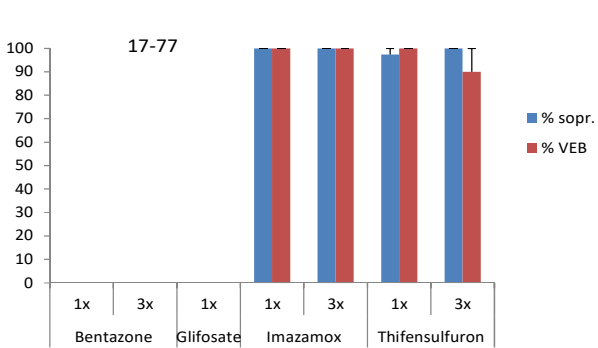
Nessuna pianta della popolazione di amaranto suscettibile 11-01 è sopravvissuta ai trattamenti con i 4 erbicidi testati: tifen sulfuron-metile, imazamox, bentazone e glifosate (Fig. 2). Dieci delle 11 popolazioni sospette resistenti sono risultate altamente resistenti al tifen sulfuron con % di sopravvivenza alla dose 1x compresa tra il 60-100% e con una % di biomassa (VEB) tra il 50 e 100 % (Fig. 2). Valori simili sono stati registrati alla dose 3x. Una sola popolazione, la 17-74, è risultata pienamente controllata dal tifen sulfuron-metile e suscettibile anche a tutti gli altri erbicidi testati.

Anche il trattamento con imazamox alla dose di campo ha mostrato una sopravvivenza delle piante compresa tra il 60 e 100 % ed una stima visiva della biomassa compresa tra il 50 e 100%. Alla dose maggiore testata (3x), la biomassa delle piante sopravvissute al trattamento è risultata piuttosto variabile tra le popolazioni, alcune avevano una VEB vicino al 100%, altre attorno al 20-30 %.

Tutte le popolazioni testate sono state pienamente controllate dal bentazone e dal glifosate alla dose di campo.

Figure 2- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 12 popolazioni di amaranto dopo 4 settimane dal trattamento erbicida. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

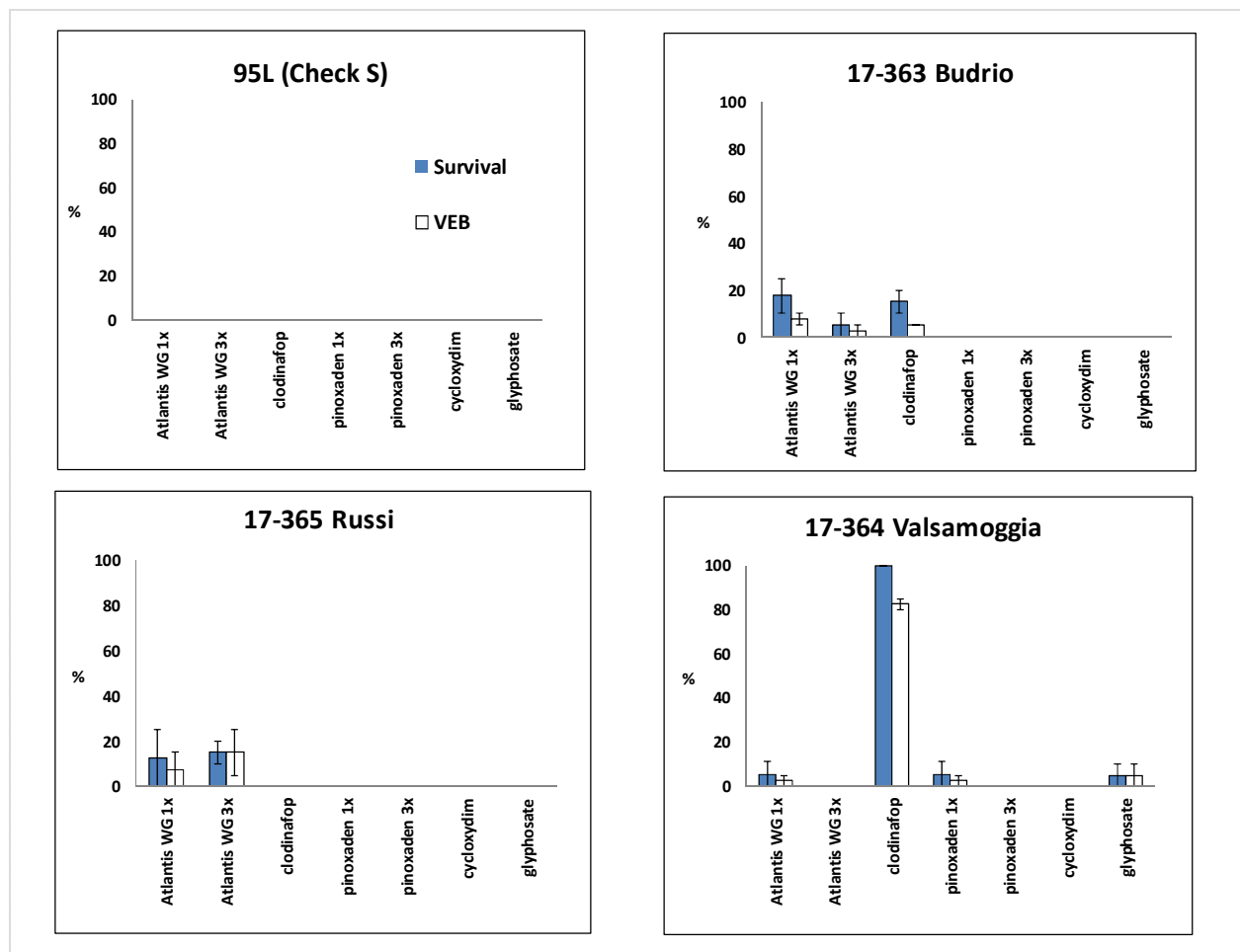




Avena

La popolazione suscettibile 95L è stata pienamente controllata dagli erbicidi testati. La popolazione 17-363 ha mostrato alcune piante sopravvissute sia alla miscela mesosulfuron + iodosulfuron (Atlantis Wg, inibitore dell'ALS) che al clodinafop (Topik, inibitore dell'ACCasi), mentre è stata pienamente controllata dagli altri erbicidi inibitori dell'ACCasi (pinoxaden e cycloxydim) e dal glifosate (Fig. 3). La popolazione 17-364 è risultata altamente resistente al clodinafop mentre è stata sostanzialmente controllata dagli altri erbicidi. La 17-365 ha mostrato una perdita di suscettibilità solo all'inibitore dell'ALS, Atlantis Wg, con alcune piante sopravvissute (Fig.3).

Figura 3- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 3 popolazioni di *Avena* campionate nel 2017 dopo 4 settimane dal trattamento erbicida. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.



I risultati delle popolazioni di *Avena* campionate nel 2018 sono riportati in Fig. 4 e 5. Si osserva che 5 popolazioni (18-376, 18-378, 18-382, 18-383 e in modo minore la 18-377) sono risultate altamente resistenti al clodinafop (Topik 240) e quindi sono da ritenersi resistenti agli ACCasi (fig.4).

Per quanto riguarda gli ALS, non sono stati individuati casi con elevato livello di resistenza, però è stata osservata una diffusa sopravvivenza (con percentuali massime intorno al 20-30%) al trattamento con Atlantis Pro anche alla dose 3x. Le popolazioni 18-375, 18-380, 18-381, 18-382 e 18-384 in particolare si trovano in una situazione intermedia del processo di evoluzione della resistenza che in pochi anni potrebbe sfociare in una resistenza conclamata.

Tutte le popolazioni del 2018 sono state pienamente controllate dal glyphosate alla dose di 720 g ae/ha, da pinoxaden (Axial Pronto) e da cycloxydim (Stratos ultra).

Figura 4 Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) riferiti al non trattato delle 13 popolazioni di Avena trattate con Topik 240. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

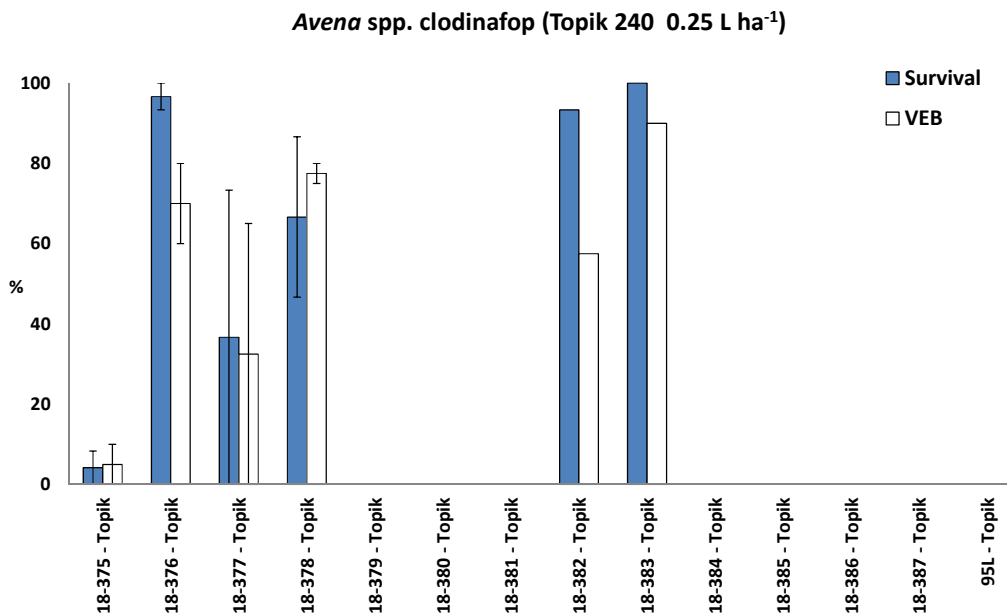
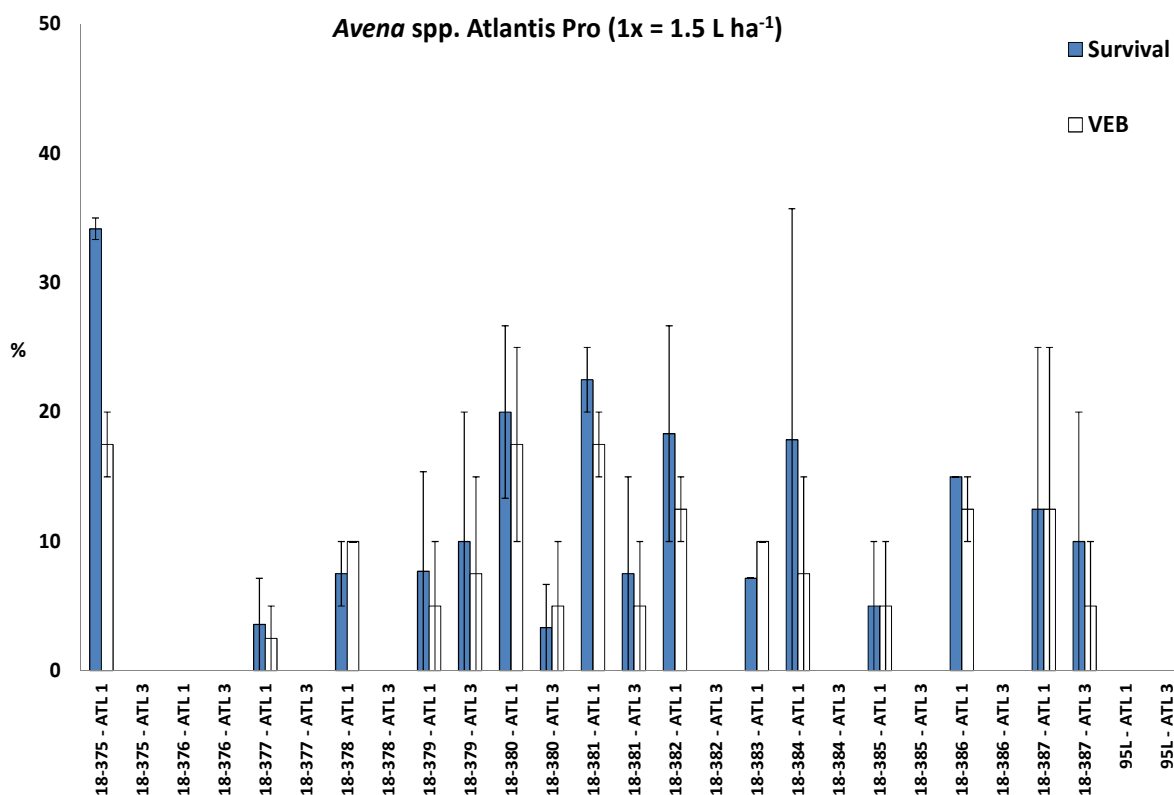


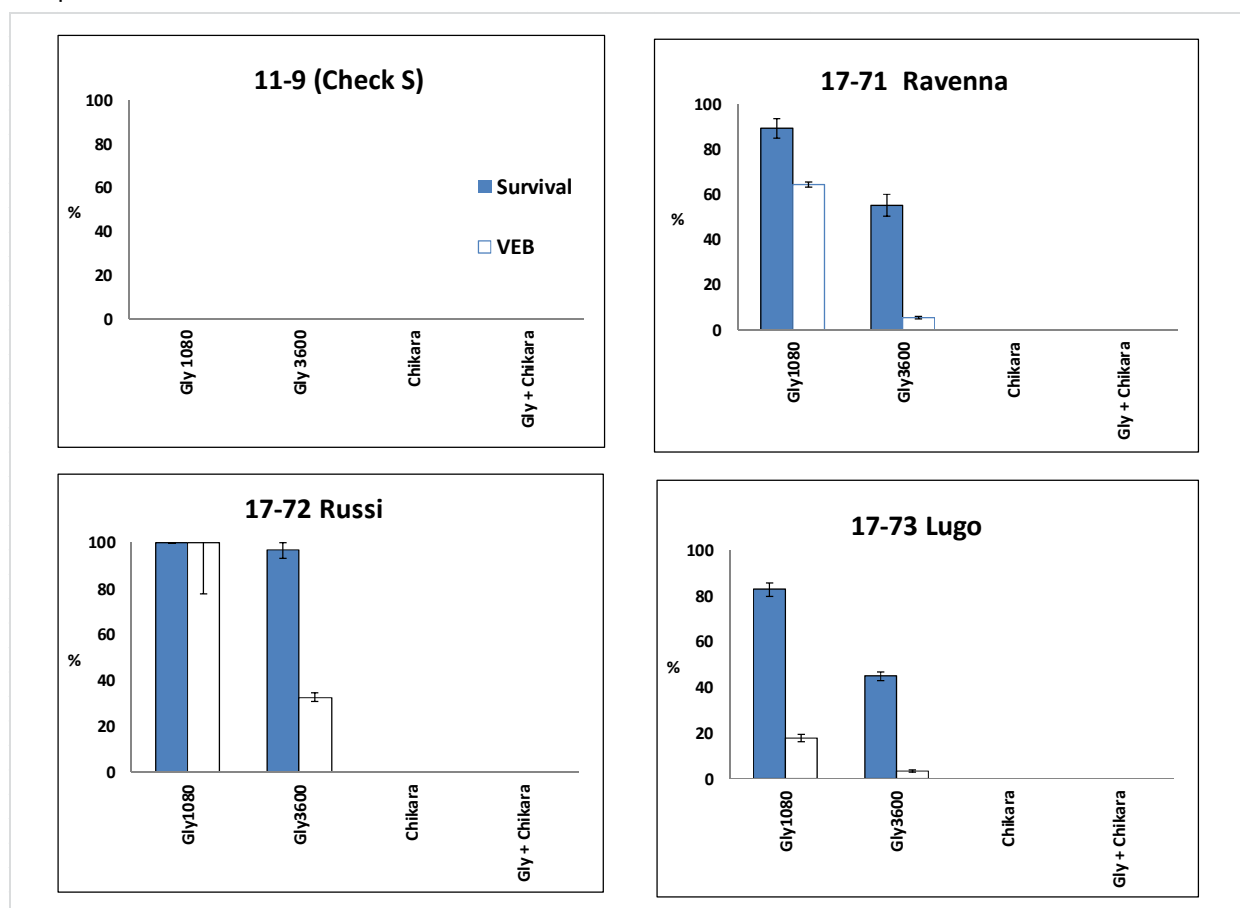
Figura 5 Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) riferiti al non trattato delle 13 popolazioni di Avena trattate con Atlantis Pro. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

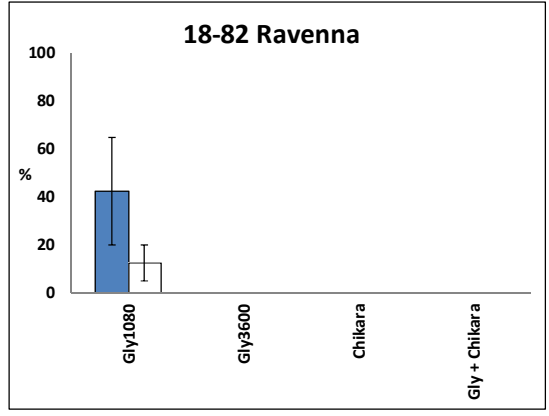
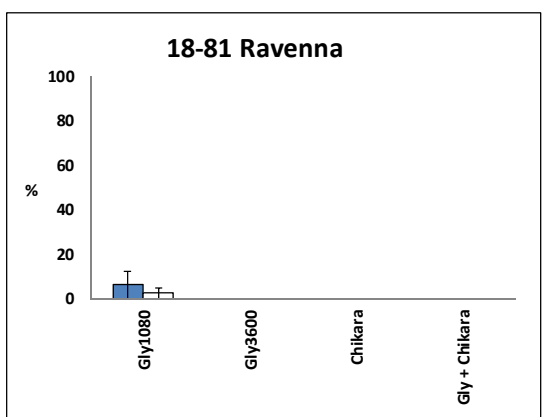
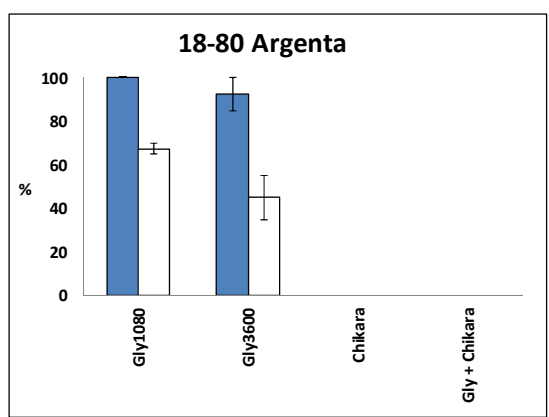
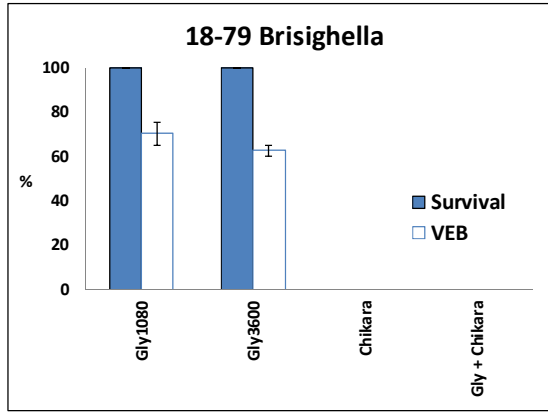
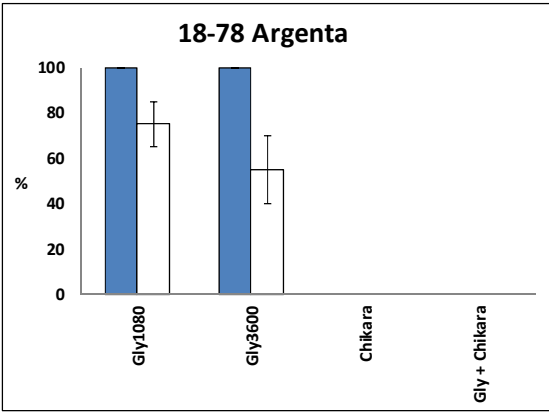
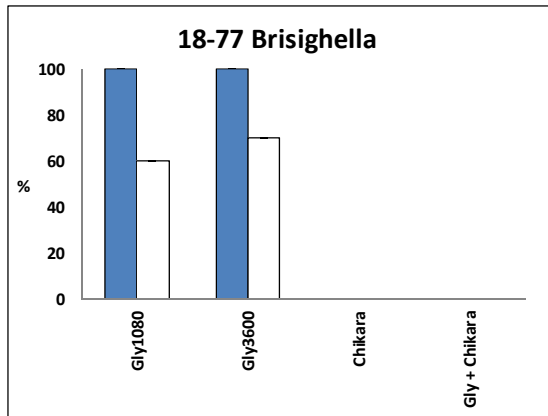
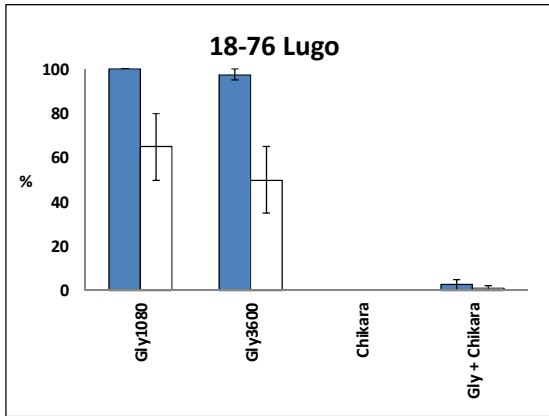


Conyza

La popolazione suscettibile 11-9 è stata controllata in modo ottimale da tutti gli erbicidi. Sette delle popolazioni testate (17-71, 17-72, 18-76, 18-77, 18-78, 18-79 e 18-80) sono caratterizzate da un livello elevato di resistenza a glifosate, mostrando una notevole sopravvivenza anche alla dose più alta (3600 g ae/ha). Altre due popolazioni (17-73 e in modo minore 18-82) hanno mostrato un livello di resistenza inferiore, in particolare la biomassa (VEB) delle piante sopravvissute ai trattamenti era molto ridotta. Infine, la 18-81 è da ritenersi suscettibile al glifosate. Il trattamento con flazasulfuron (Chikara) da solo o in miscela con glifosate ha sempre ottenuto un controllo ottimale, evidenziando che le popolazioni testate sono ancora suscettibili agli inibitori del ALS.

Figura 6 Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) riferiti al non trattato delle popolazioni di *Conyza* dopo 4 settimane dal trattamento erbicida. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

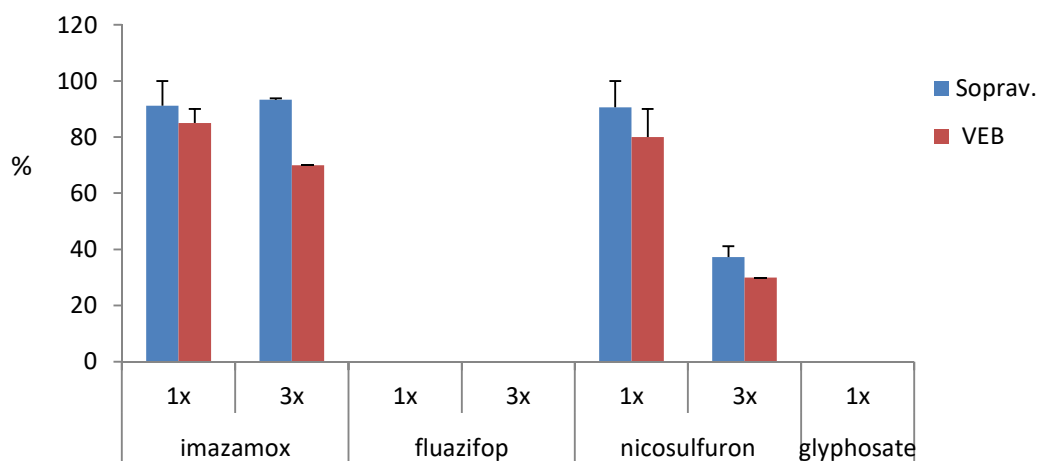




Echinochloa crus-galli

L'unica popolazione di giavone raccolta in mais è risultata altamente resistente ai 2 inibitori dell'ALS testati, imazamox e nicosulfuron (Ghibli). Mentre la popolazione è stata pienamente controllata dal glifosate alla dose di 800 g/ha e dal fluazifop alla dose di 250 g/ha (Fusilade Max, inibitore dell'ACCasi).

17-334



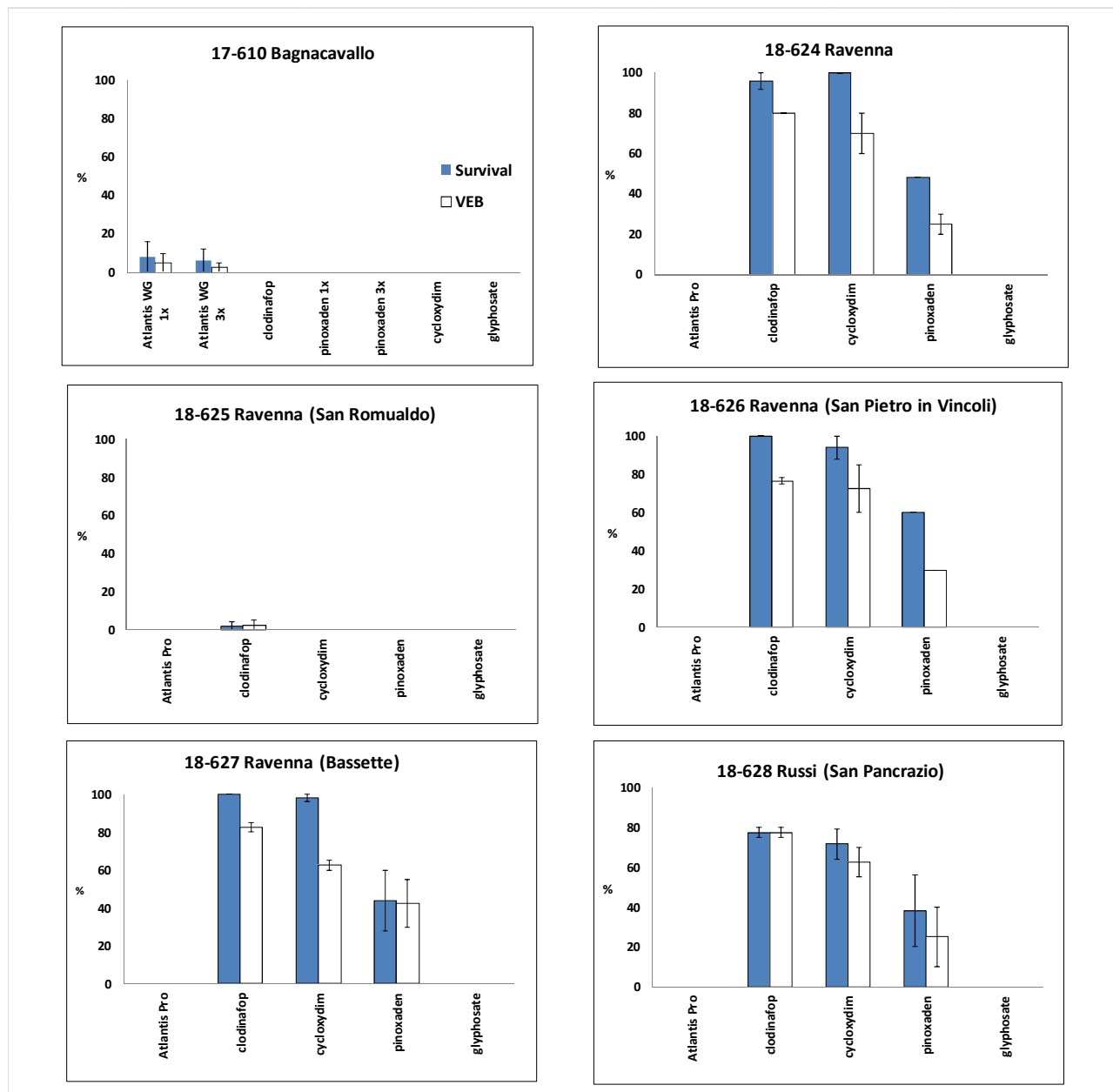
Lolium spp

La popolazione suscettibile di riferimento (204-L) è stata pienamente controllata da tutti gli erbicidi testati: clodinafop, pinoxaden e cycloxydim (inibitori dell'ACCasi), iodosulfuron + mesosulfuron-metile (Atlantis wg, inibitore dell'ALS) e glifosate (Fig.7).

La popolazione 17-610 è stata pienamente controllata da tutti gli erbicidi testati, solo alcune piante (< 10% delle piante trattate) sono sopravvissute al trattamento con Atlantis wg ad ambedue le dosi testate.

Delle 5 popolazioni di *Lolium* campionate nel 2018, quattro (18-624, 18-626, 18-627 e 18-628) sono risultate altamente resistenti al clodinafop e al cycloxydim con % di sopravvivenza comprese tra l' 80-100%, ed in modo minore anche al pinoxaden con % di sopravvivenza compresa tra il 35-55% (Fig.7). Queste 4 popolazioni resistenti agli inibitori dell'ACCasi sono state invece pienamente controllate dal glifosate alla dose di 720 g/ha e dall'Atlantis wg.

Figura 7- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 6 popolazione di *Lolium*. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.



Papaver rhoeas

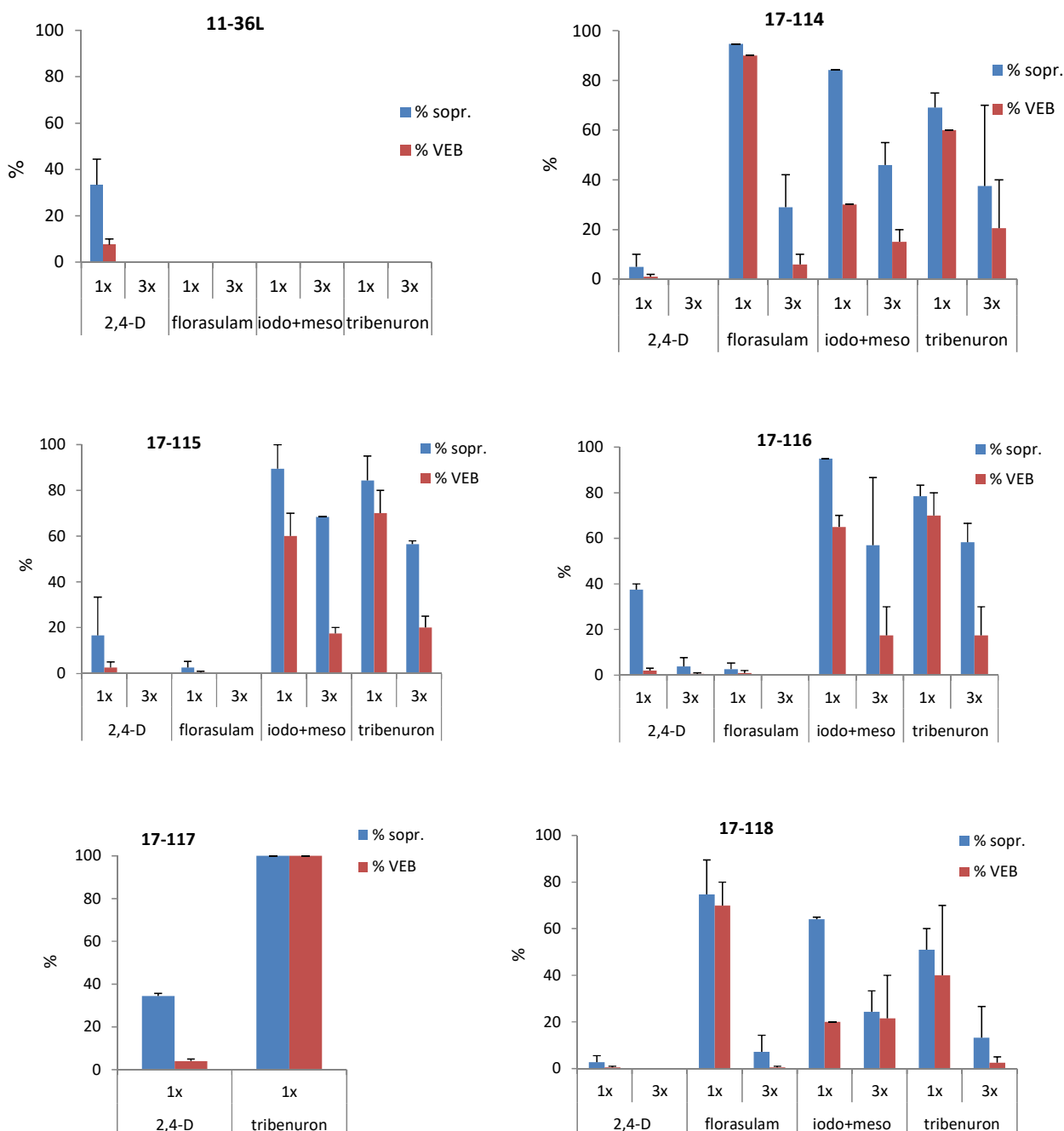
Tutte le popolazioni raccolte nel 2017 sono risultate resistenti al tribenuron-metile e alla miscela di iodo + mesosulfuron-metile (erbicidi inibitori dell'ALS) con % di sopravvivenza variabili e comprese tra il 60 e 100%, e attorno al 35 per la popolazione 121 (Fig. 8). La biomassa delle piante sopravvissute è risultata molto variabile, con VEB del 100% per le popolazioni 117 e 122 mentre i valori più bassi attorno al 30-40 sono stati evidenziati nelle popolazioni 119 e 121.

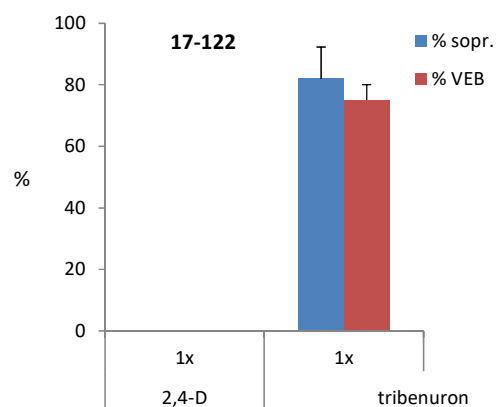
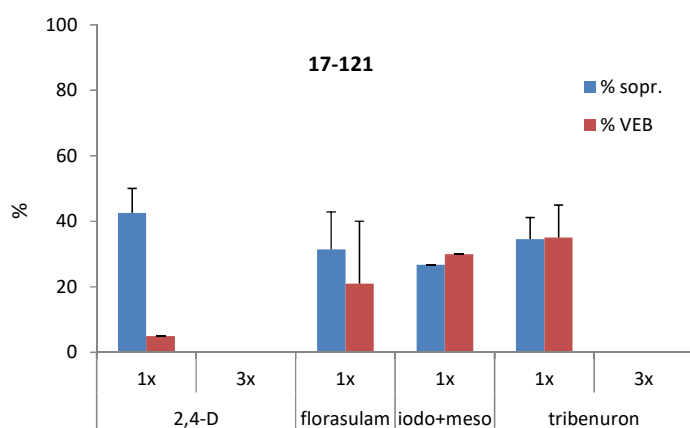
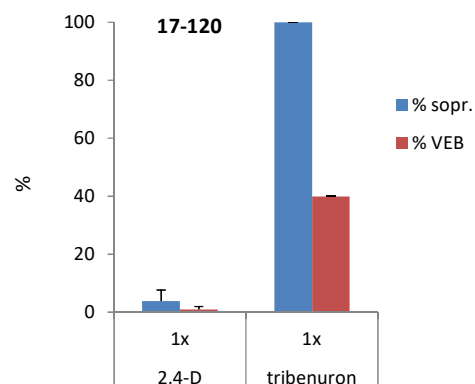
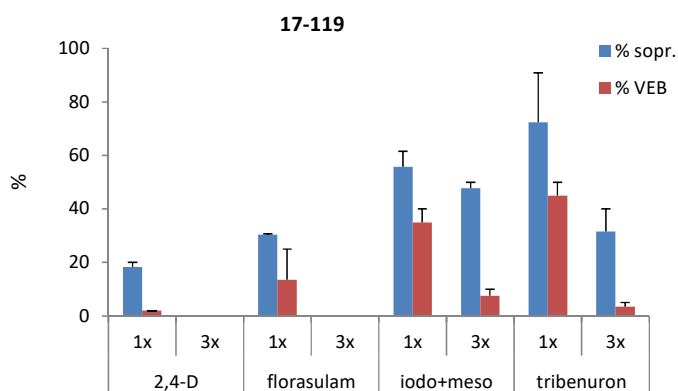
Le popolazioni 114, 118 e 121 sono risultate anche cross-resistenti al florasulam (terzo inibitore dell'ALS testato).

Il 2,4-D ha sostanzialmente controllato le popolazioni di papavero. Solo in alcuni casi sono sopravvissute piantine che avevano però una biomassa molto ridotta.

La dose di 2,4-D testata e pari a 360 g p.a./ha non ha pienamente controllato la popolazione di riferimento suscettibile (pop11-36L) pertanto nell'esperimento condotto sulle popolazioni di papavero campionate nel 2018 la dose di 2,4-D è stata portata a 600 g p.a./ha che corrisponde alla dose massima riportata in etichetta. Tutti campioni testati a questa dose sono stati pienamente controllati dal 2,4-D (Fig. 9)

Figure 8- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 9 popolazioni di papavero campionate nel 2017. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

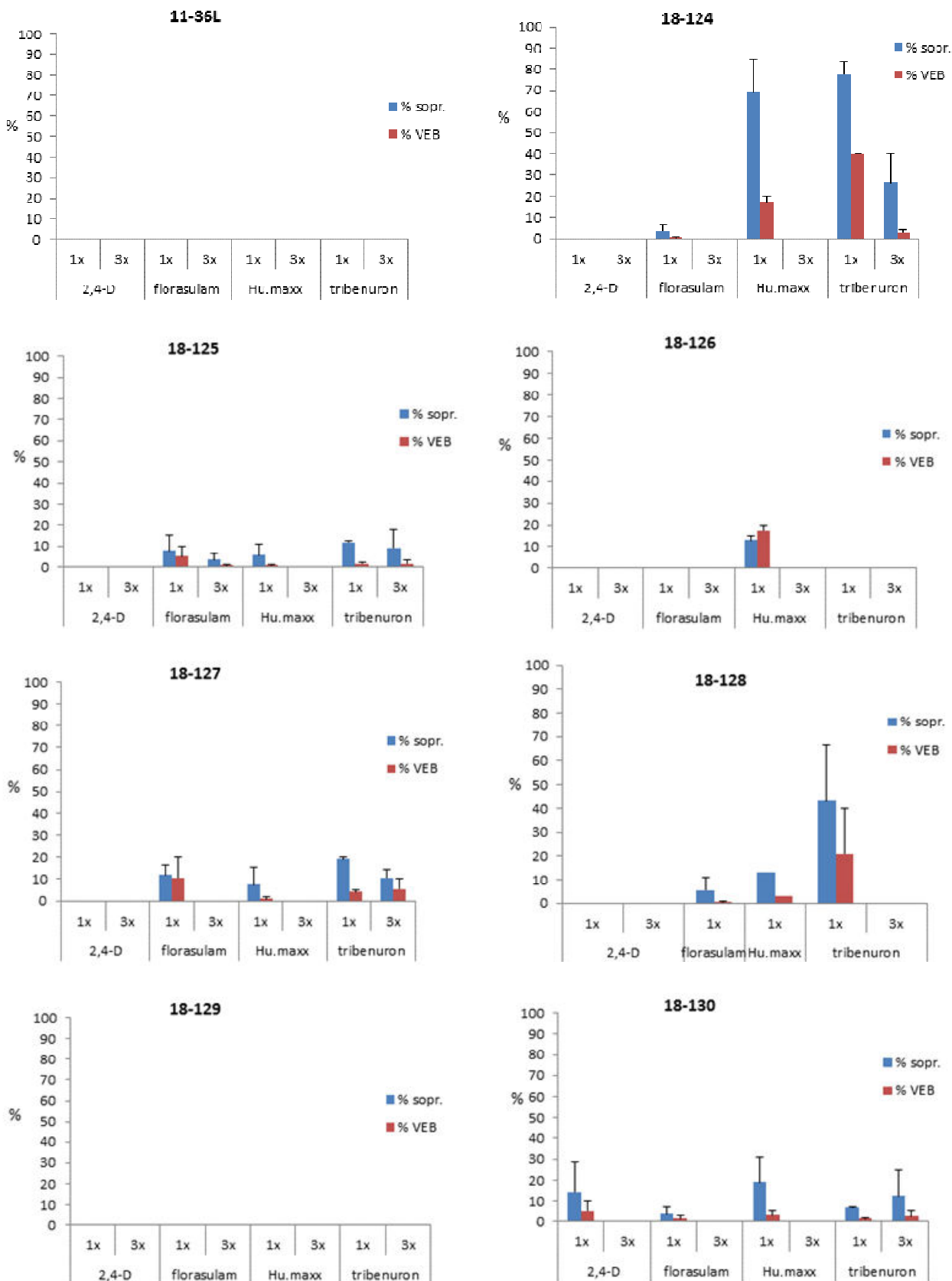


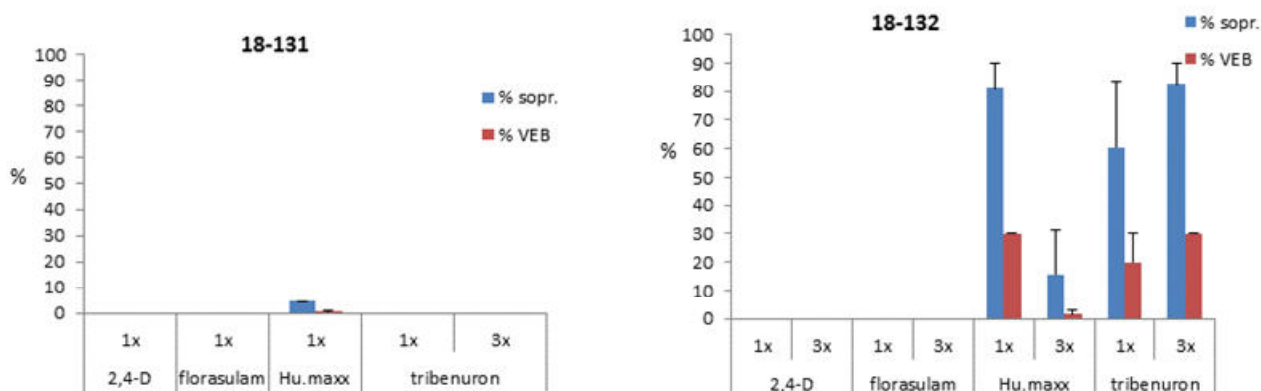


Tra le 9 popolazioni di papavero campionate nel 2018, le popolazioni 124 e 132 hanno mostrato una elevata % di sopravvivenza al tribenuron-metile e alla miscela iodo+ mesosulfuron-metile (70-80%) mentre la VEB era compresa tra il 30-40%. La popolazione 128 è risultata invece resistente solo al tribenuron alla dose 1x.

Tutte le altre popolazioni sono state sostanzialmente controllate da questi erbicidi inibitori dell'ALS (tribenuron, iodo + mesosulfuron e florasulam) ma in alcune popolazioni (125, 126, 127 e 130) sono sopravvissute delle piante con una biomassa molto ridotta che testimoniano una perdita di suscettibilità. Queste popolazioni, se non sono ben gestite nei prossimi anni, possono arrivare nel giro di pochi anni allo sviluppo della resistenza.

Figure 9- Sopravvivenza e stima visiva della biomassa (VEB) delle 9 popolazioni di papavero campionate nel 2018. I valori sono espressi come percentuale del testimone non trattato. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.





CONCLUSIONI

Negli ultimi due anni del progetto sono stati raccolti 69 campioni: 7 popolazioni di *Alopecurus myosuroides* raccolte in frumento, 11 popolazioni di *Amaranthus* spp. raccolte in soia, 16 popolazioni di *Avena* in frumento, 10 popolazioni di *Conyza* spp. raccolte principalmente in vigneto ma anche in frutteti, 1 popolazione di *Echinochloa crus-galli* raccolta in mais, 6 popolazione di *Lolium* spp. in frumento e 18 popolazioni di *Papaver rhoeas* in frumento. Parallelamente si sono acquisite le informazioni storiche sui trattamenti erbicidi fatti nei siti campionati. Complessivamente, 49 delle 69 popolazioni sono risultate resistenti ad almeno un erbicida. In generale la situazione è in veloce evoluzione per *Amaranthus* spp., papavero, alopecuro e *Conyza* spp.

Le informazioni prodotte sono state inserite nel database del GIRE e possono essere utilizzate per creare mappe di diffusione della resistenza a livello regionale.

CONCLUSIONI DEL TRIENNIO

Nel corso del progetto sono stati individuati e confermati 57 casi di resistenza agli erbicidi che coinvolgono 7 generi di infestanti in diversi sistemi colturali: *Alopecurus*, *Avena*, *Lolium* e *Papaver* in frumento, giavoni in mais, amaranti in soia/pisello, soia/pomodoro e *Conyza* in colture arboree (vigneti, frutteti). I risultati sono sintetizzati nella Tabella 8 sottostante. Tutti i nuovi casi di resistenza confermati nel corso del presente progetto sono stati inseriti nel database nazionale del Gruppo Italiano di Lavoro sulla Resistenza agli erbicidi (GIRE) e sono state aggiornate le mappe di diffusione della resistenza agli erbicidi che sono visualizzabili nel sito web del GIRE.

Tabella 8 – Sintesi dei risultati dei campioni di infestanti testati per la conferma della resistenza ai diversi MoAs degli erbicidi.

Sistema colturale	Genere	Campioni totali	Campioni resistenti				
			ALS	ACCasi	Glifosate	Ormonici	PS II
Frumento	<i>Alopecurus</i>	7	0	7	0	-	-
Frumento	<i>Avena</i>	18	1	7	0	-	-
Frumento	<i>Lolium</i>	6	0	4	0	-	-
Frumento	<i>Papaver</i>	18	12	-	-	0	-
Soia	<i>Amaranthus</i>	16	15	-	0	-	0
Soia	<i>Echinochloa</i>	1	0	1	-	-	-
Mais	<i>Echinochloa</i>	2	2	0	-	-	-
Arboree	<i>Conyza</i>	14	0	-	8	-	-

- Significa che non sono stati testati erbicidi con questo MOA per tale genere di infestanti

Tutte le sette popolazioni di *Alopecurus myosuroides* testate sono risultate resistenti agli erbicidi inibitori degli ACCasi, anche se con livelli e pattern di resistenza variabili. Queste popolazioni provengono dal Ravennate in situazioni dove si impiegano in modo ripetuto erbicidi con questo MOA nel frumento e in alcune colture in rotazione (pisello, ortaggi a semina autunnale). Tutte le popolazioni testate sono ancora completamente suscettibili agli inibitori dell'ALS, però occorre evitare di basare la gestione di queste popolazioni sul solo diserbo di post-emergenza con tali erbicidi per evitare l'evoluzione di popolazioni con resistenza multipla ad ACCasi e ALS, come già avvenuto in altri paesi europei.

Tra le popolazioni di *Avena* raccolte nel corso dei 3 anni del progetto (in totale 18), numerose popolazioni sono risultate resistenti al clodinafop (inibitore dell'ACCasi) mentre sono state pienamente controllate dagli altri erbicidi inibitori dell'ACCasi (pinoxaden e cycloxydim) e dal glifosate. Il controllo invece con l'erbicida inibitore dell'ALS (iodosulfuron + mesosulfuron-metile, Atlantis Pro) non è risultato soddisfacente per 10 popolazioni in quanto alcune piante sono sopravvissute al trattamento, pur mostrando una biomassa ridotta rispetto al non trattato. Questo indica una perdita di efficacia di questo meccanismo d'azione e una situazione intermedia del processo di evoluzione della resistenza che, se non ben gestita, potrebbe portare nei prossimi anni alla selezione di resistenze multiple (ACCasi + ALS) come già avvenuto in altre regioni italiane.

Delle sei popolazioni di *Lolium* testate, quattro sono risultate resistenti agli inibitori del ACCasi mentre tutte sono ancora suscettibili agli inibitori ALS. Come nel caso dell'*Avena*, occorre però non basare la gestione sul solo utilizzo di tali erbicidi per evitare l'evoluzione di resistenza multipla.

Infine, tutte le popolazioni di infestanti graminacee autunnali testate sono state controllate dal trattamento con glifosate.

I casi di papavero resistenti agli erbicidi inibitori dell'ALS (tribenuron-metile, iodosulfuron + mesosulfuron) sono stati registrati nella provincia di Ravenna e Forlì. Dai risultati emerge che queste popolazioni resistenti

sono nella maggior parte dei casi completamente controllate dal 2,4-D. Solo in poche situazioni è stata osservata una perdita di suscettibilità a questo erbicida ormono-simile. Per mantenere nel tempo l'efficacia di questo erbicida ed evitare lo sviluppo di piante resistenti sia al tribenuron-metile che al 2,4-D (resistenza multipla) è necessario ruotare nel tempo la coltura e gli erbicidi aventi un diverso meccanismo d'azione. Dalle storie di campo dei campioni di papavero raccolti emerge che è frequente la rotazione del frumento con mais, sorgo, cece. Questa pratica è sicuramente da favorire perché consente di impiegare erbicidi con un diverso meccanismo d'azione e quindi limita la pressione di selezione esercitata dagli inibitori dell'ALS. Nel caso in cui non si possa mettere i cereali in rotazione, si può attuare la falsa semina eliminando l'infestante con lavorazioni o con trattamenti con glifosate.

Tra le popolazioni di *Amaranthus* spp raccolte in soia nel corso dei 3 anni del progetto, sono state identificate 2 specie diverse, *A. retroflexus* ed *A. tuberculatus*. Tutte le popolazioni raccolte, ad eccezione di una, sono risultate resistenti agli erbicidi inibitori dell'ALS, imazamox e tifensulfuron-metile, mentre il bentazone ed il glifosate le hanno pienamente controllate. Questi 2 erbicidi costituiscono pertanto una buona alternativa per il controllo degli amaranti. Tuttavia, il trattamento con bentazone deve essere eseguito in post-emergenza precoce, quando le piantine hanno raggiunto al massimo uno stadio di crescita di 2-4 vere foglie. I trattamenti eseguiti più tardivamente, soprattutto per *Amaranthus tuberculatus*, non risultano pienamente efficaci. Dalle storie di campo degli appezzamenti dove sono state raccolte le popolazioni emerge che l'impiego di questi erbicidi, ed in particolare tifensulfuron-metile ed imazamox, avviene ogni anno con 1 o 2 trattamenti all'anno. La pressione di selezione esercitata da questi erbicidi è pertanto costante e ripetuta nel tempo. Anche se si fanno rotazioni colturali si impiegano erbicidi con il medesimo meccanismo d'azione. Nella rotazione pomodoro/soia (Tab. 1, 2) sono impiegati erbicidi aventi un medesimo meccanismo di resistenza (rimsulfuron in pomodoro ed imazamox e tifensulfuron in soia). Anche nelle rotazione soia/pisello si impiegano erbicidi chimicamente simili (Tab. 1-2). La rotazione colturale è una pratica agronomica consigliata per limitare l'insorgenza delle resistenze, ma essa è priva di efficacia se non sono utilizzati erbicidi con diversi meccanismi d'azione.

In soia è stata campionata nel corso del progetto una popolazione di giavone che è risultata resistente agli erbicidi inibitori dell'ACCasi mentre è stata completamente controllata dagli inibitori dell'ALS. Al momento è pertanto possibile gestire questi giavoni resistenti con erbicidi alternativi (inibitori dell'ALS), ma per mantenere nel tempo la loro efficacia ed evitare l'evoluzione di popolazioni con resistenza multipla è indispensabile diversificare la gestione anche con pratiche agronomiche di controllo. Altre 2 popolazioni di giavone raccolte in mais sono risultate resistenti agli inibitori dell'ALS. Anche per queste popolazioni resistenti c'è un'alternativa di controllo chimico efficace (gli inibitori dell'ACCasi), ma anche in questo caso è d'obbligo alternare erbicidi con diverso meccanismo d'azione e migliorare la gestione con pratiche agronomiche.

Dei 14 campioni di *Conyza* raccolti in vigneti e frutteti della regione, otto hanno mostrato un livello elevato di resistenza nei confronti del glifosate con varie piante sopravvissute anche alla dose più elevata di 3600 g a.e./ha. I trattamenti a base di flazasulfuron, da solo o in miscela con glifosate, hanno invece ottenuto un controllo ottimale, evidenziando che le popolazioni testate sono ancora suscettibili agli inibitori dell'ALS. Questo erbicida può quindi dare un contributo importante alla gestione di *Conyza* nei frutteti e vigneti, però è necessario integrarlo con l'utilizzo di altri erbicidi con diverso MOA e il ricorso a mezzi di controllo meccanico (trinciature, lavorazioni del terreno) per evitare l'evoluzione della resistenza anche agli inibitori dell'ALS e mitigare la sua persistenza nel terreno.

3.2 ANALISI DEI COSTI DELLA RESISTENZA E DELLA SUA GESTIONE

Uar: IBAF-CNR

Terremere

Cereali Padenna

OBIETTIVO

La diffusione di popolazioni di infestanti resistenti ad uno o più erbicidi post-emergenza, dopo aver interessato alcune regioni dell'Italia centrale e meridionale, nell'ultimo quinquennio si stanno diffondendo anche in Emilia Romagna, ed in particolare nelle aree del settore centro-orientale, concentrandosi prevalentemente nelle province di Ferrara e Ravenna. In considerazione della sempre più ridotta disponibilità di principi attivi e soprattutto della carenza di nuovi meccanismi d'azione, molto

frequentemente il controllo chimico alle infestanti da solo non è in grado di assicurare risultati agronomicamente accettabili, con la necessità quindi di procedere ad una attenta considerazione di altre pratiche agronomiche, quali ad esempio le lavorazioni del terreno e le rotazioni colturali.

In Emilia-Romagna è stata accertata la presenza di infestanti resistenti agli erbicidi in alcuni importanti sistemi colturali di seguito sintetizzati.

➤ **sistema colturale frumento**

- popolazioni di *Lolium* spp. resistenti agli erbicidi con meccanismo d'azione ACCasi risultano abbastanza frequenti nelle provincie orientali della regione, in particolare nelle aree dove è particolarmente diffusa la coltivazione dell'erba medica;
- popolazioni di *Avena* spp. resistente agli erbicidi ACCasi, e più limitatamente ad erbicidi ALS, presentano una diffusione a macchia di leopardo nelle provincie di Bologna, Ferrara, Ravenna e Forlì-Cesena;
- si sospetta inoltre la presenza di popolazioni di *Papaver rhoeas* resistenti agli erbicidi ALS e popolazioni di *Alopecurus myosuroides* resistenti agli erbicidi ACCasi. Tuttavia non sono ancora stati ufficializzati i risultati dei test di laboratorio.

➤ **Sistema colturale mais**

Vi sono popolazioni di *Echinochloa crus-galli* resistenti agli erbicidi ALS, con diffusione prevalente nella parte orientale della provincia di Ferrara, dai confini meridionali con la provincia di Ravenna fino a quelli settentrionali delimitati dal fiume Po.

➤ **Sistema colturale soia**

Similmente a quanto riscontrato per il sistema colturale mais, le popolazioni di *Amaranthus* spp. resistenti ad erbicidi ALS risultano particolarmente diffuse ed invasive nella parte orientale della provincia di Ferrara, dai confini con la provincia di Ravenna a sud fino al fiume Po a nord.

Queste diverse situazioni critiche hanno una differente localizzazione anche in relazione al tipo di terreni coinvolti:

- le problematiche di resistenza su frumento si riscontrano in terreni di medio-impasto o argillosi, molto spesso in aziende non irrigue dove il frumento è la coltura più redditizia e quindi la più frequente nella rotazione.
- diversamente, i problemi di resistenza su mais e soia sono localizzati solo su terreni irrigui di norma organici o sabbiosi, dove l'uso degli erbicidi di pre-emergenza è inefficace o sconsigliato causa problemi di selettività. La disponibilità di acqua in abbondanza a costi ridotti rende economicamente molto più conveniente la coltivazione di colture a ciclo primaverile-estivo a scapito dei cereali autunno-vernini.

➤ **Sistema colturale riso**

La diffusione di popolazioni di infestanti parzialmente o non più sensibili anche ai più collaudati ed utilizzati erbicidi di post-emergenza del riso stanno determinando sempre più preoccupanti problematiche anche nella nostra regione, ed in particolare nelle aree vocate della pianura Ferrarese.

In questo lavoro sono state analizzate le problematiche inerenti alle infestanti del genere *Echinochloa* spp., ricordando però che la situazione della risaia è estremamente più complessa, dovendo considerare altre specie infestanti graminacee particolarmente pericolose, quali ad esempio riso crodo (*Oryza sativa* var. *sylvatica*).

Ovviamente nell'ambiente risicolo la diversificazione delle rotazioni rappresenta l'ultima soluzione a cui fare affidamento, considerando che la realizzazione ed il mantenimento delle camere di coltivazione è molto onerosa a livello gestionale ed economica. Per questo la monocoltura è diventata una pratica standard nelle zone vocate alla coltivazione del riso.

➤ **Sistemi colturali frutteti e vite**

In questi sistemi colturali solo il glifosato è coinvolto. I generi interessati sono *Lolium* in vigneti e nocioleti piemontesi e in uliveti del meridione, specialmente in Puglia, e *Conyza* in vari frutteti nel meridione. In Emilia Romagna non ci sono ancora casi di resistenza confermati, ma le situazioni a rischio sono parecchie, specialmente per la *Conyza*.

La resistenza è un costo per tutta la filiera, e questo costo varia in relazione all'approccio gestionale. L'obiettivo del lavoro è quello di evidenziare i costi della resistenza comparando tre possibili scenari: gestione convenzionale delle malerbe, gestione preventiva e gestione curativa.

Le strategie proposte negli scenari preventivi e curativi devono essere sostenibili sul piano economico e ambientale.

MATERIALI E METODI

Nel primo periodo di lavoro sono stati presi in considerazione i seguenti binomi malerba-sistema colturale:

- ✓ frumento tenero e duro - *Avena* spp. e *Lolium* spp.
- ✓ mais - *Echinochloa crus-galli*
- ✓ soia - *Amaranthus* spp.

Nel secondo periodo di lavoro sono stati presi in considerazione i seguenti binomi malerba-sistema colturale:

- ✓ riso - *Echinochloa* spp.
- ✓ vigneto - *Conyza* spp.

Per ogni sistema colturale è stata effettuata una attenta analisi dei costi derivanti dalla gestione della resistenza ipotizzando tre possibili scenari:

1) gestione convenzionale degli inerbimenti, definita senza considerare i possibili fenomeni di resistenza agli erbicidi. È uno scenario puramente teorico che serve per calcolare per differenza il costo della resistenza negli altri due scenari.

2) gestione preventiva della resistenza: la resistenza non è ancora presente nell'azienda ma può verificarsi, per cui si adottano strategie per evitarne o rallentarne l'evoluzione. Comporta una serie di operazioni e scelte agronomiche volte a ridurre il rischio di un'eventuale evoluzione futura della resistenza, considerando soprattutto una variazione delle lavorazioni del terreno ed una diversificazione delle rotazioni aziendali e, dove possibile, la reintroduzione degli interventi di pre-emergenza con erbicidi ad azione residuale;

3) gestione curativa della resistenza: la resistenza è già presente nell'azienda, per cui si adottano strategie per gestirla. State ipotizzate alcune operazioni specifiche rivolte al controllo di popolazioni di infestanti resistenti già presenti negli appezzamenti, come ad esempio l'utilizzo di erbicidi alternativi o la variazione delle epoche di intervento (esempio reintroduzione dei trattamenti di pre-emergenza).

Per la definizione dei costi delle operazioni colturali (lavorazioni meccaniche, distribuzione fitofarmaci e concimi, operazioni di raccolta, ecc.) e dei mezzi tecnici utilizzati (erbicidi, fungicidi, insetticidi e concimi) sono stati considerati i prezzi medi delle aree interessate alle problematiche riferiti ad aziende agricole di medie dimensioni.

Le rese medie delle differenti colture prese in esame sono state definite in base alle medie storiche degli ultimi anni dei differenti ambienti di coltivazione (terreni normali irrigui e non irrigui, terreni organici).

Nella definizione delle potenzialità produttive non sono state considerate le eventuali perdite di produzione dovute al mancato controllo delle infestanti, in quanto difficilmente valutabili. Le ovvie perdite produttive che si verificano a seguito della presenza di infestanti sono estremamente condizionate dal tipo e dal grado dell'infestazione. Inoltre non è da sottovalutare anche la durata del periodo in cui le infestanti esercitano la loro azione concorrenziale con la coltura. Nel caso del sistema vigneto si è deciso di non stimare un valore economico della produzione perché questo dipende molto dai molti fattori (vitigno, denominazioni di origine, presenza consorzi) per cui lo studio si è concentrato sul solo confronto dei costi e le ore di lavoro necessari per il controllo delle infestanti nelle varie gestioni, assumendo che la resa e le caratteristiche qualitative dell'uva ottenuta con le varie gestioni siano identiche.

Per quanto riguarda il caso limite della monda manuale delle infestanti resistenti sopravvissute, essa risulta difficilmente attuabile (esclusivamente su infestazioni limitate o concentrate a chiazze), mentre in linea teorica potrebbe risultare più razionale mettere a punto interventi sovrachioma con attrezzature selettive utilizzando glifosate, consapevoli tuttavia delle attuali problematiche legate a questo risolutivo principio attivo.

Nella definizione del margine lordo di ogni sistema colturale sono considerati esclusivamente i costi diretti (mezzi tecnici ed operazioni colturali).

RISULTATI

Nel dettaglio questi sono gli elementi emersi da questo studio per singolo sistema colturale.

➤ **Sistema frumento tenero/duro** (tabella 1)

Criticità

Gestione convenzionale

- *Erbicidi utilizzati*

L'impiego ripetuto negli anni nell'ambito di programmi di diserbo esclusivamente in post-emergenza con graminicidi con meccanismo d'azione ACCasi ha portato alla comparsa di popolazioni di *Avena* spp. resistenti. Per quanto concerne le popolazioni di *Lolium* spp. resistenti agli erbicidi ACCasi, la loro diffusione è stata favorita soprattutto dall'uso scorretto e ripetuto di quizalofop-etile isomero D+ e quizalofop-p-etile nell'erba medica posta in precessione al frumento. Attraverso l'impollinazione allogama e la diffusione dei semi con le macchine agricole questa problematica ha finito per interessare anche aziende che non hanno mai coltivato la specie leguminosa. La mera sostituzione di erbicidi con meccanismo d'azione ACCasi con ALS non può ritenersi sufficiente, considerando la propensione allo sviluppo di popolazioni con resistenza incrociata (già accertati su *Avena* spp.).

- *Lavorazioni*

La necessità di contenere i costi colturali ha portato a ridurre sempre più le lavorazioni del terreno prime della semina. Nella generalità dei casi prevalgono lavorazioni molto ridotte e semine dirette (sodo).

- *Rotazione.*

Fortunatamente in Emilia Romagna la monocoltura di frumento non è pratica diffusa e molto rari sono i ristoppi. La rotazione prevalente in questi ambienti prevalentemente non irrigui è una biennale, in cui il frumento è alternato a cereali estivi o a una dicotiledone di norma a semina primaverile. La relativamente scarsa diffusione di colture a semina autunnale alternate al frumento è un enorme vantaggio. Il colza in regione non si è particolarmente diffuso, ma in molte aree della Romagna aumentano le superfici destinate a colture portaseme a semina di fine-estate ed autunno, quali carote, cicorie, crucifere in genere).

Gestione preventiva

- *Erbicidi*

In funzione preventiva si è previsto di fare ricorso anche al diserbo autunnale (pre-emergenza o post-emergenza precoce), utilizzando molecole a meccanismo d'azione alternativo sia ad ACCasi che ad ALS, quali clortoluron, triallate, flufenacet o prosulfocarb, integrate con addizione di diflufenican per ampliare lo spettro d'azione sulle infestanti dicotiledoni. Questa tecnica generalmente risulta molto efficace nei confronti di *Lolium* spp., mentre nei confronti di *Avena* spp. i risultati attesi non sono completi. Per gli interventi di post-emergenza si sono preferiti formulati graminicidi che contengano molecole con entrambi i meccanismi d'azione (ACCasi ed ALS) o in via subalterna alternare gli stessi nei differenti cicli di coltivazione del cereale.

- *Lavorazioni*

In caso di favorevole piovosità nel periodo di fine estate, adottando la tecnica della falsa semina poche settimane prima, è possibile eliminare un buon numero di infestanti microterme mediante una epicatura supplementare o con interventi a base di glifosate. Diventa consigliabile anche posticipare le operazioni di semina. In caso di presenza massiccia di *Lolium* spp. è preferibile ricorrere all'aratura.

- *Rotazione*

In funzione preventiva è consigliabile passare da una rotazione biennale ad una triennale con l'inserimento di due colture a semina primaverile. Negli ambienti irrigui le possibilità sono molte, quali mais, soia, pisello, orticole industriali (pomodoro, patata, cipolla, ecc.) e la redditività dell'intera rotazione può anche risultare più elevata. Più difficile implementarla su terreni non irrigui, dove la scelta si limita essenzialmente a colture più rustiche, quali sorgo o girasole, che difficilmente possono offrire costantemente un reddito comparabile a quello del frumento.

Gestione curativa

- *Erbicidi*

In questo caso nella scelta dell'erbicida da utilizzare di devono necessariamente escludere quelli che hanno il meccanismo d'azione direttamente coinvolto. L'introduzione degli interventi autunnali di pre o post-emergenza precoce diventa una necessità imprescindibile, considerando tuttavia che la loro efficacia su *Avena* spp. risulta parziale.

- *Lavorazioni*

Le raccomandazioni formulate per la gestione preventiva diventano imperativi: obbligatorie la falsa semina e la semina ritardata. Inoltre la falsa semina è da considerarsi necessaria anche dopo le operazioni di trebbiatura, confidando in una favorevole piovosità che permetta la germinazione dei semi eventualmente caduti a terra. Indispensabile nel caso di *Lolium* spp. il ricorso all'aratura.

- *Rotazione*

La rotazione biennale non è più razionale, occorre passare almeno ad una triennale con l’inserimento di due colture a semina primaverile, dove la gestione delle infestazioni di *Avena* spp. e *Lolium* spp. è demandata alle lavorazioni meccaniche o ad erbicidi con diverso meccanismo d’azione (es. glifosate). In queste situazioni si devono escludere dalla rotazione altre colture a ciclo autunno-vernino. Come nel caso della gestione preventiva gli ambienti irrigui o meno offrono diverse possibilità operative.

Misure supplementari

Per limitare la disseminazione delle infestanti sopravvissute, limitatamente ad *Avena* spp. e solo quando la densità dell’infestazione non è eccessiva, è fondamentale procedere alla monda manuale. Questa pratica non è proponibile per *Lolium* spp.

Tabella 1 – Sistema cereali a paglia (frumento tenero e grano duro)

Infestante coinvolta	Gestione convenzionale
<i>Avena</i> spp. <i>Lolium</i> spp.	lavorazioni ridotte rotazione biennale con coltura primaverile: frumento-sorgo unico trattamento di post-emergenza (graminacee e dicotiledoni)
Infestante coinvolta	Gestione preventiva
<i>Avena</i> spp. <i>Lolium</i> spp.	falsa semina autunnale (erpicazione supplementare) semina ritardata rotazione triennale con due colture primaverili: frumento-mais-soia (ambienti irrigui) frumento-sorgo-girasole (asciutta)
<i>Avena</i> spp.	falsa semina autunnale (erpicazione supplementare) pre-emergenza (attività parziale) alternanza meccanismo d’azione (ALS vs. ACCasi) impiego contemporaneo meccanismi d’azione (ACCasi/ALS)
<i>Lolium</i> spp.	aratura falsa semina autunnale (erpicazione supplementare) Trattamento di pre-emergenza o post-emergenza precoce
Infestante coinvolta	Gestione curativa
<i>Avena</i> spp.	falsa semina autunnale (erpicazione supplementare) pre-emergenza (attività parziale) Trattamento di post-emergenza con meccanismo d’azione non coinvolto monda manuale o distruzione chiazze falsa semina post-raccolta
<i>Lolium</i> spp.	aratura falsa semina autunnale (erpicazione supplementare) Trattamento di pre-emergenza o post-emergenza precoce Trattamento di post-emergenza con meccanismo d’azione non coinvolto

➤ **Sistema mais** (tabella 2)

Criticità

Gestione convenzionale

- *Erbicidi utilizzati*

Le problematiche derivanti dalla comparsa delle popolazioni di *Echinochloa crus-galli* al momento attuale sono limitate esclusivamente alle aree caratterizzate da terreno organico, dove la gestione degli inerbimenti è demandata esclusivamente ad interventi di sola post-emergenza, in quanto gli erbicidi di pre-emergenza ad azione residuale sono rapidamente degradati dalla componente organica non sortendo quindi risultati agronomicamente accettabili. Per il controllo delle rilevanti infestazioni di *Echinochloa crus-galli*, particolarmente rilevanti in questi tipi di terreno, per molti anni sono utilizzati erbicidi solfonilureici con meccanismo d’azione ALS, quali rimsulfuron, nicosulfuron (anche in miscela tra loro) e foramsulfuron. Rimsulfuron è largamente utilizzato anche nelle coltivazioni di pomodoro poste in rotazione al mais. In questi ambienti al fine di limitare i costi si effettua un solo trattamento erbicida di post-emergenza, posizionato in epoca tendenzialmente tardiva, causa l’estrema scalarità di nascita tipica di questi suoli, intervenendo quindi su malerbe generalmente molto sviluppate.

Nei terreni normali il ricorso alle applicazioni di pre-emergenza o post-emergenza precoce con i numerosi formulati disponibili, privilegiando miscele contenenti uno dei quattro principi ad azione graminicida specifica, quali s-metolaclo, flufenacet, petoxamide, dimetenamide-P non è mai stata abbandonata del tutto e probabilmente a questo si deve, per ora, la mancata comparsa di popolazioni di *Echinochloa crus-galli* resistente agli erbicidi ALS.

- *Lavorazioni*

Nei terreni organici generalmente vengono ancora praticate lavorazioni relativamente profonde (arature), e comunque in tutti i tipi di terreno sono i casi in cui si procede le minime lavorazioni sono poco frequenti ed ancora più rare risultano le semine dirette.

- *Rotazione*

La continua diminuzione delle superfici destinate a mais ha fatto concentrare la coltura nelle zone più vocate dove il livello di specializzazione è piuttosto alto. Se si escludono le aree non irrigue della Romagna orientale, dove la coltura principale è il frumento e dove la rotazione è necessariamente molto stretta, in tutti gli altri terreni la stessa è spesso triennale, con inserimento di frumento e soia nei suoli normali e di soia e pomodoro in quelli organici. La monocoltura non è molto diffusa, se non dove più alta è la concentrazione di biodigestori per la produzione di energia.

Gestione preventiva

- *Erbicidi*

Nei terreni normali diventa obbligatorio non abbandonare le classiche applicazioni di pre-emergenza o post-emergenza precoce con i numerosi formulati disponibili, privilegiando miscele contenenti uno dei quattro principi ad azione graminicida specifica, quali s-metolaclo, flufenacet, petoxamide, dimetenamide-P. Più difficile risulta la gestione preventiva nei terreni organici, dove l'unica possibilità è l'inserimento obbligatorio di un trichetone in post-emergenza e un anticipo dell'epoca degli interventi.

In questo ambito va rivolta una particolare attenzione anche alla gestione dell'infestante graminacea anche nel pomodoro in rotazione: *Echinochloa crus-galli* non può essere controllata solo con rimsulfuron, ma vanno inseriti nella strategia complessiva usati anche graminicidi specifici (meccanismo d'azione ACCasi).

- *Lavorazioni*

Non si ritiene che sia da modificare il tipo di lavorazioni attualmente praticato.

- *Rotazione*

In funzione preventiva nei terreni normali è consigliabile passare da una eventuale rotazione biennale con frumento ad una triennale con l'inserimento di una coltura dicotiledone a ciclo primaverile, dove è possibile controllare le infestanti graminacee con erbicidi non a meccanismo d'azione ALS (ad esempio ACCasi). Nei terreni organici e nelle aree più vocate alla coltivazione del mais diventa conveniente inserire un cereale autunno-vernino allo scopo di interrompere per una stagione il ciclo riproduttivo di *Echinochloa crus-galli*.

Gestione curativa

- *Erbicidi*

Allo stesso modo della strategia preventiva nei terreni normali sono obbligatori i trattamenti di pre-emergenza o post-emergenza precoce con gli erbicidi ad azione residuale ricordati precedentemente. In caso di parziale efficacia di questi trattamenti nei confronti di *Echinochloa crus-galli* in post-emergenza deve essere inserito tembotrione, caratterizzato da buona efficacia anche nei confronti delle piante dell'infestante graminacea non più sensibili agli erbicidi ALS.

Nei terreni organici diventa indispensabile splittare le applicazioni erbicide, utilizzando lo specifico tembotrione in epoca molto anticipata e con successiva rifinitura sulle altre infestanti utilizzando le classiche miscele a base di solfonilurea graminicida, dicamba e trichetone.

- *Lavorazioni*

Non si ritiene che sia da modificare il tipo di lavorazioni attualmente praticato.

- *Rotazione*

Per quanto concerne la rotazione, per la strategia curativa valgono le stesse indicazioni riportate in quella preventiva.

Tabella 2 – Sistema mais (*Echinochloa crus-galli*)

Tipo di terreno	Gestione convenzionale
Normale	Rotazione biennale: mais-frumento Trattamento di pre-emergenza
Organico	Rotazione triennale: mais-pomodoro-soia Unico trattamento di post-emergenza (graminacee e dicotiledoni)
Tipo di terreno	Gestione preventiva
Normale	Rotazione triennale con inserimento di colture dicotiledoni (possibile impiego erbicidi Accasi) mais-frumento-soia mais-frumento-girasole Trattamento di pre-emergenza
Organico	Rotazione quadriennale con inserimento cereale autunnale: mais-pomodoro-frumento-soia Trattamento di post-emergenza con erbicidi ALS + trichetone Rotazione triennale frumento al posto della soia: mais-pomodoro-frumento Trattamento di post-emergenza con erbicidi ALS + trichetone
Tipo di terreno	Gestione curativa
Normale	Trattamento di pre-emergenza Inserimento tembotrione programmi di diserbo in post-emergenza
Organico	Rotazione quadriennale: mais-pomodoro-frumento-soia Trattamento di post-emergenza precoce con tembotrione Trattamenti di post-emergenza tardiva con erbicidi ALS + mesotrione Rotazione triennale: mais-pomodoro-frumento Trattamento di post-emergenza precoce con tembotrione Trattamenti di post-emergenza tardiva con erbicidi ALS + mesotrione

➤ **Sistema soia** (tabella 3)

Criticità

Gestione convenzionale

- *Erbicidi utilizzati*

Nei terreni organici il diserbo di pre-emergenza risulta poco efficace per cui il controllo delle infestanti è totalmente affidato ad applicazioni di post-emergenza. Purtroppo anche nei terreni normali si è però diffusa la pratica di diserbare la soia solo in post-emergenza per motivi sostanzialmente di carattere economico. Il pre-emergenza difficilmente risulta risolutivo per cui un intervento di post è comunque necessario. Il programma standard di diserbo in post-emergenza della soia è stato per decenni imazamox (imazetapir prima) +tifensulfuron-metile (entrambi con meccanismo d'azione ALS) + eventuale graminicida specifico. Nel caso dei terreni organici la situazione è più critica dal momento che la soia è in rotazione con altre colture a ciclo primaverile-estivo (mais, pomodoro), nelle quali tutte le strategie di diserbo prevedevano unici o ripetuti trattamenti di post-emergenza con erbicidi ALS.

- *Lavorazioni*

La situazione è paragonabile a quelle descritta per il mais. Nei terreni organici generalmente vengono ancora praticate lavorazioni relativamente profonde (arature), e comunque in tutti i tipi di terreno sono i casi in cui si procede le minime lavorazioni sono poco frequenti ed ancora più rare risultano le semine dirette. Di norma sono terreni preparati con largo anticipo dove si può sfruttare gli effetti della falsa semina. Nel caso delle colture di secondo raccolto i tempi ridotti fra la raccolta della coltura precedente (pisello o cereale a paglia) e la semina della soia non danno modo di effettuare lavorazioni profonde e tanto meno effettuare false semine.

- *Rotazione*

Nelle aree vocate alla coltivazione della soia caratterizzate da terreni normali solitamente la rotazione è triennale, con inserimento di frumento, mais o, nelle aziende più specializzate, pomodoro. Nelle aree di bonifica con suoli organici, generalmente si tende ad escludere il frumento preferendo il più redditizio anche se più difficoltoso pomodoro. Nei terreni organici delle bonifiche più recenti è però molto diffusa anche semina di secondo raccolto, in particolare in successione a pisello da industria.

Gestione preventiva

- *Erbicidi*

Dopo un'accurata preparazione del letto di semina, nei terreni normali diventa obbligatorio reintrodurre gli interventi di pre-emergenza con erbicidi ad azione residuale con il fine prevalente di impedire il più possibile l'emergenza di *Amaranthus* spp., utilizzando i più efficaci e specifici metribuzin ed s-metolaclo. Se in caso di andamento pluviometrico sfavorevole questi interventi non sortissero risultati completi, in post-emergenza devono essere obbligatoriamente inseriti principi attivi a differente meccanismo d'azione, quali l'autorizzato bentazone ed in un prossimo futuro anche bifenox e piraflufen-etile. Nei terreni organici, non potendo avvalersi dell'efficacia preventiva degli interventi di pre-emergenza, si devono ottimizzare le applicazioni precoci di post-emergenza, anche in questo caso inserendo nelle miscele bentazone, bifenox o piraflufen-etile.

- *Lavorazioni*

Non si ritiene necessario modificare il tipo di lavorazioni oggi effettuate.

- *Rotazione*

Per limitare ulteriormente la pressione di selezione, nei terreni organici occorre portare la rotazione da triennale a quadriennale, inserendo un ulteriore ciclo di mais, preferito al frumento per la maggiore redditività.

Gestione curativa

- *Erbicidi*

Allo stesso modo della strategia preventiva, nei terreni normali sono obbligatori i trattamenti di pre-emergenza e l'inserimento in post-emergenza degli erbicidi a meccanismo d'azione alternativa (bentazone, bifenox o piraflufen-etile).

Quando si opera nei terreni organici al pari del mais spesso diventa necessario splittare le applicazioni erbicide, utilizzando i più efficaci bentazone, bifenox o piraflufen-etile in epoca molto anticipata e con successiva rifinitura sulle altre infestanti utilizzando le classiche miscele a base di imazamox + tifensulfuron-metile.

- *Lavorazioni*

Non si ritiene necessario modificare il tipo di lavorazioni oggi effettuate.

- *Rotazione*

In tutti i tipi di terreno diventa necessario allargare la rotazione triennale a quadriennale, inserendo un altro ciclo produttivo di cereali a paglia nelle aziende meno vocate e specializzate o in alternativa una seconda coltivazione di mais tra soia e pomodoro.

- *Misure supplementari*

Nelle coltivazioni di soia, grazie agli spazi interfilari ed alla limitata altezza delle piante, per limitare la disseminazione delle infestanti sopravvissute diventa importante procedere alla monda manuale prima che le piante di *Amaranthus* spp. giungano a maturazione.

Tabella 3 – Sistema soia (*Amaranthus* spp.)

Tipo di terreno	convenzionale
Normale	Rotazione triennale: soia-frumento-pomodoro soia-frumento-mais Unico trattamento di post-emergenza con erbicidi ALS
Organico	Rotazione soia-pomodoro-mais Unico trattamento di post-emergenza con erbicidi ALS
Tipo di terreno	Preventiva
Normale	Pre-emergenza Inserimento bentazone linee di diserbo in post-emergenza
Organico	Rotazione quadriennale: soia-mais-pomodoro-mais soia-frumento-pomodoro-mais Inserimento bentazone linee di diserbo in post-emergenza Falsa semina colture in secondo raccolto
Tipo di terreno	Curativa
Normale	Pre-emergenza Rotazione quadriennale: soia-mais-pomodoro-mais soia-mais-grano tenero-mais Inserimento bentazone linee di diserbo in post-emergenza
Organico	Falsa semina 2° raccolto Rotazione soia-mais-pomodoro-mais soia-grano tenero-pomodoro-mais Doppio trattamento post-emergenza: 1° trattamento precoce con bentazone/bifenox 2° trattamento con erbicidi ALS + graminicida specifico Monda manuale sopravvissuti

Dall'esame dei dati emerge che la redditività aziendale è influenzata sia dal cambiamento dell'itinerario tecnico della singola coltura che dalla variazione del tipo di rotazione. Introducendo altre colture per avere rotazioni più ampie vi è la possibilità che queste risultino meno redditizie.

Sistema frumento (tabelle 4-5-6-7)

Nel frumento tenero con presenza di *Lolium* spp. resistente i costi di coltivazione della coltura passano da 973 €/ha nel caso della gestione convenzionale a 1063 €/ha per la gestione preventiva e a 1255€ per la gestione curativa. Nel caso di *Avena* spp. rispettivamente 1192 €/ha per la gestione preventiva e 1292€/ha per la gestione convenzionale. Passando da una rotazione convenzionale biennale frumento-sorgo, tipica di un ambiente non irriguo, ad una triennale con l'inserimento del girasole, il margine lordo annuo passa da 422 €/ha a 210-250 €/ha. Nei terreni irrigui, passando da una rotazione grano-mais ad una triennale grano-mais-soia il margine lordo annuo da 450 €/ha non scende al di sotto dei 363 €/ha nel caso della gestione curativa delle infestazioni *Avena* spp. Nel caso del frumento duro la tendenza è la stessa: nei terreni non irrigui, dove la scelta delle colture praticabili si va a restringere a colture a bassa redditività, quali sorgo e girasole, l'allungamento della rotazione provoca un decremento del margine lordo, che si va ad aggiungere ai maggiori costi di coltivazione. Diversamente, nei terreni irrigui, la possibilità di inserire colture a più alta redditività va a compensare in buona parte i maggiori costi culturali imposti dalle gestioni preventive e curative.

Sistemi mais (tabelle 8-9)

Anche in questo caso la strategia preventiva è più vantaggiosa rispetto a quella curativa. Nel caso del sistema mais la differenza non è data dalla possibile gestione irrigua o meno, in quanto la coltura è tipica degli ambienti in cui l'acqua è generalmente disponibile, quanto piuttosto dalla natura del terreno, organico o normale. Nel caso del mais coltivato su terreno normale, se dalla rotazione biennale grano-mais si passa a rotazioni più ampie, inserendo soia, il margine lordo annuale rimane praticamente invariato o addirittura aumenta. Lo stesso margine per contro si va a ridurre nel caso venga inserito il meno redditizio girasole. Nel mais coltivato su terreno organico, dove è già in rotazione con soia e pomodoro, l'inserimento del frumento nella rotazione abbassa inevitabilmente il margine lordo annuo. In ogni modo il decremento del margine lordo risulta più consistente nella strategia curativa rispetto a quella preventiva.

Sistema soia (tabelle 10-11)

Nel caso del sistema soia, coltivata prevalentemente in ambienti irrigui, le maggiori difficoltà si incontrano nei terreni organici, dove non ci si può avvalere dell'apporto degli erbicidi ad azione residuale di pre-

emergenza. Le differenze di margine lordo più importanti derivano tuttavia dalla rotazione colturale, con un inevitabile decremento nei casi in cui il più redditizio pomodoro venga sostituito con mais o frumento. Similmente alle altre colture, la strategia preventiva risulta economicamente meno impattante rispetto a quella curativa.

Tabella 4 – Simulazione sistema grano tenero in ambiente non irriguo

Rese medie (t/ha)	grano tenero	7,5	
	sorgo	8,5	
	girasole	3	
Tipo di gestione	Rotazione	differenza margine annuale (€)	differenza (%)
convenzionale	grano tenero		
	sorgo		
preventiva <i>Lolium</i>	grano tenero	-42,5	-10,1
	sorgo		
preventiva <i>Lolium</i>	grano tenero	-135,8	-32,1
	sorgo		
	girasole		
curativa <i>Lolium</i>	grano tenero	-199,2	-47,1
	sorgo		
	girasole		
preventiva <i>Avena</i>	grano tenero	-105,0	-24,9
	sorgo		
preventiva <i>Avena</i>	grano tenero	-177,5	-42,0
	sorgo		
	girasole		
curativa <i>Avena</i>	grano tenero	-210,8	-49,9
	sorgo		
	girasole		

Tabella 5 – Simulazione sistema grano tenero in ambiente irriguo

Rese medie (t/ha)	grano tenero	7,5	
	mais	12	
	soia	4	
Tipo di gestione	Rotazione	differenza margine annuale (€)	differenza (%)
convenzionale	grano tenero mais		
preventiva <i>Lolium</i>	grano tenero mais	-42,5	-9,4
preventiva <i>Lolium</i>	grano tenero mais soia	11,7	2,6
curativa <i>Lolium</i>	grano tenero mais soia	-75,0	-16,7
preventiva <i>Avena</i>	grano tenero mais	-105,0	-23,3
preventiva <i>Avena</i>	grano tenero mais soia	-53,3	-11,9
curativa <i>Avena</i>	grano tenero mais soia	-86,7	-19,3

Tabella 6 – Simulazione sistema duro in ambiente non irriguo

Rese medie (t/ha)	grano duro	7
	sorgo	8,5
	girasoie	3

Tipo di gestione	Rotazione	differenza margine annuale (€)	differenza (%)
convenzionale	grano duro sorgo		
preventiva <i>Lolium</i>	grano duro sorgo	-45,0	-9,9
preventiva <i>Lolium</i>	grano duro sorgo girasoie	-148,3	-32,6
curativa <i>Lolium</i>	grano duro sorgo girasoie	-210,0	-46,2
preventiva <i>Avena</i>	grano duro sorgo	-112,5	-24,7
preventiva <i>Avena</i>	grano duro sorgo girasoie	-193,3	-42,5
curativa <i>Avena</i>	grano duro sorgo girasoie	-226,7	-49,8

Tabella 7 – Simulazione sistema grano duro in ambiente irriguo

Rese medie (t/ha)	grano duro	7
	mais	12
	soia	4

Tipo di gestione	Rotazione	differenza margine annuale (€)	differenza (%)
convenzionale	grano duro mais		
preventiva <i>Lolium</i>	grano duro mais	-45,0	-9,3
preventiva <i>Lolium</i>	grano duro mais soia	-20,8	-4,3
curativa <i>Lolium</i>	grano duro mais soia	-85,8	-17,8
preventiva <i>Avena</i>	grano duro mais	-112,5	-23,3
preventiva <i>Avena</i>	grano duro mais soia	-69,2	-14,3
curativa <i>Avena</i>	grano duro mais soia	-102,5	-21,2

Tabella 8 - Simulazione sistema mais su terreno normale in ambiente irriguo

Rese medie (t/ha)	mais	12
	grano tenero	7,5
	soia	4
	girasole	3

Tipo di gestione	Rotazione	Differenza margine annuale (€)	Differenza (%)
convenzionale	mais grano tenero		
Preventiva (rotazione)	mais grano tenero girasole	-116,7	-25,9
Preventiva (rotazione)	mais grano tenero soia	16,7	3,7
Curativa (senza rotazione)	mais grano tenero	-57,5	-12,8
Curativa (rotazione)	mais grano tenero girasole	-155,0	-34,4
curativa (rotazione)	mais grano tenero soia	-21,7	-4,8

Tabella 9 - Simulazione sistema mais su terreno organico in ambiente irriguo

Rese medie (t/ha)	mais	12
	grano tenero	6,5
	soia	4
	pomodoro	80

Tipo di gestione	Rotazione	Differenza margine annuale (€)	Differenza (%)
convenzionale	mais pomodoro soia		
Preventiva (rotazione)	mais pomodoro grano tenero soia	-117,9	-16,6
Preventiva (rotazione)	mais pomodoro grano tenero	-70,0	-9,8
Curativa (senza rotazione)	mais pomodoro soia	-31,7	-4,4
Curativa (rotazione)	mais pomodoro grano tenero soia	-141,7	-19,9
Curativa (rotazione)	mais pomodoro grano tenero	-101,7	-14,3

Tabella 10 - Simulazione sistema soia su terreno normale in ambiente irriguo

Rese medie (t/ha)	soia	4	
	mais	12	
	grano tenero	7,5	
	pomodoro	85	
Tipo di gestione	Rotazione	Differenza margine annuale (€)	Differenza (%)
convenzionale	soia grano tenero pomodoro		
convenzionale	soia grano tenero mais	-420,0	-47,4
Preventiva (senza rotazione)	soia grano tenero pomodoro	-16,7	-1,9
Preventiva (senza rotazione)	soia grano tenero mais	-436,7	-49,2
Curativa (senza rotazione)	soia grano tenero pomodoro	-50,0	-5,6
Curativa (senza rotazione)	soia grano tenero mais	-473,3	-53,4
Curativa (rotazione)	soia mais pomodoro mais	-156,7	-17,7
Curativa (rotazione)	soia mais grano tenero mais	-471,67	-53,2

Tabella 11 - Simulazione sistema soia su terreno organico in ambiente irriguo

Rese medie (t/ha)	soia	4,5	
	mais	13	
	grano tenero	6,5	
	pomodoro	85	
Tipo di gestione	Rotazione	Differenza margine annuale (€)	Differenza (%)
convenzionale	soia mais pomodoro		
preventiva	soia mais pomodoro mais	-55,8	-7,8
preventiva	soia grano tenero pomodoro mais	-118,3	-16,6
curativa	soia mais pomodoro mais	-93,3	-13,1
curativa	soia grano tenero pomodoro mais	-155,8	-21,8

CONCLUSIONI

Dall'esame complessivo dei risultati ottenuti si evidenzia che adottando strategie preventive al fine di limitare o prevenire l'insorgenza di popolazioni di infestanti resistenti agli erbicidi, si ottiene un minore incremento dei costi di gestione, con il conseguente relativo minore decremento del margine lordo. Le variazioni del margine più significative si evidenziano in rapporto alla diversificazione delle rotazioni colturali, mantenendo livelli di reddito sufficienti e con mantenimento del più redditizio pomodoro. Per contro si registra una netta perdita economica quando si prevede l'inserimento di colture a più bassa marginalità, quali sorgo e girasole, in particolare nei terreni non irrigui.

Le strategie curative risultano sempre economicamente più sfavorevoli, tanto più che nell'esame delle rese non sono stati considerati i più che probabili decrementi determinati dalla presenza di infestanti sopravvissute.

Ulteriori sistemi colturali analizzati nell'ultimo biennio:

➤ Sistema riso

Le osservazioni ed i risultati descritti in seguito sono stati desunti dopo un'analisi complessiva dell'ambiente risicolo dell'areale ferrarese, considerando prevalentemente le più diffuse coltivazioni con semina su risaia allagata. Inoltre sono state fatte le prime valutazioni sulle emine interrate che, anche se in tendenziale aumento, se da un lato possono determinare relativamente minori problematiche iniziali, dall'altro presentano ancora molti inconvenienti, quali ad esempio una più difficile gestione dell'acqua, con difficoltà nella programmazione dei necessari trattamenti anticipati di post-emergenza, e soprattutto un appesantimento delle problematiche derivanti dalle infestazioni di riso crodo.

Criticità gestione convenzionale

Erbicidi utilizzati

L'impiego ripetuto negli anni nell'ambito di programmi di diserbo esclusivamente in post-emergenza con erbicidi a non esclusiva efficacia graminicidi con meccanismo d'azione ALS ha portato alla comparsa di popolazioni di *Echinochloa* spp. non perfettamente suscettibili o addirittura resistenti, con problematiche si sono costantemente aggravate a seguito dell'elevato potenziale di disseminazione della specie infestante graminacea.

Lavorazioni

Nella generalità delle situazioni, a differenza delle altre colture erbacee, nelle risaie non vi sono state variazioni nelle operazioni di preparazione del terreno, che prevedono una ripuntatura, aratura e nella maggior parte dei casi due interventi di affinamento con erpice rotante.

Rotazione.

Come già ricordato, l'estrema specializzazione della coltura e la complessità della gestione delle camere di coltivazione hanno portato ad adottare la monocoltura.

Gestione preventiva

Erbicidi

In funzione preventiva si è previsto di fare ricorso anche al diserbo preventivo di pre-semina (nelle colture a semina in acqua) o di pre-emergenza (nelle semine interrate), utilizzando molecole a meccanismo d'azione alternativo sia ad ACCasi che ad ALS, quali oxadiazon, pendimetalin, clomazone. Per gli interventi di post-emergenza si è previsto di alternanza dei meccanismi d'azione o nelle differenti epoche di intervento nello stesso ciclo colturale o in via subalterna preferire formulati graminicidi che contengano molecole con entrambi i meccanismi d'azione (ACCasi ed ALS).

Lavorazioni

Non si ritiene che sia da modificare il tipo di lavorazioni attualmente praticata, se non un leggero posticipo delle operazioni di semina con a ulteriore lavorazione del terreno o interventi con glifosate per eliminare eventuali ondate di germinazione di *Echinochloa* spp..

Rotazione

Anche se consapevoli delle difficoltà a cui si va incontro, quando la situazione degli inerbimenti diventa difficilmente gestibile, sarebbe opportuno interrompere la coltivazione del riso inserendo nella rotazione colture in cui vi è la possibilità di controllare più agevolmente le presenze di *Echinochloa* spp.

Gestione curativa

Erbicidi

In questo caso nella scelta dell'erbicida da utilizzare di devono necessariamente escludere quelli che agiscono sul meccanismo d'azione direttamente coinvolto. L'introduzione degli interventi ad azione preventiva di pre-semina o di pre-emergenza diventa una necessità imprescindibile. Sono da prevedere inoltre ulteriori trattamenti di post-emergenza tardiva di soccorso consapevoli dei forti incrementi dei costi.

Lavorazioni

Le raccomandazioni formulate per la gestione preventiva diventano imperativi: obbligatorie la falsa semina e la semina ritardata

Rotazione

Quando la gestione degli inerbimenti diventa praticamente impossibile e non accettabile anche dal punto di vista economico diventa imprescindibile la decisione di abbandonare temporaneamente la coltivazione del riso, inserendo nella rotazione aziendale colture in cui diventi possibile eliminare o ridurre il potenziale di infestazione di *Echinochloa* spp.. In molte situazioni la durata della rotazione che esclude la coltivazione del riso deve durare almeno 5 anni (esempio soia-frumento-soia-mais-soia) con la possibilità, individuando oculatamente i principi attivi più efficacia utilizzabili su queste colture sia in pre che post-emergenza, di riportare la situazione su livelli accettabili.

Misure supplementari

Per limitare la disseminazione delle infestanti sopravvissute e solo quando la densità dell'infestazione non è eccessiva, sarebbe utile procedere alla monda manuale o in alternativa valutare la possibilità di effettuare trattamenti sovrachioma con attrezzature selettive utilizzando formulati a base di glifosate.

Tabella 1 – Sistema riso

Infestante coinvolta	Gestione convenzionale
<i>Echinochloa</i> spp.	lavorazioni convenzionali (ripuntatura, aratura, affinamento con erpice rotante)
	Monocoltura
	trattamento di post-emergenza in 1° asciutta per il controllo di <i>Echinochloa</i> spp.
	trattamento di post-emergenza per il controllo delle altre infestanti
Infestante coinvolta	Gestione preventiva
<i>Echinochloa</i> spp.	lavorazioni convenzionali (ripuntatura, aratura, affinamento con erpice rotante)
	semina leggermente ritardata
	Trattamento di pre-semina con erbicidi ad azione residuale (semina in acqua)
	Trattamento di pre-emergenza con erbicidi ad azione residuale (semina interrata)
	alternanza meccanismo d'azione (ALS vs. ACCasi)
impiego contemporaneo meccanismi d'azione (ACCasi/ALS)	
Infestante coinvolta	Gestione curativa
<i>Echinochloa</i> spp.	lavorazioni convenzionali (ripuntatura, aratura, affinamento con erpice rotante)
	Semina ritardata
	Trattamento di post-emergenza precoce con meccanismo d'azione non coinvolto
	Trattamento di post-emergenza di soccorso tardivo con meccanismo d'azione non coinvolto
	monda manuale o distruzione chiazze o trattamento sovrachioma con glifosate
	Inserimento rotazione

Analisi risultati

Dall'esame dei risultati ottenuti, ribadendo innanzitutto che la problematica della resistenza di *Echinochloa* spp. agli erbicidi di post-emergenza non è il solo che occorre considerare, ma che la situazione in riso è enormemente complessa, emerge in primo luogo che anche su questa coltura le strategie preventive hanno un costo notevolmente inferiore rispetto a quelle curative. E' bene ricordare tuttavia che ormai la situazione è generalmente già compromessa e diventa alquanto difficile esaminare la situazione dal punto di vista preventivo, si escludono le nuove risaie. Molto più frequentemente si deve già considerare la situazione indicata come curativa. Dalle prime analisi delle diversificate situazioni, è emerso che la tecnica della semina interrata potrebbe risultare utile in funzione preventiva, con la possibilità di utilizzare al meglio erbicidi ad azione residuale, quali oxadiazon, pendimetalin e clomazone, con inoltre una leggera riduzione dei costi delle lavorazioni preparatorie (arature più superficiali) e della quantità di seme utilizzata.

Lavorazioni e gestione letto di semina

Per quanto concerne le lavorazioni di preparazione dei terreni non si reputano necessarie variazioni di sorta, in quanto le operazioni usualmente praticate risultano agronomicamente già più che razionali. Anche l'eventuale impiego di glifosate per eliminare le eventuali infestanti già emerse non in molti casi è strettamente indispensabile, tranne nei casi in cui sfavorevoli andamenti pluviometrici determinino un anomalo ed eccessivo sviluppo delle piante di *Echinochloa* spp., difficilmente eliminabili poi solo con le necessarie operazioni di affinamento del terreno prima della semina con erpice rotante. Unica possibile possibilità di relativo alleggerimento della situazione potrebbe essere determinata da un posticipo delle semine, con la possibilità quindi di eliminare il più possibile anche le ultimissime ondate di germinazione delle infestanti.

Erbicidi

Considerando l'attuale disponibilità di principi attivi e meccanismi d'azione, anche se nel prossimo futuro fortunatamente dovrebbero essere in arrivo novità sostanziali, in funzione preventiva si dovrebbero privilegiare gli interventi di pre-semina o pre-emergenza con erbicidi ad azione residuale caratterizzati da uno più o meno spiccata efficacia graminicida.

Per quanto riguarda i trattamenti di post-emergenza, diventa necessario, oltre ad evitare l'impiego del meccanismo d'azione coinvolto nella problematica, programmare razionalmente gli interventi in epoca precoce, evitando il più possibile pericolosi ritardi degli stessi, per poi completare la loro attività su eventuali ricacci nella tradizionale epoca più posticipata, utilizzando formulati caratterizzati da un differente meccanismo d'azione. Questa situazione si può ricondurre alla gestione preventiva dove, seppure con un importante incremento dei costi, è possibile prolungare la vitalità delle risaie.

Nelle situazioni più problematiche, dove le resistenze sono già state accertate e confermate, diventano poi necessari ulteriori interventi di soccorso, in questo caso però con un notevole peggioramento della situazione da punto di vista economico, considerando anche i deleteri effetti di competizione che hanno già esercitato le infestanti sopravvissute.

Tabella 2 – Simulazione sistema riso (gestione chimica)

Tipo di gestione	Incremento medio costi gestione chimica infestanti (%)
Convenzionale	0
Preventiva	36
Curativa	217

Rotazione

Ribadendo che l'interruzione della coltivazione del riso per adottare rotazioni diversificate è la soluzione estrema, indicata soprattutto nei casi in cui non è più gestibile la situazione resistenze, l'analisi delle considerazioni riportate in questo lavoro (tabella 3) risente fortemente del particolare e sfavorevole periodo che sta attraversando la coltura del riso, con una forte riduzione dei prezzi di mercato e, in particolare in quest'annata, anche con una generalizzata diminuzione delle rese. Non potendo intervenire sulla voce riduzione di costi, si evince che passando a rotazioni con altre colture estensive, oltre alla possibilità di risolvere in tempi più o meno lunghi le problematiche derivanti dalla presenza di infestanti resistenti, si possono mantenere inalterate le performance economiche. Ovviamente le specie da inserire nell'avvicendamento devono permettere l'impiego di erbicidi e meccanismi d'azione non ancora coinvolti, sfruttando l'azione preventiva ad esempio di s-metolaclo, petoxamide, flufenacet, e con la necessità, limitatamente alla soia, di utilizzare preparati ad azione specifica sulle infestanti graminacee, ripetendo eventualmente gli interventi in caso di necessità.

Misure supplementari

Nelle situazioni in la situazione è particolarmente preoccupante e si voglia limitare la disseminazione delle infestanti sfuggite anche dopo aver completato tutta la strategia di diserbo, una soluzione può essere rappresentata dalla monda manuale, anche se le difficoltà operative generalmente sono praticamente insormontabili. In alternativa si potrebbero valutare interventi di soccorso in epoca tardiva, quando le piante di *Echinochloa* spp. sovrastano quelle di riso, mediante applicazioni di glifosate con attrezzature selettive (barre lambenti, umettanti).

Tabella 3 – Simulazione sistema riso (rotazione)

Rotazione	differenza margine lordo annuale (€)		margine annuale lordo (€)	
	semina in acqua	semina interrata	semina in acqua	semina interrata
Rese medie (t/ha)	Riso		6,0	
	mais		10	
	soia		3,5	
	Frumento		6,0	
Riso	112	222		
Riso	112	222		
Riso	112	222		
Riso	112	222		
Riso	112	222		
Riso	112	222		
Riso	112	222	112	222
Riso	112	222		
Soia	100	100		
Frumento	260	260		
Soia	100	100		
Mais	50	50		
Soia	100	100		
Riso	112	222	119	151

Dall'esame complessivo dei risultati ottenuti, in primo luogo si evidenzia che, pur in presenza di una estrema complessità e variabilità della coltivazione del riso, nella pura gestione di *Echinochloa* spp. mediante il mezzo chimico, adottare strategie preventive consente di limitare fortemente il pur necessario incremento dei costi di gestione complessivi. Attendere che la situazione degeneri, oltre a comportare un evidente aggravio delle spese, determina ovviamente anche una sicuramente significativa perdita di produzione.

Non potendo agire in maniera determinante sulle modalità di preparazione del terreno destinato alla semina del riso e con la sola possibilità di ovviare a queste problematiche utilizzando nella maniera più razionale i pochi erbicidi e meccanismi d'azione disponibili, al momento attuale l'unica soluzione economicamente attuabile, in particolare nelle situazioni più difficili, è l'abbandono temporaneo della coltivazione del riso e l'adozione di una rotazione diversificata. Tra le colture indicate per tentare di azzerare o perlomeno di ridurre il potenziale di infestazione di *Echinochloa* spp. si prestano in particolare soia e mais, dove è possibile utilizzare erbicidi sia ad azione residuale che ad attività specifica fogliare. Questa estrema soluzione potrebbe essere facilitata dalle difficoltà che sta attraversando il settore risicolo, con un decremento dei prezzi di mercato e con rese produttive non soddisfacenti.

➤ **Sistema vigneto (Tabella 4)**

La maggior parte dei circa 55.000 ha investiti a vigneto della regione ER è gestita in modalità "difesa integrata". Non si utilizzano erbicidi per il controllo della flora infestante fra le fila mentre il controllo chimico delle infestanti lungo la fila (pari a circa 1/3 della superficie totale del vigneto) associato allo sfalcio/trinciatura della copertura vegetale fra le fila è senz'altro il metodo più diffuso di gestione. Questo tipo di conduzione è preferito per la sua economicità. Il contenimento del fabbisogno di ore lavoro /ha è una condizione assolutamente necessaria per garantire redditività alla coltura.

Nei nuovi impianti vengono ad essere sempre più meccanizzate anche operazioni come potatura e raccolta un tempo esclusivamente manuali e il controllo chimico delle infestanti lungo la fila è una pratica perfettamente coerente con questa tendenza.

Il controllo chimico delle infestanti lungo la fila è una pratica che se non oculatamente gestita potrebbe non risultare sostenibile nel tempo. Siamo in un contesto di coltura perenne con una aspettativa di vita produttiva di decenni per cui gli effetti di un' eccessiva pressione di selezione operata da strategie di diserbo troppo semplificate possono col tempo diventare molto importanti.

Da decenni il controllo chimico delle infestanti del vigneto è quasi esclusivamente realizzato solo con applicazioni di glifosate (inibitore dell' enzima EPSP sintetasi, gruppo HRAC= G.)

Facile individuarne le motivazioni:

- Costo basso
- Attività molto elevata e spettro d'azione ampio
- Attività solo fogliare (non c'è rischio di assorbimento radicale da parte della coltura)
- Possibilità di dosarlo a concentrazione
- Tossicologia favorevole
- Da sempre incluso nei disciplinari di produzione integrata

Un uso ripetuto e continuato negli anni dello stesso erbicida su terreni che non vengono lavorati è un potente strumento di selezione , sia di specie ruderali meno sensibili all' attività dell' erbicida che di popolazioni di specie sensibili con mutata sensibilità all' erbicida.

In ER, in particolare nelle provincie di RA, BO e FC sono però in aumento segnalazioni di mancato o insufficiente controllo di *Conyza*. Nell'ambito del progetto si sono raccolti semi da piante di *Conyza* sopravvissute ad interventi di glifosate e la resistenza a glifosate è stata confermata per varie popolazioni provenienti da diverse zone della regione.

Tabella 4 – Sistema vigneto

Infestante coinvolta	Gestione convenzionale
<i>Conyza</i>	Solo interventi chimici –utilizzo di solo glifosate- 3 interventi/anno
Infestante coinvolta	Gestione preventiva
<i>Conyza</i> -opzione A	Solo interventi chimici con più molecole a differente meccanismo d' azione.
	Più interventi annui (4)per colpire sempre solo infestanti poco sviluppate Lavorazioni solo nel caso di piante sopravvissute
<i>Conyza</i> -opzione B	Tre interventi chimici con più molecole a differente meccanismo d' azione. 1 Lavorazione per eliminare piante sopravvissute
Infestante coinvolta	Gestione curativa
<i>Conyza</i>	Solo lavorazioni meccaniche o sfalci ripetuti

Criticità gestione convenzionale

Erbicidi

Prevede solo applicazioni con glifosate.

Mediamente servono 3 applicazioni /anno utilizzando circa 1000 g ai/ha trattato (3 L/ha di formulati a 360 g ae/L) di glifosate per singolo intervento. Considerato che si tratta circa 1/3 della superficie totale, in Tabella 5 si riportano costi e tempi di esecuzione richiesti da questa gestione.

Gestione convenzionale	3 interventi/anno	
	costo (euro/ha)	tempo (h/ha)
Erbicidi	15	
Macchina Irroratrice	180	3
Totale	195	3

Gestione preventiva

Per ridurre la pressione di selezione della gestione convenzionale è opportuno diversificare gli erbicidi utilizzati e le strategie di intervento.

Una strategia preventiva per ridurre il rischio di insorgenza di biotipi di *Conyza* resistenti mantenendo una gestione esclusivamente chimica delle malerbe lungo la fila deve prevedere:

- l'inserimento di più molecole a differente meccanismo d'azione attive nei confronti di *Conyza*
- interventi con erbicidi fogliari solo su piante a stadi giovanili il che si traduce necessariamente in più interventi durante l'anno
- dosi adeguate degli erbicidi utilizzati.
- Nel caso che comunque sopravvivessero delle piante di *Conyza* va assolutamente impedito che queste vadano a seme.

Nel dettaglio si punta ad una applicazione con erbicidi di pre-emergenza (residuali) a fine inverno/inizio primavera e all'uso anche di erbicidi fogliari con meccanismo d'azione diverso da quello di glifosate. Relativamente alla possibilità di usare nei confronti di *Conyza* più molecole a differente meccanismo d'azione abbiamo ad oggi opzioni limitate. Oltre alla limitata disponibilità di molecole attive bisogna fare i conti con le dosi di glifosate utilizzabili durante l'anno che nei DPI sono limitate rispetto all'etichetta ministeriale dei prodotti. Secondo i DPI 2018 si possono utilizzare al 3240 g ae/ha anno (9 L/ha con formulati a 360 g ae/L), limite che scende a 2160 g ae/ha anno nel caso si utilizzino anche erbicidi residuali.

Fra gli erbicidi di pre-emergenza più idonei al contenimento di *Conyza* si individuano flazasulfuron gruppo HRAC B) e la miscela oryzalin+penoxulam (gruppo HRAC B+K1) preferibilmente alternati fra loro negli anni. Per il controllo di post-emergenza di *Conyza* in alternativa o in combinazione a glifosate si può utilizzare carfentrazone o pyraflufen etile (gruppo E).

Un programma tipo potrebbe essere questo:

(Opzione A) Residuale + glifosate a fine inverno, 2 interventi fogliari in primavera/estate (carfentrazone o pyraflufen +graminicida selettivo oppure carfentrazone o pyraflufen +glifosate), 1 intervento fogliare in autunno.

In autunno le infestanti sono destinate a rallentare il loro metabolismo per le basse temperature l'efficacia di glifosate è massima e 1000 g a.e./ha potrebbero bastare. A questo intervento dovrebbe seguire un intervento a fine inverno con prodotti residuali (alternando negli anni flazasulfuron e oryzalin+penoxulam) per un prolungato contenimento delle emergenze primaverili combinato con un'erbicida fogliare per eliminare le eventuali infestanti già emerse. Nella situazione più favorevole, in presenza di solo dicotiledoni annuali non troppo sviluppate (veroniche, senecio, stellaria) si può usare carfentrazone o pyraflufen, diversamente nel caso di infestazioni più complesse si dovrà optare per glifosate. Infine, con altri due interventi con erbicidi fogliari si dovrebbe garantire il controllo di *Conyza* fino a fine estate. Per questi interventi vi è la disponibilità di carfentrazone e/o pyraflufen e dell'eventuale quota di glifosate residua.

Perché questa strategia regga nel tempo è' fondamentale che non vi siano piante sopravvissute che vadano a seme. Se durante l'estate si riscontrano piante sopravvissute vanno eliminate prima che vadano a seme. Se la densità della popolazione di *Conyza* è modesta si può pensare ad un intervento manuale, diversamente si dovrà sostituire un intervento chimico con una lavorazione meccanica (opzione B). Questo intervento presuppone però che non vi siano ali gocciolanti posate a terra o leggermente interrato. Altrimenti andrebbe predisposta una nuova ala gocciolante fuori terra, con un costo quantificabile nell'ordine di 1400 euro/ha (materiali + manodopera) che andrebbe ad ammortizzarsi negli anni di vita del vigneto.

Per quanto riguarda l'opzione A (solo controllo chimico), prevedendo 4 applicazioni di erbicidi / anno i costi (sempre riferiti ad 1/3 della superficie totale del vigneto) diventano (Tabella 6):

Gestione preventiva	4 trattamenti/anno	
	costo (euro)	Tempo esecuzione (h)
Erbicidi	82-169	
Macchina irroratrice	240	4
Totale	318-409	4

Prevedendo 3 applicazioni di erbicidi / anno e una lavorazione meccanica (opzione B) i costi diventano (Tabella 7):

Gestione preventiva	3 trattamenti/anno	+ 1 lavorazione
	costo (euro/ha)	Tempo esecuzione (h/ha)
Erbicidi	62-139	
Macchina irroratrice	180	4
Erpicazione a dischi	200	3.3
Totale	440-510	7.3

Gestione curativa

Qualora il controllo chimico delle infestanti lungo la fila non risultasse più praticabile a causa della presenza di popolazioni di *Conyza* già resistenti a glifosate, non rimane che puntare a lavorazioni meccaniche o sfalci ripetuti. Per quanto riguarda le lavorazioni meccaniche le opzioni praticabili sono erpici a dischi o frese interfilari.

Ipotizzando per entrambi i metodi 3 interventi /anno i costi e i tempi di esecuzione potrebbero essere questi:

Gestione curativa	Lavorazioni (3 passaggi/anno)	
	costo (euro/ha)	Tempo esecuzione (h/ha)
Erpicatura a dischi	600	10
Fresatura	900	15

Volendo gestire le infestanti lungo la fila mediante lo sfalcio con ruota rientrante sarebbero necessari non meno di 5 interventi anno con i seguenti costi

Gestione curativa	Sfalci (5 passaggi/anno)	
	costo (euro/ha)	Tempo esecuzione (h/ha)
Ruota rientrante	1350	23

In un vigneto realizzato prevedendo il solo controllo chimico delle infestanti lungo la fila vi è la possibilità di avere l'ala gocciolante leggermente interrata. Come già evidenziato in precedenza, questa disposizione non è compatibile con una strategia di gestione delle infestante che preveda le lavorazioni del terreno.

Prendendo in considerazione questi risultati si può notare in primo luogo come l'adozione di una qualsiasi delle strategie di gestione della resistenza per la *Conyza* in vigneto comporti un aggravio nei costi di almeno 120 euro/ha rispetto alla gestione convenzionale, che si sottolinea non può essere ritenuta sostenibile nel medio periodo, basata sul solo diserbo con glifosate.

In particolare i costi e le ore di lavoro necessarie aumentano ogni volta che un diserbo chimico viene sostituito con un intervento meccanico, fino a raggiungere incrementi dei costi del 300-600% rispetto alla gestione convenzionale nel caso della gestione curativa basata sul solo controllo meccanico. Questo ultimo dato evidenzia chiaramente l'importanza di adottare una gestione preventiva che includa misure rivolte a minimizzare il rischio dell'evoluzione di resistenza al glifosate nelle popolazioni di *Conyza* dei vigneti dell'Emilia Romagna.

CONCLUSIONI DEL TRIENNIO

Dall'esame complessivo dei risultati ottenuti per i diversi sistemi colturali considerati possono essere tratte alcune conclusioni. In primo luogo, possiamo evidenziare che l'adozione di una qualsiasi strategia di gestione della resistenza (sia preventiva che curativa) comporta sempre un aggravio dei costi rispetto alla gestione convenzionale di riferimento. È necessario anche ricordare che le strategie convenzionali si stanno dimostrando non sostenibili nel medio periodo, come evidenziato dal crescente numero di popolazioni di infestanti resistenti agli erbicidi identificate in Emilia Romagna. Questo conferma che la resistenza agli erbicidi rappresenta un problema attuale e un costo reale per gli agricoltori.

La seconda conclusione è che adottando strategie preventive al fine di limitare o prevenire l'insorgenza di popolazioni di infestanti resistenti agli erbicidi, si ottiene un minore incremento dei costi di gestione, con il conseguente relativo minore decremento del margine lordo, rispetto alle corrispondenti gestioni curative. Le variazioni del margine più significative si evidenziano in rapporto alla diversificazione delle rotazioni colturali, soprattutto quando si prevede l'inserimento di colture a più bassa marginalità, quali sorgo e girasole. Questo è un problema particolarmente rilevante nei terreni non irrigui dove la scelta di potenziali colture alternative è limitata.

Le strategie curative risultano sempre economicamente più sfavorevoli, tanto più che nella stima delle rese non sono stati considerati i più che probabili decrementi determinati dalla presenza di infestanti sopravvissute. Inoltre nel caso del sistema vigneto l'adozione di gestioni curative comporta il necessario ricorso a lavorazioni meccaniche del suolo o sfalci lungo il filare e questo non permetterebbe l'utilizzo per l'irrigazione di ali gocciolanti interrate, un sistema di irrigazione largamente utilizzato in regione.

3.3 MESSA A PUNTO DI CANTIERI DI LAVORO PER IL CONTROLLO DELLE INFESTANTI CON RIDOTTO INPUT CHIMICO MEDIANTE TRATTAMENTI ERBICIDI LOCALIZZATI DI PRE- E POST-EMERGENZA

Uar: IBAF-CNR

Terremerse

CAB Massari

OBIETTIVO

Diminuire e razionalizzare l'uso degli erbicidi permette di ridurre la pressione di selezione da loro esercitata, e di conseguenza il rischio di selezionare popolazioni resistenti. Questo aspetto è di particolare rilevanza per alcuni erbicidi che possono fornire un importante contributo, in quanto hanno un diverso meccanismo di azione rispetto a quelli coinvolti nella resistenza, ma che sono caratterizzati da un profilo ecotossicologico peggiore. Una via per diminuire significativamente la quantità di erbicida utilizzata nelle colture a file larghe è la localizzazione del trattamento lungo la fila della coltura. La disponibilità di sistemi di guida assistita dei trattori rende questa più affidabile ed efficace perché permette di ridurre drasticamente la superficie di terreno trattata e di conseguenza l'impatto ambientale. A tal fine, si è validato un prototipo, sviluppato dall'azienda agricola CAB Massari di Ravenna con la supervisione di IBAF-CNR, per la distribuzione degli erbicidi di post-emergenza in una fascia larga 30 cm lungo la fila delle colture estive accoppiato con la sarchiatura dell'interfila. Questo permette una riduzione di almeno il 50% della quantità di erbicida distribuita per ettaro e quindi anche dell'impatto ambientale causato. La verifica della funzionalità di questo prototipo è stata fatta in condizione di campo, confrontandolo con un cantiere normale con distribuzione di erbicida a pieno campo ed un ulteriore cantiere basato sull'impiego di una seminatrice dotata di attrezzatura per il diserbo localizzato lungo le file della coltura. La prova sarà effettuata in uno scenario di agricoltura di precisione basata sull'uso del sistema di posizionamento RTK-GPS ad alta precisione per la guida assistita dei trattori per tutte le operazioni colturali.

ANNO 1

MATERIALI E METODI

Una prova di campo è stata condotta presso l'azienda agraria CAB Massari di Conselice (RA, 44°32'12.6"N 11°49'18.0" E) in un appezzamento coltivato a mais da insilato al fine di testare queste due soluzioni innovative per il controllo delle infestanti a basso input chimico, confrontandole con una gestione aziendale basata sul diserbo di pre-emergenza a pieno campo. Il suolo era del tipo -argilloso (46% argilla, 32% limo e 22% sabbia) con il 2,1% di sostanza organica. Lo schema sperimentale ha previsto il confronto di tre tesi distinte corrispondenti ai tre diversi cantieri di lavoro per il diserbo, ciascuna con due repliche, per un totale di 6 parcelle della dimensione di 0,5 ha. In particolare la prima tesi ha previsto la distribuzione con la seminatrice di precisione di erbicidi di pre-emergenza localizzati in una fascia larga 25 cm lungo la fila della coltura seguita da un intervento di sarchiatura. La seconda tesi si è basata sull'applicazione, effettuata con il prototipo sviluppato contemporaneamente alla prima sarchiatura, di erbicidi di post-emergenza localizzati in una fascia larga 25 cm lungo la fila della coltura. Occorre evidenziare che la superficie trattata con gli erbicidi in queste due tesi rappresentava solamente il 33% della superficie totale dell'appezzamento (una fascia trattata da 25 cm su un interfila da 75 cm). La terza tesi è infine rappresentata dal confronto aziendale e quindi con diserbo di pre-emergenza distribuito a pieno campo con una barra irroratrice al momento della semina seguito da una sarchiatura. La tabella 1 riporta le caratteristiche tecniche e operative peculiari delle tre tesi mentre gli altri aspetti della gestione agronomica (concimazione, lavorazioni del suolo, irrigazione) sono stati mantenuti invariati nelle tre tesi.

Sistemi di geo-referenziazione RTK/GPS insieme a sistemi di guida assistita dei trattori sono stati adottati per l'esecuzione di tutte le operazioni colturali per garantire la necessaria precisione e velocità. Le lavorazioni del suolo per la preparazione del letto di semina sono state effettuate durante l'autunno 2016. La semina della coltura (mais ibrido KWS Kelindos, 130 giorni di ciclo, classe FAO 600) è stata effettuata il giorno 3 Aprile 2017 e contestualmente è stata effettuata la distribuzione degli erbicidi di pre-emergenza

nelle tesi 2 e 3. Lo stesso giorno prima della semina è stata effettuata su tutto l'appezzamento la distribuzione con barra irroratrice semovente di glifosate per la pulizia del letto di semina. La distribuzione del diserbo di post-emergenza, con contemporanea sarchiatura, nella tesi 1 è stata realizzata il giorno 23 maggio 2017 con la coltura allo stadio di 5-6 foglie vere. Lo stesso giorno è stata effettuata la sarchiatura anche delle tesi 2 e 3. La concimazione è stata gestita mediante una distribuzione di digestato (pari a 27,8 kg N/ha) durante la lavorazione autunnale del terreno e da due interventi di copertura, il primo il 13 Aprile 2017 con 250 kg/ha di Rhizovit (35% di N per un totale di 87,5 kg N/ha) seguito da un secondo effettuato il giorno 04 Maggio 2017 con 180 kg/ha di N Force (30% di N per un totale di 60 kg N/ha). L'irrigazione è stata effettuata con un sistema di manichette forate e un turno di una-due volte settimanali in base alle necessità della coltura. La raccolta della coltura allo stadio ceroso per insilato è avvenuta il 9 Agosto 2017 e la produzione ottenuta nelle varie parcelle è stata misurata. Sono stati infine raccolti dei campioni di trinciato per stimare la % di umidità presente al momento della raccolta e quindi la produzione di sostanza secca. Tutte le operazioni colturali e la gestione della prova sono state condotte da parte dell'azienda CAB Massari.

L'attività sperimentale ha previsto inoltre lo svolgimento di rilievi da parte di IBAF-CNR per il monitoraggio della flora infestante (identificazione e densità delle specie presenti) in 20 aree di saggio fisse da 1 mq ciascuna, poste 10 lungo la fila della coltura e 10 nell'interfila, per ogni parcella. Questi rilievi sono stati effettuati il 12 Maggio 2017 prima del trattamento erbicida di post-emergenza per valutare l'infestazione iniziale nelle zone non trattate e ripetuti il 13 Giugno 2017 dopo il trattamento di post-emergenza e la sarchiatura per valutare l'efficacia del controllo delle infestanti ottenuto con le varie tesi. Un ultimo rilievo è stato effettuato il 27 Luglio 2017 in prossimità della raccolta della coltura per valutare la densità finale delle infestanti e la loro biomassa nelle varie parcelle. Per tutti i parametri misurati è stata poi calcolata la media (più errore standard) a livello di singola tesi.

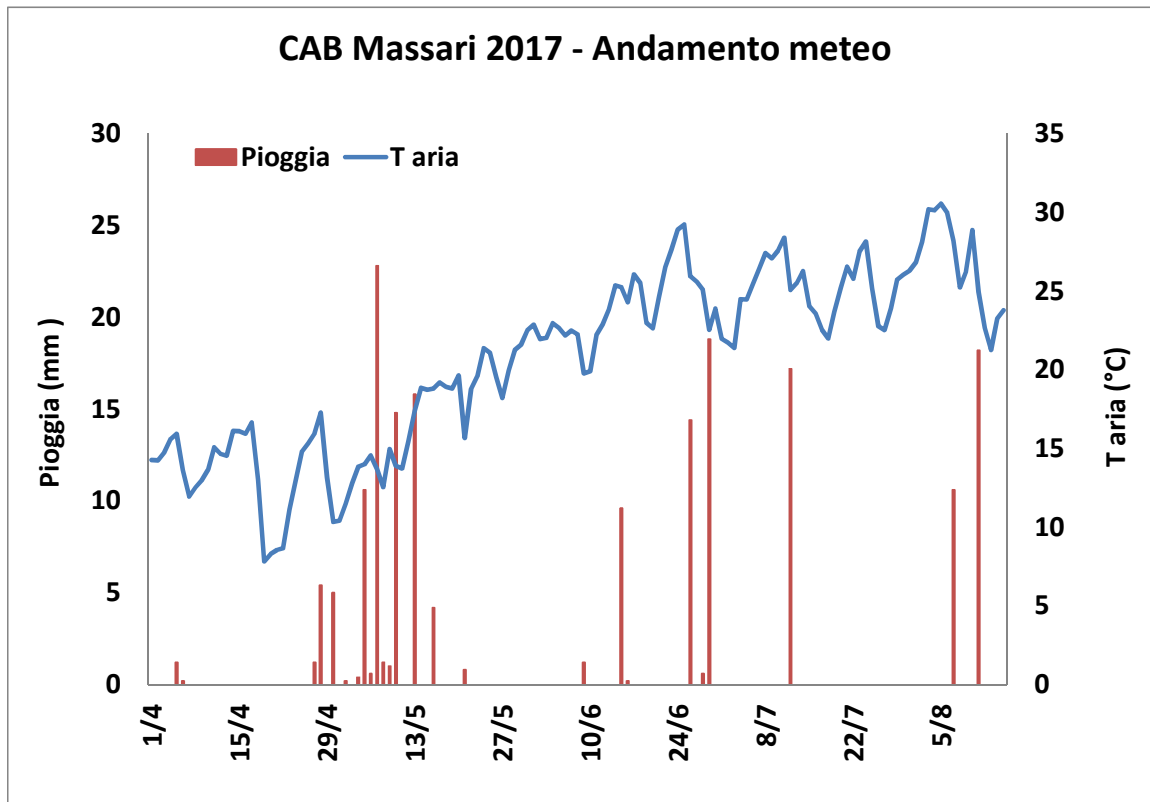
Tabella 1 Caratteristiche tecniche degli interventi di controllo delle infestanti nelle tre tesi

Data	Tesi 1 Post-loc	Tesi 2 Pre-loc	Tesi 3 Pre-pieno
03/04/17	Pulizia letto di semina Distribuzione pieno campo di glifosate (Roundup power 2.0, 360 g ae/L, dose 3 L/ha corrispondenti a 1080 g ae/ha) con volume di intervento di 300 L/ha	Pulizia letto di semina Distribuzione pieno campo di glifosate (Roundup power 2.0, 360 g ae/L, dose 3 L/ha corrispondenti a 1080 g ae/ha) con volume di intervento di 300 L/ha	Pulizia letto di semina Distribuzione pieno campo di glifosate (Roundup power 2.0, 360 g ae/L, dose 3 L/ha corrispondenti a 1080 g ae/ha) con volume di intervento di 300 L/ha
03/04/17		Diserbo di pre-emergenza Distribuzione localizzata con la seminatrice di thien carbazone-methyl e isoxaflutolo (Adengo, 20 g pa/L e 50 g pa/L, dose 0,6 L/ha corrispondente a 12 e 30 g pa/ha) con volume di intervento 100 L/ha	Diserbo di pre-emergenza Distribuzione pieno campo con barra irroratrice di thien carbazone-methyl e isoxaflutolo (Adengo, 20 g pa/L e 50 g pa/L, dose 1,8 L/ha corrispondente a 36 e 90 g pa/ha) con volume di intervento 300 L/ha
23/05/17	Diserbo di post-emergenza Distribuzione localizzata con il prototipo di sarchiatrice di mesotrione (Callisto 100 g pa/L, dose 0,3 L/ha corrispondente a 30 g pa/ha) e prosulfuron (Peak pa 75%, dose 10 g/ha corrispondenti a 7,5 g pa/ha) con volume di intervento di 180 L/ha		
23/05/17	Sarchiatura	Sarchiatura	Sarchiatura

RISULTATI

L'andamento meteo della campagna 2017 è stato caratterizzato dalla scarsità di precipitazioni e dalle temperature elevate (figura 1), comunque l'adozione di un'irrigazione periodica a goccia ha garantito la disponibilità idrica alla coltura.

Figura 1- Andamento meteo presso l'azienda CAB Massari durante il ciclo colturale del mais (01 Aprile – 15 Agosto 2017). Sono riportati i valori di pioggia giornaliera (mm) e temperatura media giornaliera dell'aria a 2 m (°C).



La flora infestante è stata caratterizzata dalla presenza di poche specie tipiche delle colture primaverili-estive, come *Solanum nigrum* e *Amaranthus* sp. e in modo minore *Chenopodium album* e *Convolvulus arvensis*. La densità osservata in zone non trattate nel periodo corrispondente all'applicazione di post-emergenza dell'erbicida oscillava tra 15 e 30 piante/mq (Figura 2). Non si tratta di densità elevatissime ma comunque in grado di determinare una forte riduzione delle rese del mais data la notevole capacità competitiva di queste specie infestanti. Nelle parcelle della Tesi 3 in cui era stata effettuata la distribuzione a pieno campo dell'erbicida di pre-emergenza la densità delle infestanti era minima. Dopo l'applicazione dell'erbicida di post-emergenza e la sarchiatura, la densità è scesa a meno di 5 piante/mq e si è mantenuta a livelli molto bassi fino alla raccolta in tutte le Tesi. Di conseguenza anche la biomassa delle infestanti presenti alla raccolta era a livelli molto bassi, inferiori a 10 g/mq di peso fresco (Figura 3). Questo evidenzia il livello ottimale di controllo delle infestanti ottenuto in tutte le tesi testate, comprese quelle a ridotto uso di erbicidi.

Figura 2- Densità delle infestanti osservata lungo la fila della coltura e nell'interfila nei tre successivi rilievi (12/5 rappresenta il rilievo del 12 Maggio 2017 cioè prima del trattamento post-emergenza e sarchiatura, 13/6 quello del 13 giugno dopo la sarchiatura, 27/7 quello finale del 27 Luglio prima della raccolta). Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.

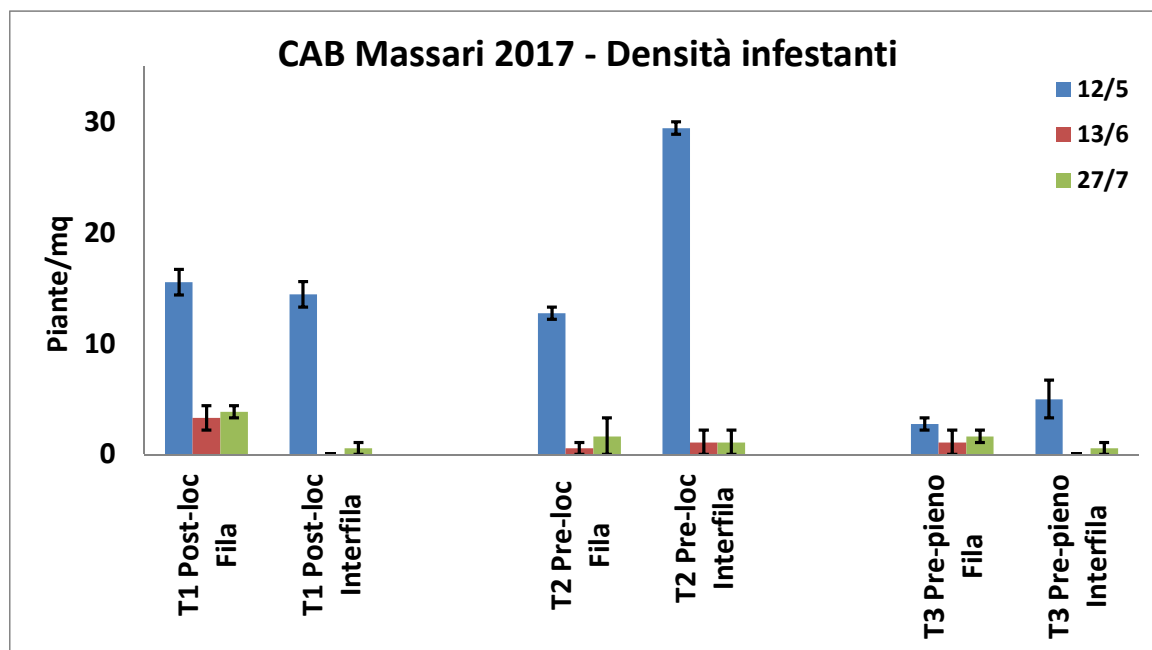
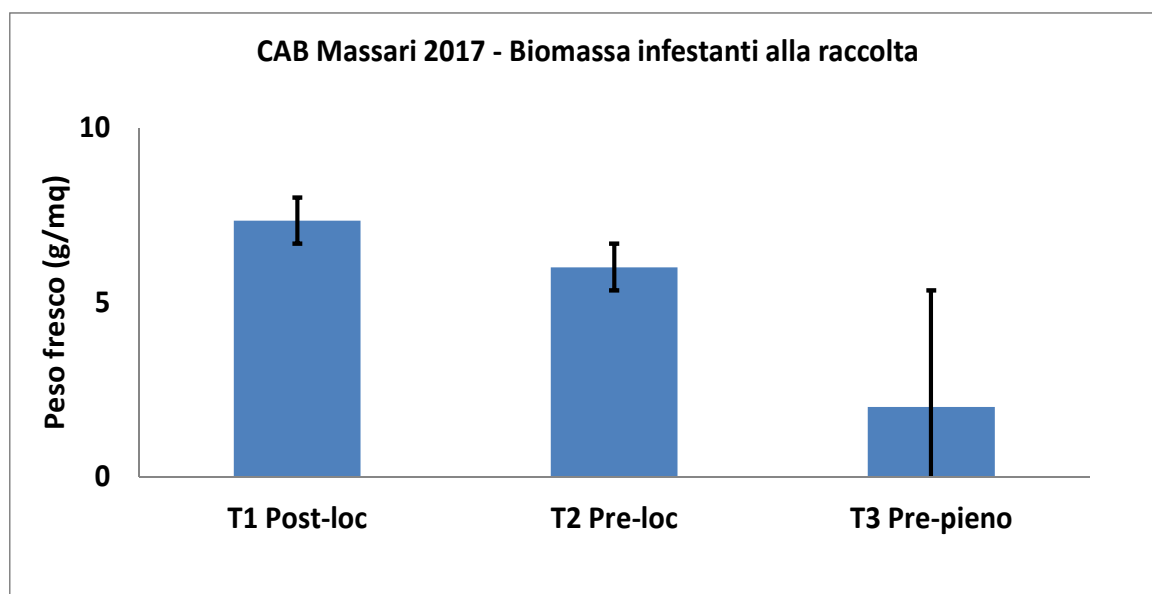
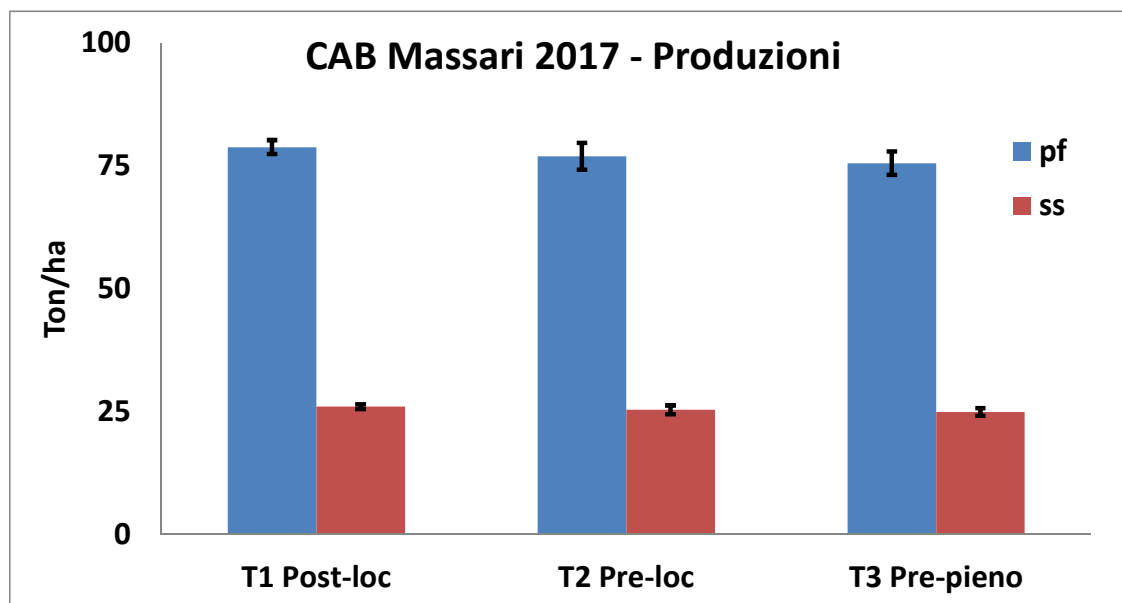


Figura 3- Biomassa delle infestanti, espressa come peso fresco, misurata in occasione del rilievo finale del 27 Luglio 2017 prima della raccolta. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.



Allo stesso modo, anche le produzioni di mais trinciato sono state soddisfacenti e sostanzialmente identiche nelle tre tesi, con valori intorno alle 75-80 ton/ha di peso fresco che, data un'umidità relativa del 66% circa, corrisponde ad una produzione di 25-26 ton/ha di sostanza secca (Figura 4).

Figura 4- Produzione di mais trinciato, espressa come peso fresco (pf) e sostanza secca (ss), ottenute nelle varie tesi. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 2 repliche.



CONCLUSIONI

I risultati della sperimentazione di campo del 2017 sono stati positivi ed incoraggianti, evidenziando la possibilità di ottenere buoni livelli di controllo delle infestanti con l'adozione di strategie di gestione a basso input di erbicidi, e con risultati produttivi per il mais del tutto comparabili con quelli della gestione tradizionale. Occorre evidenziare che le due tesi che prevedevano la distribuzione localizzata degli erbicidi (Tesi 1 post-emergenza e Tesi 2 pre-emergenza) hanno comportato una riduzione del 50 e 66% rispettivamente della dose di principi attivi applicata per ettaro in confronto ad una distribuzione a pieno campo tradizionale. Questo chiaramente comporta una notevole riduzione dell'impatto ambientale in generale e nelle acque in particolare legato all'uso degli erbicidi oltre che un risparmio economico per l'azienda agricola.

L'andamento meteo particolarmente secco della stagione 2017 può aver limitato l'emergenza delle piante infestanti e quindi influenzato i risultati ottenuti, pertanto sarà importante rivalutare i risultati con la prevista prova nella stagione 2018 per poter confermare queste indicazioni.

ANNO 2 e 3

MATERIALI E METODI

Dopo gli incoraggianti risultati ottenuti nella campagna del 2017, che hanno evidenziato la possibilità di ottenere buoni livelli di controllo delle infestanti e di rese del mais con l'adozione di strategie di gestione a basso input di erbicidi, nel 2018 la sperimentazione è stata ripetuta realizzando due distinte prove di campo presso l'azienda CAB Massari di Conselice (RA, 44°32'12.6"N 11°49'18.0" E) con lo stesso disegno sperimentale e protocollo del 2017. La coltura considerata è stata nuovamente il mais da insilato. Il suolo dei due appezzamenti (Cassone Fabbri, Valle Monti) era del tipo argilloso (40-42% argilla, 36-38% limo e 24-29% sabbia) con circa il 2% di sostanza organica. Lo schema sperimentale ha previsto il confronto di tre tesi distinte corrispondenti ai tre diversi cantieri di lavoro per il diserbo, ciascuna con 4 repliche, per un totale di 12 parcelle della dimensione di 0,25 ha ciascuna.

In particolare la prima tesi ha previsto la distribuzione con la seminatrice di precisione di erbicidi di pre-emergenza localizzati in una fascia larga 25 cm lungo la fila della coltura seguita da un intervento di sarchiatura. La seconda tesi si è basata sull'applicazione, effettuata con il prototipo sviluppato contemporaneamente alla prima sarchiatura, di erbicidi di post-emergenza localizzati in una fascia larga 37.5 cm lungo la fila della coltura. Occorre evidenziare che la superficie trattata con gli erbicidi in queste due tesi rappresentava solamente il 33% della superficie totale dell'appezzamento (una fascia trattata da 25 cm su un interfila da 75 cm). La terza tesi è infine rappresentata dal confronto aziendale e quindi con

diserbo di pre-emergenza distribuito a pieno campo con una barra irroratrice al momento della semina seguito da una sarchiatura. La tabella 1 riporta le caratteristiche tecniche e operative peculiari delle tre tesi mentre gli altri aspetti della gestione agronomica (concimazione, lavorazioni del suolo, irrigazione) sono stati mantenuti invariati nelle tre tesi.

Sistemi di geo-referenziazione RTK/GPS insieme a sistemi di guida assistita dei trattori sono stati adottati per l'esecuzione di tutte le operazioni colturali per garantire la necessaria precisione e velocità. Le lavorazioni del suolo per la preparazione del letto di semina sono state effettuate durante l'autunno 2017. La semina della coltura (mais ibrido KWS Kontigos, 130 giorni di ciclo, classe FAO 600) è stata effettuata il giorno 17 Aprile 2018 e contestualmente è stata effettuata la distribuzione degli erbicidi di pre-emergenza nelle tesi 2 e 3. Lo stesso giorno della semina è stata effettuata su tutto l'appezzamento la distribuzione con barra irroratrice semovente di glifosate (1080 g ae/ha) per la pulizia del letto di semina. La distribuzione del diserbo di post-emergenza, con contemporanea sarchiatura, nella tesi 1 è stata realizzata il giorno 25 maggio 2018 con la coltura allo stadio di 5-6 foglie vere. Lo stesso giorno è stata effettuata la sarchiatura anche delle tesi 2 e 3. La concimazione è stata gestita mediante una distribuzione di digestato (pari a 27,8 kg N/ha) durante la lavorazione autunnale del terreno e da due interventi di copertura, il primo in Aprile con 250 kg/ha di Rhizovit (35% di N per un totale di 87,5 kg N/ha) seguito da un secondo effettuato in Maggio con 180 kg/ha di N Force (30% di N per un totale di 60 kg N/ha). L'irrigazione è stata effettuata con un sistema di manichette forate e un turno di una-due volte settimanali in base alle necessità della coltura. La raccolta della coltura allo stadio ceroso per insilato è avvenuta il 11 Agosto 2018 e la produzione ottenuta nelle varie parcelle è stata misurata. Sono stati infine raccolti dei campioni di trinciato per stimare la % di umidità presente al momento della raccolta e quindi la produzione di sostanza secca. Tutte le operazioni colturali e la gestione della prova sono state condotte da parte dell'azienda CAB Massari.

L'attività sperimentale ha previsto inoltre lo svolgimento di rilievi da parte di IPSP-CNR per il monitoraggio della flora infestante (identificazione e densità delle specie presenti) in 20 aree di saggio fisse da 1 mq ciascuna, poste 10 lungo la fila della coltura e 10 nell'interfila, per ogni parcella. Questi rilievi sono stati effettuati il 25 Maggio 2018 prima del trattamento erbicida di post-emergenza per valutare l'infestazione iniziale nelle zone non trattate e ripetuti il 26 Giugno 2018 dopo il trattamento di post-emergenza e la sarchiatura per valutare l'efficacia del controllo delle infestanti ottenuto con le varie tesi. Un ultimo rilievo è stato effettuato il 30 Luglio per valutare la densità finale delle infestanti e la loro biomassa nelle varie parcelle. Per tutti i parametri misurati è stata poi calcolata la media (più errore standard) a livello di singola tesi.

Tabella 1 Caratteristiche tecniche degli interventi di controllo delle infestanti nelle tre tesi

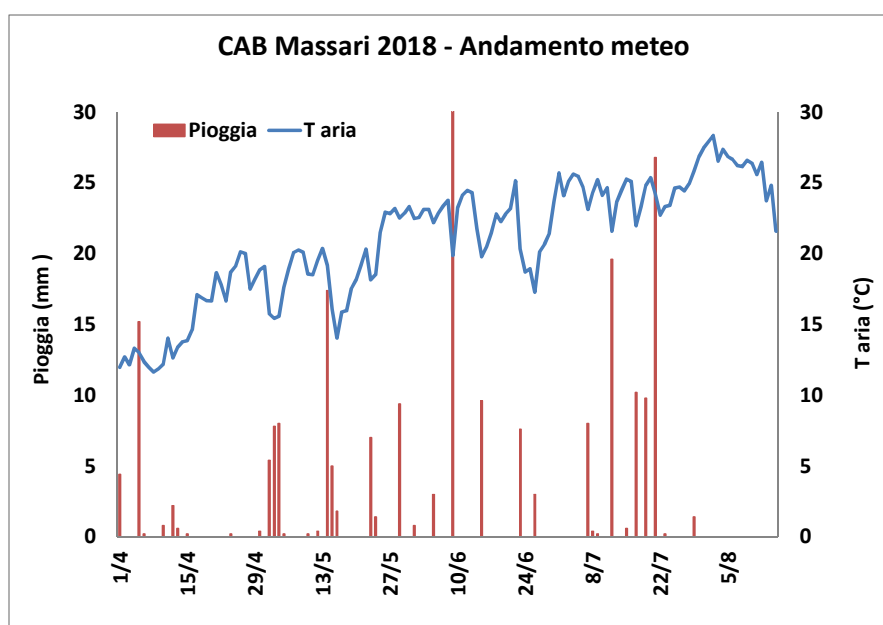
Data	Tesi 1 Post-loc	Tesi 2 Pre-loc	Tesi 3 Pre-pieno
17/04/18	Pulizia letto di semina Distribuzione pieno campo di glifosate (Roundup power 2.0, 360 g ae/L, dose 3 L/ha corrispondenti a 1080 g ae/ha) con volume di intervento di 300 L/ha	Pulizia letto di semina Distribuzione pieno campo di glifosate (Roundup power 2.0, 360 g ae/L, dose 3 L/ha corrispondenti a 1080 g ae/ha) con volume di intervento di 300 L/ha	Pulizia letto di semina Distribuzione pieno campo di glifosate (Roundup power 2.0, 360 g ae/L, dose 3 L/ha corrispondenti a 1080 g ae/ha) con volume di intervento di 300 L/ha
17/04/18		Diserbo di pre-emergenza Distribuzione localizzata con la seminatrice di thiencarbazono-methyl e isoxaflutolo (Adengo, 20 g pa/L e 50 g pa/L, dose 0,6 L/ha corrispondente a 12 e 30 g pa/ha) con volume di intervento 100 L/ha	Diserbo di pre-emergenza Distribuzione pieno campo con barra irroratrice di thiencarbazono-methyl e isoxaflutolo (Adengo, 20 g pa/L e 50 g pa/L, dose 1,8 L/ha corrispondente a 36 e 90 g pa/ha) con volume di intervento 300 L/ha
25/05/18	Diserbo di post-emergenza Distribuzione localizzata con		

	il prototipo di sarchiatrice di mesotrione (Callisto 100 g pa/L, dose 0,3 L/ha corrispondente a 30 g pa/ha) e prosulfuron (Peak pa 75%, dose 10 g/ha corrispondenti a 7,5 g pa/ha) con volume di intervento di 150 L/ha		
25/05/18	Sarchiatura	Sarchiatura	Sarchiatura

RISULTATI

L'andamento meteo della campagna 2018 è stato caratterizzato da una maggiore piovosità, soprattutto nei mesi di giugno e luglio, rispetto al 2017 (figura 1), queste condizioni insieme all'adozione di un'irrigazione periodica a goccia hanno garantito una disponibilità idrica ottimale alla coltura.

Figura 1- Andamento meteo presso l'azienda CAB Massari durante il ciclo culturale del mais (01 Aprile – 15 Agosto 2018). Sono riportati i valori di pioggia giornaliera (mm) e temperatura media giornaliera dell'aria a 2 m (°C).



La flora infestante è stata caratterizzata dalla presenza di poche specie tipiche delle colture primaverili-estive, come *Convolvulus arvensis*, *Echinochloa crus-galli*, *Polygonum persicaria* e *Solanum nigrum*. La densità osservata in zone non trattate nel periodo corrispondente all'applicazione di post-emergenza dell'erbicida era circa 5 piante/mq (Figura 2). Non si tratta di densità elevate ma bisogna considerare che queste specie di infestanti hanno una notevole capacità competitiva in grado comunque di determinare una forte riduzione delle rese del mais.

Nelle parcelle della Tesi 3 in cui era stata effettuata la distribuzione a pieno campo dell'erbicida di pre-emergenza la densità delle infestanti era minima. Dopo l'applicazione dell'erbicida di post-emergenza e la sarchiatura, la densità è scesa a meno di 0,1 pianta/mq e si è mantenuta a livelli molto bassi fino alla raccolta in tutte le Tesi. Di conseguenza la biomassa delle infestanti presenti alla raccolta era a livelli molto bassi, tali da non poter essere misurata accuratamente.

Le produzioni di mais trinciato sono state soddisfacenti e senza differenze significative nelle tre tesi, con valori medi intorno alle 56,0 t ha⁻¹ per Cassone Fabbri e 63,5 t ha⁻¹ per Valle Monti di peso fresco di trinciato con un'umidità relativa del 70% circa (Figura 3). L'unica differenza significativa identificata è stata la maggiore resa ottenuta con la tesi T2 (pre-emergenza localizzato) a Valle Monti.

Figura 2- Densità delle infestanti osservata lungo la fila della coltura e nell'interfila nei tre successivi rilievi (25 Maggio 2018 cioè prima del trattamento post-emergenza e sarchiatura, 27 Giugno 2018 cioè un mese dopo la sarchiatura e quello finale del 30 Luglio 2018 prima della raccolta). Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 4 repliche.

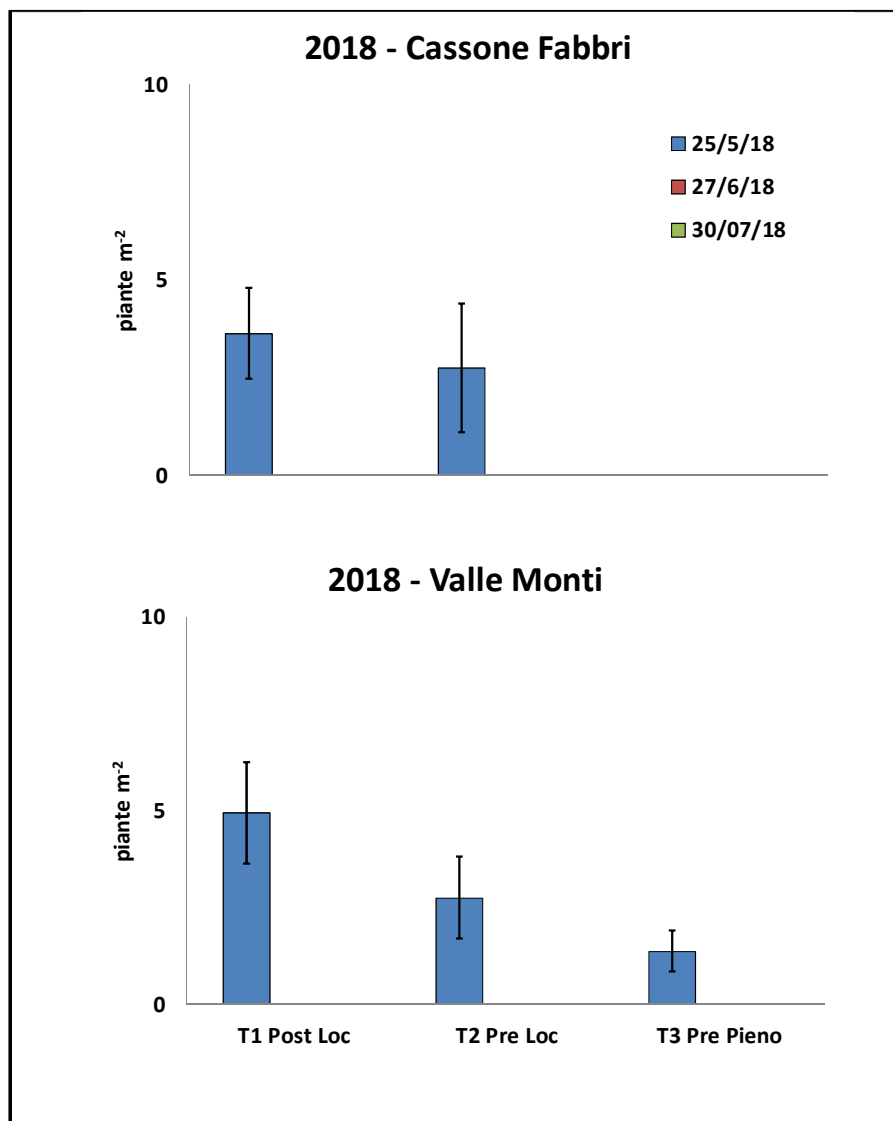
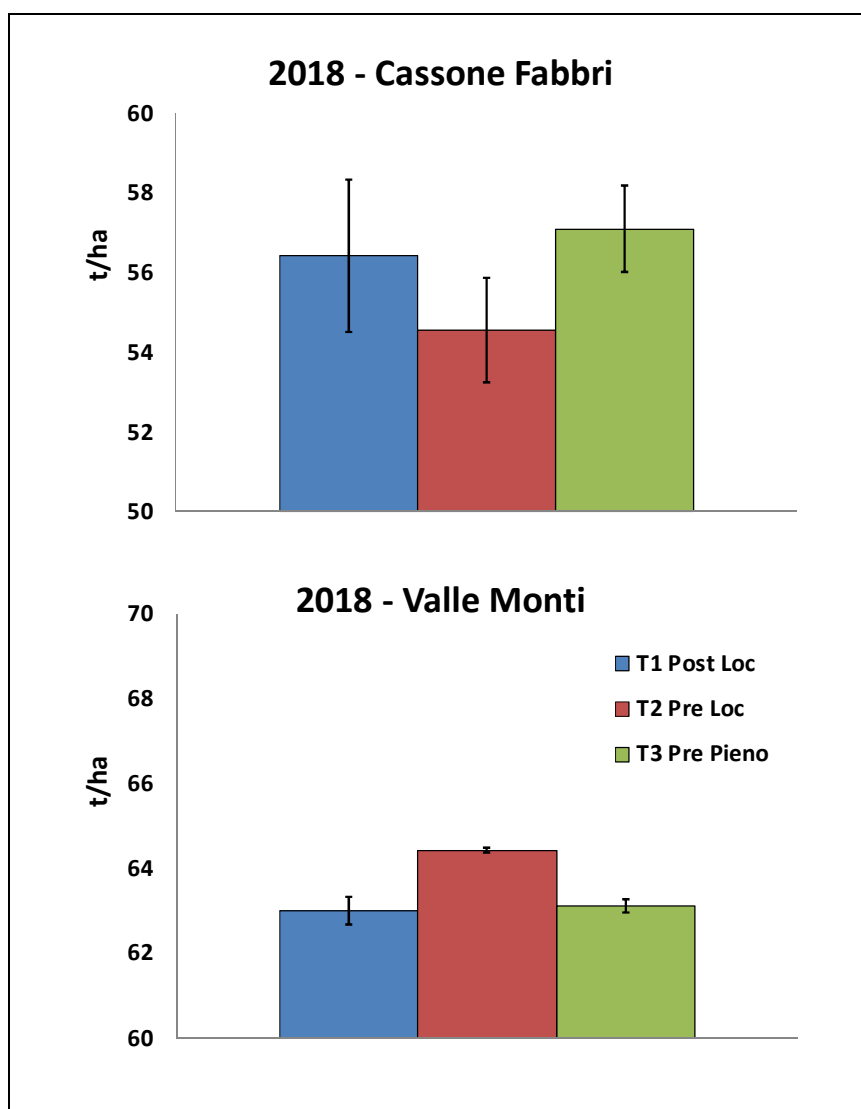


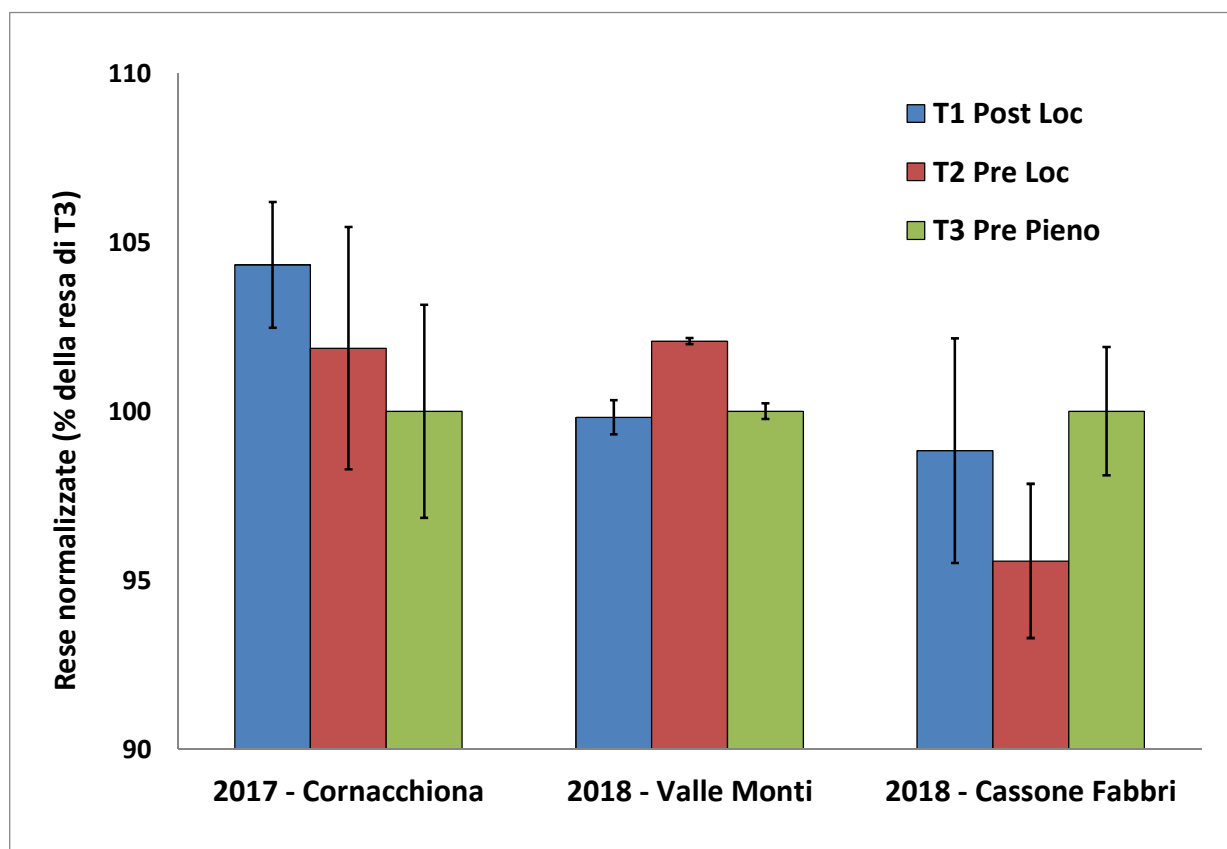
Figura 3- Produzioni di mais trinciato, espressa come peso fresco, ottenute nelle varie tesi. Le barre indicano gli errori standard delle medie delle 4 repliche.



CONCLUSIONI

Analizzando i risultati della sperimentazione di campo delle due annate 2017 e 2018 si possono trarre conclusioni incoraggianti. In ciascuno dei tre esperimenti condotti, buoni livelli di controllo delle infestanti sono stati ottenuti con l'adozione di strategie di gestione a basso input di erbicidi, e con risultati produttivi per il mais del tutto comparabili con quelli della gestione tradizionale. Per facilitare il confronto tra le rese ottenute in esperimenti diversi, i dati di produzione sono stati normalizzati, trasformandoli prima da peso fresco a sostanza secca e poi esprimendoli come percentuale della resa media ottenuta con la tesi aziendale di riferimento (tesi T3 pre-emergenza a pieno campo) in quello specifico esperimento. Si può quindi notare che valori simili di produzioni medie sono stati ottenuti con tutte le tesi nei vari esperimenti, con i valori relativi alle tesi con diserbo localizzato (T1 e T2) che oscillavano come range dal 95 al 105% della tesi T3 ma senza la presenza di tendenze chiare (Figura 4).

Figura 4- Produzioni di mais trinciato ottenute nelle varie tesi, i valori sono stati normalizzati all'interno di ogni esperimento ed espressi come percentuali della produzione media della tesi aziendale di riferimento (T3) di quello specifico esperimento. I valori sono la media di 4 repliche, le barre rappresentano gli errori standard.



Occorre infine evidenziare che le due tesi che prevedevano la distribuzione localizzata degli erbicidi (T1 post-emergenza e T2 pre-emergenza) hanno comportato una riduzione del 50 e 66% rispettivamente della dose di principi attivi applicata per ettaro in confronto ad una distribuzione a pieno campo tradizionale. Questo chiaramente comporta una notevole riduzione dell'impatto ambientale in generale e nelle acque in particolare legato all'uso degli erbicidi oltre che un risparmio economico per l'azienda agricola.

CONCLUSIONI DEL TRIENNIO (dell'intera sottoazione 3)

Nell'ambito dell'attività 3.1, complessivamente sono stati raccolti e testati 82 campioni di cui 57 sono risultati resistenti ad almeno un erbicida. Sono coinvolti 7 generi di infestanti in diversi sistemi colturali: *Alopecurus*, *Avena*, *Lolium* e *Papaver* in frumento, giavoni in mais, amaranti in soia/pisello, soia/pomodoro e *Conyza* in colture arboree (vigneti, frutteti). La situazione è in veloce evoluzione per *Amaranthus* spp., papavero, alopecuro e *Conyza* spp.

Dall'esame complessivo dei risultati ottenuti nell'attività 3.2 che ha analizzato i costi della resistenza a livello di azienda agricola, si conferma che la resistenza è in ogni caso un costo. L'adozione di una qualsiasi strategia di gestione della resistenza (sia preventiva che curativa) comporta sempre un aggravio dei costi rispetto alla gestione convenzionale di riferimento. È necessario anche ricordare che le strategie convenzionali si stanno dimostrando non sostenibili nel medio periodo, come evidenziato dal crescente numero di popolazioni di infestanti resistenti agli erbicidi identificate in Emilia Romagna. Questo conferma che la resistenza agli erbicidi rappresenta un problema attuale e un costo reale per gli agricoltori. Adottando strategie preventive al fine di limitare o prevenire l'insorgenza di popolazioni di infestanti resistenti agli erbicidi, si ottiene un minore incremento dei costi di gestione, con il conseguente relativo minore decremento del margine lordo, rispetto alle corrispondenti gestioni curative. Le strategie curative risultano sempre economicamente più sfavorevoli, tanto più che nella stima delle rese non sono stati considerati i

più che probabili decrementi determinati dalla presenza di infestanti sopravvissute. La diminuzione di margine lordo è particolarmente evidente in vigneto e dove è necessario cambiare radicalmente la rotazione colturale.

L'attività 3.3 si è occupata della messa a punto di cantieri di lavoro per il controllo delle infestanti con ridotto input chimico mediante trattamenti erbicidi localizzati di pre- e post-emergenza. In particolare, si è validato un prototipo per la distribuzione degli erbicidi di post-emergenza in una fascia larga 30 cm lungo la fila delle colture estive accoppiato con la sarchiatura dell'interfila. Questo permette una riduzione di almeno il 50% della quantità di erbicida distribuita per ettaro e quindi anche dell'impatto ambientale causato. La sperimentazione è stata fatta in uno scenario di agricoltura di precisione basata sull'uso del sistema di posizionamento RTK-GPS ad alta precisione per la guida assistita dei trattori per tutte le operazioni colturali. Dai risultati della sperimentazione di campo si possono trarre conclusioni incoraggianti. Buoni livelli di controllo delle infestanti sono stati ottenuti con l'adozione di strategie di gestione a basso input di erbicidi, e con risultati produttivi per il mais del tutto simili con quelli della gestione tradizionale. Le due tesi che prevedevano la distribuzione localizzata degli erbicidi hanno comportato una riduzione del 50 e 66% rispettivamente della dose di principi attivi applicata per ettaro in confronto ad una distribuzione tradizionale a pieno campo. Questo chiaramente comporta una notevole riduzione dell'impatto ambientale in generale e nelle acque in particolare legato all'uso degli erbicidi oltre che un risparmio economico per l'azienda agricola.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Tutte le attività previste sono state completate

3.2 Personale

Nome Cognome	Unità Aziendale responsabile	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo totale
	UNIMORE	Ricercatore	Tecnico	130	3.771,30
	UNIMORE	Ricercatore	Tecnico	255	7.397,55
	UNIBO	Ricercatore	Tecnico analisi	130	3.770,00
	UNIBO	Tecnico	Tecnico analisi	270	4.860,00
	UNIBO	Assegnista	Tecnico analisi	143	1.995,00
	UNIBO	Assegnista	Tecnico analisi	1003	13.965,00
	UNIBO	Assegnista	Tecnico analisi	1548	21.546,00
	UNIBO	Assegnista	Tecnico analisi	1720	23.940,00
	UCSC	Personale senior	Tecnico	155	6.402,55
	UCSC	Personale senior	Tecnico	243	8.451,54
	UCSC	Tecnico	Tecnico	176	6.077,22
	Terremerse	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	119	1.926,61
	Terremerse	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	239	4.942,52
	Terremerse	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	16	330,88
	IBAF-CNR	Ricercatore	Tecnico	819	22.197,50
	IBAF-CNR	Ricercatore	Tecnico	357	17.908,96
	Cereali Padenna	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	158	2.943,43
	Cereali Padenna	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	104	1.937,46
	CAB MASSARI S.C.	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	108	3.824,28
	CAB MASSARI S.C.	Impiegato tecnico	Tecnico di prova	110	2.436,50
	CAB MASSARI S.C.	OTD	operaio a supporto	89	1.687,44
TOTALE					162.311,74

3.3 Trasferte

Nome Cognome	Unità Aziendale Responsabile	Descrizione	Costo
	UCSC	Rilievi prove sperimentali	3.177,40
	IBAF-CNR	Rilievi prove sperimentali	237,49
		Totale	3.414,89

3.4 Collaborazioni, consulenze, altri servizi

CONSULENZE - PERSONE FISICHE

Nominativo del consulente	Unità Aziendale Responsabi	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
Innovaricerca srl	CRPV	14.000	Attività 2.4.1	7.000
			Totale	7.000

AZIONE 4 – PIANO DI DIVULGAZIONE DI TRASFERIMENTO DEI RISULTATI E IMPLEMENTAZIONE DELLA RETE PEI

4.1 Attività e risultati

Azione
Azione 4 - DIVULGAZIONE
Unità aziendale responsabile (Uar)
CRPV
Descrizione attività
<p>La divulgazione dell'innovazione alle imprese agricole e operatori del settore agricolo, rappresenta un'azione fondamentale del piano. Il CRPV ha attivato il proprio personale per sviluppare questa attività sin dalle prime fasi del progetto.</p> <p>Uno degli obiettivi di questa azione è di concretizzare un efficace collegamento funzionale <i>multi actor</i> tra innovazione, trasferimento e applicazione, e stimolare lo sviluppo e applicazione dell'innovazione lungo la filiera.</p> <p>La fase di divulgazione ha pertanto perseguito l'obiettivo di diffondere le informazioni-innovazioni valutate nel corso del piano, non solo ai membri del GO ma ad una più ampia gamma di <i>stakeholders</i> del settore agricolo. Il CRPV ha messo a disposizione del GO un indirizzario che conta migliaia utenti, una mailing list di oltre 1.500 indirizzi, un portale che conta circa 10.000 visitatori all'anno oltre a considerare che già la sua base sociale contribuisce nel suo complesso a produrre circa il 60% della PLV vegetale regionale.</p> <p>Come preventivato nel Progetto, il Piano di Comunicazione è stato sviluppato dall'operato del personale CRPV, al fine di sviluppare una "Comunicazione sostenibile", ossia organizzare iniziative utili a mostrare i risultati via via raggiunti dalle attività del progetto e sistemi di divulgazione logisticamente tali da limitare quanto più possibile gli spostamenti degli utenti (ad esempio organizzando incontri tecnici disseminati sul territorio regionale piuttosto che accentrati in poche sedi) pur garantendo una visibilità massima delle innovazioni che meritavano evidenza sin dalle prime fasi di sviluppo del Piano.</p> <p>Parte delle iniziative sono state realizzate infatti presso le sedi delle Strutture socie di CRPV e/o partecipanti al GO, in modo da garantire una diffusione su diverse zone del territorio regionale, selezionandole in funzione della vocazionalità del territorio, con l'obiettivo appunto di portare le competenze ed i risultati dell'innovazione, il più possibile vicino agli utilizzatori finali ossia le imprese agricole.</p> <p>In accordo con i partner del GO, il personale CRPV ha quindi organizzato e gestito diverse iniziative e azioni di diffusione che sono descritte in Tabella 1.</p> <p>In totale, dall'1 settembre 2016 al 14 ottobre 2019, sono stati realizzati: 2 visite guidate in campo, 14 incontri tecnici, 7 articoli e 1 presentazione in ambito internazionale, 1 audiovisivo e 10 campus clouds</p> <p>Tutte le iniziative svolte hanno rappresentato anche momenti di discussione e confronto sul tema oggetto dell'evento, permettendo così un utile scambio di esperienze e risposte a vantaggio di tutti i partecipanti e del GO stesso.</p> <p>Inoltre il CRPV ha messo a disposizione del GO il proprio Portale Internet, affinché le attività ed i risultati conseguiti nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza. All'interno del portale CRPV è stata predisposta una pagina dedicata al Piano (https://progetti.crpv.it/Home/ProjectDetail/10), composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto e i primi aggiornamenti relativi alle attività condotte. Inoltre attraverso un contatto continuo con il Responsabile di Progetto, un referente CRPV ha proceduto all'aggiornamento della pagina con notizie, informazioni e materiale divulgativo ottenuti durante lo sviluppo del Piano. Questo spazio permetterà, unitamente alla pubblicazione dei risultati, la consultazione dell'elenco dei Piani coordinati da CRPV, dal quale, selezionando un singolo Piano/progetto si accederà ad una nuova pagina simile a quella del Portale CRPV, con cui si potranno vedere i dettagli delle attività. Questo strumento comunicativo e divulgativo consentirà altresì di poter visionare collegamenti e sinergie che il presente piano può avere anche con altri progetti e/o iniziative.</p> <p>Come indicato in Tabella 1, il CRPV ha organizzato, coinvolgendo sin dalla fase organizzativa i referenti tecnici del Servizio Fitosanitario regionale ed i Partner del presente GO, 10 Campus Clouds. Questo momento di confronto ha visto il coinvolgimento dei partner del GO, di tecnici delle diverse imprese afferenti alla base sociale del CRPV, specificatamente invitati allo scopo, e ad esperti tecnici sia del Servizio Fitosanitario regionale che della Regione Emilia Romagna, permettendo un confronto diretto sui risultati</p>

raggiunti. Questo strumento, molto apprezzato dall'utenza e dal GO, oltre a permettere il trasferimento dei risultati consente un feed-back molto efficace per discutere di temi e innovazioni anche in corso di validazione, fra interlocutori appropriati e provenienti anche da un'utenza allargata rispetto a quella del GO. Inoltre i risultati presentati e le discussioni e analisi sviluppate durante i Campus Clouds sono stati in parte utili anche per l'aggiornamento dei Disciplinari di Produzione Integrata oltre che di ausilio nel sistema di assistenza tecnica per la produzione integrata e biologica nella regione Emilia Romagna.

Oltre alle iniziative descritte sopra e nella tabella che segue, è stato realizzato in occasioni della visita del 27 giugno 2017 **1 audiovisivo** dal titolo [Controllo delle infestanti con ridotto input chimico: macchina per il diserbo di mais e sorgo](#)

Il progetto è stato anche **presentato** ([PresentazioneGOEmiliaRomagna11Aprile18Brussels](#))

in occasione di un evento **internazionale** promosso dalla Regione Emilia Romagna a Brussels in data 11 aprile 2018 presso la sede della Regione E.R. dedicato alla presentazione dei GO della Regione Emilia Romagna.

Come indicato nell'Azione 1, il personale CRPV si è fatto inoltre carico di predisporre in lingua italiana e inglese, le modulistiche richieste per la presentazione del Piano al fine del collegamento alla **Rete PEI-Agri**.

Tabella 1 – Descrizione delle iniziative di divulgazione svolte dal 01 settembre 2016 al 14 ottobre 2019.

Visite guidate		Incontri tecnici		Pubblicazioni		Audiovisivi		Campus cloud	
Data	Titolo	Data	Titolo	Data	Titolo	Data	Titolo	Data	Titolo
27/6/17	Diserbo sorgo con macchina sarchiatrice RA (14) RESISTENZEVisita27giugno17RA	20/2/17	Resistenze Vite MO (41) RESISTENZEIncontro20febb17MO	11/04/18	PresentazioneGOEmiliaRomagna11Aprile18Brussels	27/6/17	Controllo delle infestanti con ridotto input chimico: macchina per il diserbo di mais e sorgo	13/2/17	Resistenze (BO) (36)
10/7/18	Resistenze delle malerbe agli erbicidi RA (25) RESISTENZEIncVis10Lugli18RA	1/3/17	Resistenze Vite BO (16) RESISTENZEIncontro1mar17BO	17/06/18	Abstract e Poster 18 EWRS SYMPOSIUM 17/21/06/2018 Lubiana (Slovenia) AbstractPoster18EWRS SYMPOSIUM 17/21/06/2018Lubiana Slovenia			16/1/18	Resistenze BO (57)
		2/3/17	Resistenze Vite RE (12) RESISTENZEIncontro2mar17RE	1/2/19	Ragnetto rosso (Piacenza Agricola n. 2 - 2019 pag. 15) RagnettoRossoPiacenzaAgricolafebb2019			29/1/18	Resistenze BO (42)

		15/3/17	Resistenze Vite RA (32) RESISENZEincontro15mar17RA	12/3/19	Strategie innovative per la lotta al ragnetto rosso (Informatore Agrario 9/2019) RagnettoRossoInformatoreAgrario92019		6/2/18	Resistenze BO (29)
		10/7/18	Resistenze delle malerbe agli erbicidi RA (25*) RESISTENZEincontro10Lug18RA	4/4/19	Costi resistenze malerbe (Informatore Agrario 13/2019) CostiResistenzeErbicidiInformatoreAgrario132019		15/2/18	Resistenze BO (25)
		13/11/18	Resistenze delle malerbe agli erbicidi PR (14) RESISTENZEincontroMaleerbe13nov18PR	16/05/19	Presentazione I convegno AISSA under 40 San Donà di Piave (VE) 16-17/05/19 PresentazioneAttiConvegnoAISSASanDonàdiPiaveVE16-17/05/19		21/1/19	Resistenze BO (56)
		13/11/18	Resistenze delle malerbe agli erbicidi PC (16) RESISTENZEincontroMaleerbe13nov18PC	01/10/19	Combinazioni Herbicide band application Rivista Agronomy 9/2019 CombinazioniHerbicideBandApplicationRivistaAgronomy9-2019		28/1/19	Resistenze BO (64)
		19/11/18	Resistenze delle malerbe agli erbicidi FE (39) RESISTENZEincontroMale	01/10/19	La resistenza di <i>Stemphylium vesicarium</i> ai fungicidi in pubblicazione		29/1/19	Resistenze BO (58)

			rbe19nov18FE		e su Informatore Agrario 12/2020				
		21/11/18	Resistenze delle malerbe agli erbicidi FC (26) RESISTENZENTroMale rbe21nov18FC					4/2/19	Resistenze BO (65)
		13/2/19	Resistenze ad acaricidi e insetticidi FC (43) RESISTENZENTroAcaricidi13feb19FC					5/2/19	Resistenze BO (57)
		6/3/19	Sensibilità a S. vesicarium ai fungicidi BO (23) RESISTENZENTroSensibilitàSV6mar19BQ						
		11/3/19	Sensibilità a S. vesicarium ai fungicidi FE (51) RESISTENZENTroSensibilitàSV11mar19FE						
		18/3/19	Sensibilità a S. vesicarium ai fungicidi MO (26) RESISTENZENTroSens						

			ibilitàSV 18mar19 MO						
		3/4/1 9	Sensibilità à S. vesicarium ai fungicidi RA (39) RESISTE NZEInco ntroSens bilitàSV 3apr18R A						
Tot. = 2		Tot. = 14		Tot. = 8		Tot. = 1		Tot. = 10	

(* gli stessi che hanno seguito la visita hanno partecipato all'incontro sullo stesso tema)

Tutta la documentazione relativa alle locandine prodotte e diffuse ed i fogli firma registrati in occasione delle diverse iniziative sopra riportate in tabella 1, nonché copia degli articoli sono disponibili presso il CRPV. Sono comunque allegati alla presente relazione i pdf delle presenze agli incontri tecnici (**Allegato_GO5004934RESISTENZEPresenzeIncontriTecnici.pdf**), il pdf delle presenze alle visite guidate (**Allegato_GO5004934RESISTENZEPresenzeVisiteGuidate.pdf**) ed il pdf dei programmi e presenze ai campus clouds (**Allegato_GO5004934RESISTENZEProgrammiePresenzeCampusCloud.pdf**).

Le locandine delle iniziative diverse dai campus clouds (visite guidate, incontri tecnici) sono invece disponibili al link incluso in **tabella 1**.

Negli allegati di seguito sono presentati i risultati dei questionari distribuiti ai partecipanti circa il grado di soddisfazione vissuto partecipando allo specifico evento:

Allegato_1_QuestionarioSoddisfazioneIncontroResistenze_19Novembre18FE.xlsx

Allegato_2_QuestionarioSoddisfazioneCampusCFruttanovaResistenze_29Gennaio19BO.xlsx

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi previsti per questa azione sono stati pienamente raggiunti senza scostamenti dal piano di lavoro ed evidenze di criticità. È stato raccolto un alto grado di soddisfazione da parte dei partecipanti alle iniziative svolte.

4.2 Personale

Nome Cognome	Unità Aziendale responsabile	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo totale
	CRPV	Tecnico	Tecnica	24	666,96
	CRPV	Tecnico	Tecnica	44	920,03
	CRPV	Tecnico	Tecnica	144	3.608,52
	CRPV	Tecnico	Tecnica	46	1.474,30
	CRPV	Segreteria	Segreteria	96	2.312,88
	CRPV	Tecnico	Tecnica	20	928,88
	CRPV	Tecnico	Tecnica	142	4.416,24
TOTALE					14.327,81

4.3 Trasferte

Nome e Cognome	Descrizione	Costo
	Spostamenti tra le sedi del CRPV e le sedi dove verranno effettuate le attività di divulgazione	769,56
	Totale:	769,56

AZIONE 5 – ATTIVITA' DI FORMAZIONE

5.1 Attività e risultati

Azione

Azione 5 – FORMAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV

Descrizione attività

Sono state svolte tutte le attività previste in questa azione ed in particolare 2 seminari dei quali tutta la documentazione è inserita sul sistema SIAG come previsto. Di seguito sono elencati sinteticamente.

Seminario n. 5005369 a Catalogo Verde

Titolo "Tecniche diagnostiche innovative e miglioramento delle strategie di difesa antiresistenza per il contenimento di patogeni fitofagi e malerbe che interessano le colture agrarie"

Data realizzazione: 14/12/2018

Durata 4 ore

Sede: Via Tebano 54, Tebano - Faenza (RA)

Seminario n. 5005370 a Catalogo Verde

Titolo "Validazione di tecniche diagnostiche innovative della resistenza per il contenimento dei principali patogeni, fitofagi e malerbe che interessano le colture agrarie in Emilia Romagna"

Data realizzazione: 20/12/2018

Durata 4 ore

Sede: Via Tebano 54, Tebano - Faenza (RA)

Coaching n. 5005364 a Catalogo Verde

Titolo "Tecniche innovative di diagnosi per l'individuazione di resistenze acquisibili da popolazioni di *Drosophila suzukii*"

Data realizzazione: dal 16/08/2019 al 04/10/2019

Durata 4 ore

Sede: via Madonna dell'Olivo, 323 Cesena (FC)

Coaching n. 5005417 a Catalogo Verde

Titolo "Tecniche innovative per una efficiente gestione di strategie di difesa antiresistenza delle colture frutticole ed in particolare delle pomacee"

Data realizzazione: dal 29/07/2019 al 04/10/2019

Durata 4 ore

Sede: VIA Banche 2/1 Corporeno di Cento (FE)

Le azioni di formazione svolte hanno suscitato un grande interesse e apprezzamento da parte dei partecipanti, sia per i temi trattati che per come sono stati organizzati e strutturati nelle presentazioni che hanno visto una prima fase di approfondimento del tema stesso poi completato con i risultati emersi dal progetto per la loro applicazione operativa.

Gli obiettivi del progetto in merito alla formazione sono stati pienamente raggiunti e con alto grado di gradimento da parte degli utenti finali.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Tutte le attività di formazioni previste sono state svolte.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

Attività di formazione

Specifica	Unità Aziendale Responsabile	Costo
5005369	CRPV	792,32
5005370	CRPV	792,32
5005364	CRPV	248,00
5005417	CRPV	248,00
Totale		2080,64

3 Criticità incontrate durante la realizzazione dell'attività

Criticità tecnico- scientifiche	<p>Non si rilevano criticità sostanziali nello svolgimento del Piano.</p> <p>Pur non trattandosi di una criticità, si evidenzia che nell'azione 3 sottoazione 1, dove sono state svolte molte più analisi di quelle preventivate in questa prima fase del progetto, a causa dell'andamento stagionale siccitoso e quindi sfavorevole allo sviluppo di alcune malattie, non sono stati analizzati né campioni di <i>Alternaria</i> del pomodoro e patata (att. 1.5), né di Oidio delle cucurbitacee (att. 1.6). Non sono state eseguite indagini neanche sulle monilie delle drupacee (att. 1.3) in quanto diverse analisi su questi funghi sono state svolte in parallelo nell'ambito di un altro GO della FA 4B dal titolo "Strategie di difesa innovative ecocompatibili, gestione miscele residue e aggiornamenti sulle necessità idriche per una frutticoltura sostenibile" (titolo breve "SOS Frutta", n. domanda 5005113, GO: Frutticoltura sostenibile - di durata biennale, terminato nel 2018). In questo progetto "SOS Frutta" è previsto infatti uno studio più approfondito su questo target ed ha visto l'esigenza di svolgere anche analisi similari a quelle previste nel presente progetto, pertanto non si è ritenuto opportuno in questo progetto "Resistenze" eseguire le analisi durante il periodo di vita del progetto SOS Frutta.</p> <p>Una attività che ha visto la necessità di un'azione correttiva è stata inerente la sottoazione 2 ed in particolare la fase 2.4.1. A seguito infatti dell'inquinamento rilevato nell'allevamento di <i>Drosophila suzukii</i> con la simile specie indigena <i>D. melanogaster</i>, si è dovuti ripartire con un nuovo allevamento di <i>D. suzukii</i> determinando un lieve ritardo. Questo ritardo iniziale è stato però superato estendendo il lavoro di selezione previsto anche su <i>D. melanogaster</i> (utilizzandolo come test) e poi continuato con <i>D. suzukii</i>.</p> <p>Tutte le altre attività sono state svolte come previsto dal Piano e attualmente sono in prosecuzione.</p>
Criticità gestionali (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Non si rilevano criticità nella gestione del piano.
Criticità finanziarie	Non si rilevano criticità finanziarie.

4 ALTRE INFORMAZIONI

Nessuna altra informazione viene integrata.

5 CONSIDERAZIONI FINALI

Non si rileva nessun suggerimento particolare.

ATTIVITÀ COMPLESSIVAMENTE EFFETTUATE, RISULTATI INNOVATIVI E PRODOTTI

Le attività nonché i risultati che il presente piano si era proposto al momento della formazione del Gruppo Operativo si considerano raggiunti in maniera soddisfacente. Le attività hanno fornito risultati coerenti con gli ambiti operativi specifici della Focus area 4B: **riduzione dei rilasci di sostanze inquinanti e**

miglioramento della qualità delle acque e del suolo, controllo delle avversità con metodi a basso impatto e verifica ed adattamento dei sistemi culturali agricoli ai cambiamenti climatici per una migliore gestione dell'acqua, rendendo più efficiente l'irrigazione. In particolare di seguito vengono esposti in sintesi i risultati per ciascuna attività.

Di seguito viene fatta sintesi dei principali risultati emersi dalle attività svolte nell'**Azione 3** del progetto.

SOTTOAZIONE 1 (Patogeni)

Obiettivo di questa sottoazione è stato di monitorare la sensibilità ai prodotti fitosanitari di numerosi isolati fungini e batterici appartenenti a specie che causano le principali malattie di frutticole, orticole, cereali e barbabietola in Emilia Romagna è stato l'obiettivo del progetto. Ciò ha contribuito alla utilizzazione dei principi attivi in modo più consapevole e mirato diminuendone anche l'impatto sulla salute dell'uomo e dell'ambiente.

Molteplici sono stati i metodi utilizzati allo scopo: in vivo su pianta o parti di essa, in vitro su substrato di crescita artificiale solido e liquido ma anche attraverso estrazione di DNA per l'analisi di mutazioni con protocolli innovativi messi a punto e in fase di pubblicazione su rivista internazionale (Digital Drop PCR per la rapida valutazione della frequenza della sostituzione G143A, alla base della resistenza alle strobilurine, in *Zymoseptoria tritici*). L'ampio lavoro ha consentito di seguire l'evoluzione della sensibilità nel tempo e con questo mettere in luce anche nuove situazioni di resistenza fungina (es. *Venturia inaequalis* vs difenoconazole, *Cercospora beticola* vs tiophanate methyl, *Stemphylium vesicarium* verso SDHI) delle quali occorrerà tenere conto nella impostazione delle strategie di difesa di campo. Nei tre anni sono state eseguite più di 3000 analisi, numero ben superiore a quanto previsto in sede progettuale (600 analisi minime/nel triennio).

SOTTOAZIONE 2 (Fitofagi)

2.1, 2.2 (Afidì) - E' stato applicato di un ciclo forzato di trattamenti con flonicamide contro una popolazione di *Myzus persicae* rappresentativa delle condizioni di resistenza riscontrabili in Emilia Romagna. Dopo 16 cicli a dose subletale oppure 4 a concentrazione subletale seguiti da 4 a dose di etichetta, la sensibilità delle popolazioni trattate nei confronti del principio attivo non è cambiata significativamente. Inoltre la maggior parte dei genotipi con varie mutazioni target site in grado di conferire elevati livelli di resistenza ad altre classi di insetticidi è stato eliminato nel corso della selezione. E' stata verificata con successo la possibilità di identificare i meccanismi di resistenza "target site" verso 3 importanti gruppi di afididi adattando con successo a questa specie una metodica diagnostica già sviluppata nei confronti di *M. persicae*. Anche i protocolli biochimici impiegati per diagnosticare una forma di resistenza metabolica in *M. persicae* sono risultati adatti a descrivere lo stesso fenomeno in *Aphis gossypii*.

2.3 (*Tetranychus urticae*) - Durante le ultime due annualità di progetto sono state svolte analisi molecolari per l'individuazione, della resistenza di tipo bersaglio specifico, in 17 popolazioni di *Tetranychus urticae* raccolte sul territorio piacentino. A questo scopo si è valutata, tramite sequenziamento diretto, la presenza di 2 mutazioni nei geni che codificano le subunità GluCl1 e GluCl3 del canale ionico GABA e 5 mutazioni nel gene che codifica per il citocromo Cytb/b6 che in letteratura sono associate alla resistenza rispettivamente ad abamectina e bifenazate. La ricerca ha dato esito negativo per le popolazioni esaminate. La resistenza di tipo bersaglio specifico, almeno quella attribuibile alle mutazioni precedentemente descritte, non appare un meccanismo comune di resistenza nelle popolazioni campionate. Contro *T. urticae* è stato sperimentato un sistema di biosaggio semplice in grado di evidenziare la sensibilità a 2 prodotti adulticidi. La tecnica verificata negli anni su 30 popolazioni può evidenziare in anticipo con un numero limitato di individui la sensibilità ai prodotti stessi.

2.4 (*Drosophila suzukii*) - Le attività di progetto hanno avuto come obiettivi l'analisi del rischio di sviluppo resistenza allo spinosad e al cyantraniliprole in *D. suzukii*, tramite selezione di laboratorio di una popolazione di riferimento suscettibile e l'individuazione di marcatori molecolari associati alla risposta adattativa ai due principi attivi analizzando il profilo di espressione genica, nella popolazione selezionata rispetto a quella di partenza. Le prove di selezione non hanno portato allo sviluppo di resistenze conclamate ai due principi attivi. Il fitofago ha dimostrato tuttavia, la capacità di sviluppare tolleranza alla diamide ma non alla spinosina, confermando precedenti osservazioni di campo. L'analisi di espressione genica ha individuato 7 potenziali marcatori (geni differenzialmente espressi) che potranno essere utilizzati per monitorare l'esordio della tolleranza alla diamide in condizioni di campo, suggerendo, solo quando necessario, la sostituzione di un trattamento Exirel® con uno di Laser® nella strategia di difesa, evitando di aumentare inutilmente la pressione selettiva esercitata sulla spinosina e limitando nel contempo il danno al di sotto della soglia economicamente accettabile.

SOTTOAZIONE 3 (Malerbe)

Attività 3.1 - Nell'ambito di questa attività complessivamente sono stati raccolti e testati 82 campioni di cui 57 sono risultati resistenti ad almeno un erbicida. Sono coinvolti 7 generi di infestanti in diversi sistemi colturali: *Alopecurus*, *Avena*, *Lolium* e *Papaver* in frumento, giavoni in mais, amaranti in soia/pisello, soia/pomodoro e *Conyza* in colture arboree (vigneti, frutteti). La situazione è in veloce evoluzione per *Amaranthus* spp. papavero, alopecuro e *Conyza* spp. Le informazioni prodotte sono state inserite nel database nazionale della resistenza agli erbicidi gestito dall'IPSP-CNR nell'ambito dell'attività del GIRE e possono essere utilizzate per creare mappe di diffusione della resistenza a livello regionale.

Attività 3.2 - Si sono analizzati i costi della resistenza in 5 sistemi colturali, cioè considerando 5 binomi coltura-malerba inerenti le colture di frumento tenero, mais, soia, riso e vite. Si sono ipotizzati tre scenari: gestione convenzionale, strategia preventiva e strategia curativa. Analizzato i costi della resistenza a livello di azienda agricola, si conferma che la resistenza è in ogni caso un costo. L'adozione di una qualsiasi strategia di gestione della resistenza (sia preventiva che curativa) comporta sempre un aggravio dei costi rispetto alla gestione convenzionale di riferimento. Questo conferma che la resistenza agli erbicidi rappresenta un problema attuale e un costo reale per gli agricoltori. Le strategie curative risultano sempre economicamente più sfavorevoli. La diminuzione di margine lordo è particolarmente evidente in vigneto e dove è necessario cambiare radicalmente la rotazione colturale.

Attività 3.3 - Una via per diminuire significativamente la quantità di erbicida utilizzata nelle colture a file larghe è la localizzazione del trattamento lungo la fila della coltura. La disponibilità di sistemi di guida assistita dei trattori rende questa più affidabile ed efficace perché permette di ridurre drasticamente la superficie di terreno trattata e di conseguenza l'impatto ambientale. A tal fine, si è validato un prototipo per la distribuzione degli erbicidi di post-emergenza in una fascia larga 30 cm lungo la fila delle colture estive accoppiato con la sarchiatura dell'interfila. Si sono fatti tre esperimenti di campo. La sperimentazione è stata fatta in uno scenario di agricoltura di precisione basata sull'uso del sistema di posizionamento RTK-GPS ad alta precisione per la guida assistita dei trattori per tutte le operazioni colturali. Buoni livelli di controllo delle infestanti sono stati ottenuti con l'adozione di strategie di gestione a basso input di erbicidi, e con risultati produttivi per il mais dei tutto simili con quelli della gestione tradizionale. Le due tesi che prevedevano la distribuzione localizzata degli erbicidi hanno comportato una riduzione del 50 e 66% rispettivamente della dose di principi attivi applicata per ettaro in confronto ad una distribuzione tradizionale a pieno campo.

RICADUTE IN AMBITO PRODUTTIVO, TERRITORIALE ED AMBIENTALE

Le ricadute dei risultati del piano in ambito produttivo e ambientale, oltretutto territoriale, sono estremamente rilevanti. Il progetto infatti è stato teso a validare innanzitutto tecniche diagnostiche innovative per la individuazione di resistenze acquisite da agenti patogeni, fitofagi e malerbe ai principali prodotti fitosanitari comunemente impiegati nel territorio emiliano romagnolo. Per questo sono state svolte specifiche indagini nelle aree regionali in cui erano state rilevate cali di efficacia al fine di diagnosticare la presenza di forme di tolleranza o resistenza, supportando conseguentemente gli agricoltori ad azioni correttive nei rispettivi piani di difesa e gestione delle avversità, consentendo in tal modo di evitare interventi inutili, riducendo quindi gli impatti sia in termini di **riduzione degli input chimici**, che di **riduzione di inquinamento delle acque**, in particolare si ricorda che gli erbicidi sono fra i prodotti maggiormente rilevati nelle acque.

In particolare di seguito sono sinteticamente descritte le stime di valutazione delle ricadute sul territorio regionale di alcune delle sottoazioni presenti nel piano.

Nella sottoazione 1 sono descritti di seguito gli indicatori di risultato raggiunti nel piano e che trovano una ricaduta concreta in ambito produttivo e ambientale a livello territoriale:

- 1) "**Indice di rischio resistenza**": per ogni binomio patogeno/gruppo di fungicidi utilizzato (stesso meccanismo di azione) si può calcolare tale indice attraverso il semplice rapporto tra il numero di popolazioni saggiate risultate resistenti e il numero totale sottoposto a analisi. La scala varia da 0 a 1 e quanto più il risultato si avvicinerà a 1 tanto più il rischio dell'uso di un determinato meccanismo di azione sarà elevato su un determinato patogeno. Si tratta di una scala utilizzabile anche per la valutazione dei fenomeni di regressione della resistenza nella quale, ovviamente, tanto più il rapporto sarà basso tanto maggiore è la capacità del fungicida di recuperare attività. Il rapporto può essere

migliorato dalla concomitante azione di diverse tecniche (es. abbassamento dell'inoculo tramite sanificazione, irrigazioni mirate e non eccessive, fertilizzazioni equilibrate, utilizzo di strategie antiresistenza, ecc.) e da sfavorevoli condizioni meteorologiche per il patogeno stesso.

- 2) In collegamento con l'Indice di rischio menzionato, è possibile stilare una lista di **"buone pratiche"** da adottare a livello aziendale per limitare il rischio di resistenza.
- 3) Indicatore della robustezza/attendibilità delle metodiche diagnostiche saggiate: è stato possibile verificare in alcuni casi la percentuale di errore tra la valutazione dello status della resistenza nei laboratori e quanto osservato in campo. La "percentuale di errore" nel caso dei patogeni valutati con saggi in vitro (e parzialmente anche in vivo) ha superato il 5% dal momento che questi saggi tendono a sovrastimare il fenomeno. Tale situazione non appare però particolarmente negativa dal momento che consente di prevedere più facilmente l'instaurarsi della resistenza e quindi poter gestire tutte le tecniche in modo da prevenire i danni in campo che è poi lo scopo principale delle indagini di monitoraggio.

La sottoazione 2.1 ha evidenziato che un uso continuo di flonicamidina non seleziona popolazioni resistenti e riduce la frequenza dei genotipi più resistenti. Questo conferma la sostenibilità delle attuali strategie antifide basate su un trattamento prefiorale con questo principio attivo. Il mantenimento dell'attuale strategia contribuisce a ridurre la frequenza dei genotipi di *Myzus persicae* resistenti ad altri MOA con ricadute positive sull'efficacia di trattamenti effettuati successivamente contro questa specie sugli ospiti secondari. Si può stimare che circa **il 50% dei trattamenti aficidi potrebbero essere risparmiati** perché si mantenga l'efficacia dei principi attivi.

La tecnica di diagnosi validata per la individuazione di resistenza in popolazioni di *Aphis gossypii* e quindi la possibilità di verificare con una tecnica molecolare economicamente sostenibile il livello di resistenza delle popolazioni di questo afide che inquina diverse colture orticole regionali (sottoazione 2.2), permette di risparmiare circa 5-6 euro per campione analizzato rispetto ad un approccio basato su sequenziamento diretto o su una tecnologia basata sull'impiego di sonde e chimica taqman. Inoltre si è anche stimato che circa il 70 % delle popolazioni possiede mutazioni che riducono enormemente l'efficacia soprattutto dei piretroidi di tipo II che quindi sono da evitare. Queste informazioni consentono, di poter **risparmiare almeno un trattamento di piretroidi** (ma probabilmente di più) che risulta spesso inutile dove è presente la resistenza, con vantaggi sia sul suolo e acqua ma anche sulla biodiversità ambientale che è facilmente compromessa dai prodotti ad ampio spettro come i piretroidi.

Nel caso di *Tetranychus urticae* la principale ricaduta è nell'ottimizzazione delle strategie e in genere nel risparmiare, conoscendo il livello di sensibilità del fitofago, almeno un trattamento acaricida durante l'intero ciclo vegetativo.

Dai risultati emersi nella Sottoazione 2.4 incentrata a definire protocolli innovativi per la diagnosi di resistenze ai prodotti fitosanitari in *Drosophila suzukii*, si menzionano i seguenti indicatori:

- a) Il rilevamento di marcatori genetici nelle popolazioni di campo associate alla tolleranza al Cyantraniliprole (**Exirel ©**), in presenza di danni apprezzabili sulle varietà con epoca di raccolta media o media tardiva, consentirebbe all'agricoltore di evitare un trattamento supplementare di dubbia efficacia con Exirel che ha un costo per ettaro di circa 250 euro, sostituendolo con uno più risolutivo con spinosad (rischio di tolleranza non rilevato), contenendo anche i costi aggiuntivi imputabili ad un eventuale danno sul prodotto finale (vedi punto b). Tale soluzione potrebbe essere controindicata in assenza di tolleranza all'Exirel nella logica della massima alternanza nell'uso dei prodotti disponibili, perché rischierebbe di aumentare inutilmente la pressione selettiva anche sullo spinosad.
- b) Prove da campo (non incluse nel progetto PSR) hanno dimostrato che un calo di efficacia dell'Exirel è di norma associato ad un 7% di danno mentre nelle stesse popolazioni persiste la suscettibilità allo spinosad.

Si può ipotizzare che in presenza di tolleranza a cyantraniliprole, in assenza di una sua diagnosi preventiva, la mancata sostituzione di un trattamento con Exirel con Laser nella strategia di difesa, comporti un **rischio di un danno medio del 7%, con un aggravio sul reddito valutato di circa 3000 euro per ettaro** (quando il prezzo medio di vendita delle ciliegie è stimato di 3,5 euro/kg per una produzione 12 quintali/ettaro). Oltre ai costi che ricadono in modo diretto sulla redditività dell'agricoltore, vanno poi considerati i costi sul rischio di inquinamento ambientale che sono difficilmente stimabili.

I risultati ottenuti nel triennio nella sottoazione 3, attraverso un approccio epidemiologico, hanno permesso di definire con ragionevole accuratezza l'estensione della resistenza agli erbicidi in Emilia Romagna. I dati sono stati condivisi con il Gruppo Italiano sulla Resistenza agli Erbicidi (GIRE). Attraverso la app di

mappatura presente nel sito web del GIRE chiunque può ora ottenere la mappa regionale di diffusione, cioè di rischio, per i vari tipi di resistenza e per i più importanti sistemi colturali. I risultati permetteranno una più efficace gestione di popolazioni resistenti, incluse quelle appartenenti a specie tipicamente estive che sono favorite dai mutamenti climatici.

Si sono individuati i gruppi di erbicidi più a rischio, e sulla base dei risultati ottenuti sono state aggiornate le linee-guida per la gestione della resistenza pubblicate nel sito del GIRE. Il partenariato è stato costantemente e tempestivamente aggiornato sui risultati ottenuti. Complessivamente il progetto ha evidenziato la scarsa propensione da parte degli operatori a implementare strategie di prevenzione della resistenza. L'analisi e la pubblicazione del lavoro fatto per determinare il "costo" della resistenza per gli agricoltori fornirà il supporto per raggiungere una maggiore consapevolezza del problema.

Nel quadro di una più efficace implementazione del controllo integrato, il progetto ha dimostrato che in molti casi si può ridurre significativamente la quantità di erbicidi utilizzati preservando l'efficacia del controllo, specialmente nelle colture di pieno campo a file larghe come il mais. I risultati ottenuti su questa coltura possono essere estesi anche a soia, girasole ed altre.

Questi risultati dimostrano che è possibile ridurre significativamente i dei rilasci di erbicidi, migliorando così la qualità delle acque e del suolo.

Ad esempio, i risultati dell'attività 3.3 hanno dimostrato che l'integrazione di trattamenti fatti solo lungo le file del mais con la sarchiatura meccanica dell'interfila porta ad una **riduzione della quantità utilizzata di erbicidi di circa il 65% nei trattamenti di pre-emergenza e di più del 50% nei trattamenti post-emergenza.**

Stimando che questa tecnica possa essere applicata in almeno il 50% dei casi, e considerando che la superficie a mais in Emilia Romagna è di circa 57.000 ha, anche ipotizzando un solo trattamento per anno per ogni appezzamento, si può **ridurre la quantità utilizzata di principi attivi di circa 2 tonnellate** (e perciò di svariate tonnellate di prodotti commerciali), con indubbie ricadute positive sull'ambiente e la salute umana. Inoltre questa tecnica potrebbe essere utilizzata anche su altre colture come soia o sorgo (in totale circa 60.000 ha), portando così ad ulteriori significative riduzioni della quantità di erbicidi distribuita.

In sintesi questa sottoazione porta ai seguenti indicatori:

- 1) I risultati ottenuti nelle tre attività svolte indicano che è possibile ridurre significativamente l'Indice di rischio resistenza attraverso una gestione integrata delle malerbe, basata su un minore input di erbicidi, l'utilizzo del controllo meccanico ed una strategia preventiva di gestione della resistenza.
- 2) I risultati sono funzionali all'aggiornamento delle linee guida per la gestione della resistenza disponibili nel sito web del GIRE, contribuendo ad abbassare il rischio di resistenza.
- 3) Dalle verifiche incrociate tra la situazione di campo ed i risultati di laboratorio, la percentuale di errore nella valutazione dello status della resistenza ottenuta attraverso biosaggi è risultata inferiore al 2%, dimostrando la validità della tecnica diagnostica.

RICADUTE SOCIALI:

Il progetto ha raggiunto lo scopo di validare tecniche diagnostiche per individuare insorgenze di resistenze ai pesticidi che comportano l'impiego degli stessi senza sortire l'effetto di contenimento dell'avversità target. Ciò comporta che, se non diagnosticato tempestivamente, l'uso inutile di interventi con fitofarmaci che anzi si tende a reiterare per raggiungere lo scopo per sono impiegati. Questo determina oltre ad un aumento dei costi per gli agricoltori, siano essi per l'acquisto di fungicidi, insetticidi o erbicidi, una dispersione inutile e crescente nell'ambiente, con ricadute su un aumento di inquinamento delle acque e nel suolo oltre all'esposizione degli addetti.

Questo problema è particolarmente importante non solo per le ricadute sull'ambiente, ma anche sulla salute umana, sia degli operatori agricoli che dei consumatori. Per questa ragione i risultati del piano forniscono strumenti utili per evitare comportamenti e dispersioni inutili che comportano importanti ricadute positive anche dal punto di vista sociale. La salute umana non a caso è una delle principali ragioni dei problemi sociali a livello mondiale, con ripercussioni importanti sui costi per la sua gestione.

Elenco Allegati:

- Allegato_GO5004934RESISTENZEPresenzeIncontriTecnici.pdf
- Allegato_GO5004934RESISTENZEPresenzeVisiteGuidate.pdf)
- Allegato_GO5004934RESISTENZEProgrammiePresenzeCampusCloud.pdf)
- Allegato_1_QuestionarioSoddisfazioneIncontroResistenze_19Novembre18FE.xlsx
- Allegato_2_QuestionarioSoddisfazioneCampusCFruttanovaResistenze_29Gennaio19BO.xlsx
- Allegato_3_Frontespizio-materiale_Formazione

05_Resistenze_19NovembreFE.xlsx

Data 29 novembre 2019

IL LEGALE RAPPRESENTANTE (Firmato digitalmente)