

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE, AMBIENTALI E ALIMENTARI

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale: 07/D1

Settore Scientifico Disciplinare: AGR12

Caratterizzazione dell'aggressività e della sensibilità ai
fungicidi di popolazioni di *Mycosphaerella graminicola*
(anamorfo *Zymoseptoria tritici*) su frumento

Presentata da: Dott.ssa Greta Battistini

Coordinatore Dottorato

Prof. Massimiliano Petracci

Supervisore

Dott.ssa Marina Collina

Co-Supervisore

Dott. Antonio Prodi

Esame finale anno 2019

INDICE

Abstract	pag. 7
-----------------------	--------

INTRODUZIONE

1 Frumento	pag. 8
1.1 Cenni botanici ed evoluzione	pag. 8
1.2 Importanza della coltura	pag. 10
1.3 Esigenze climatiche	pag. 10
1.4 Produzione	pag. 11
1.5 Generalità sulle principali malattie fungine del frumento	pag. 13
2 <i>Zymoseptoria tritici</i>	pag. 15
2.1 Tassonomia	pag. 15
2.2 Sintomi	pag. 15
2.3 Ciclo biologico	pag. 16
2.4 Importanza del patogeno	pag. 18
2.5 Difesa	pag. 19
2.5.1 Impiego di cultivar tolleranti	pag. 19
2.5.2 Impiego di fungicidi	pag. 20
2.5.3 Impiego di fungicidi contro la septoriosi in Italia	pag. 27
SCOPO DELLA TESI	pag. 28

CAPITOLO 1

Sensibilità di isolati italiani di *Zymoseptoria tritici* a QoI, DMI e SDHI

1 Introduzione	pag. 30
2 Materiali e metodi	pag. 33
2.1 Isolamento del fungo	pag. 33
2.2 Test di sensibilità ai fungicidi	pag. 35
2.3 Analisi statistica dei dati ottenuta test con microtiter	pag. 36
2.4 Individuazione delle mutazioni	pag. 37
2.5 Individuazione della frequenza allelica della sostituzione G143A	pag. 38
3 Risultati	pag. 39
3.1 Sensibilità degli isolati monoconidici ai QoI	pag. 39

3.2 Sensibilità degli isolati monoconidici ai DMI.....	pag. 44
3.3 Sensibilità degli isolati monoconidici agli SDHI	pag. 49
4 Discussione	pag. 54

CAPITOLO 2

Un nuovo approccio per determinare la frequenza allelica della G143A attraverso l'utilizzo della Droplet Digital PCR in *Zymoseptoria tritici*

1 Introduzione	pag. 59
2 Materiali e metodi	pag. 61
2.1 Dna dei campioni	pag. 61
2.2 Setup della reazione di ddPCR e componenti usati.....	pag. 61
2.3 Esperimento preliminare sulla generazione di gocce	pag. 62
2.4 Ottimizzazione delle condizioni di PCR	pag. 62
2.5 Valutazione della sensibilità del protocollo ddPCR	pag. 63
2.6 Prova del protocollo con una popolazione naturale	pag. 63
3 Risultati	pag. 64
3.1 Esperimento preliminare sulla generazione di gocce	pag. 64
3.2 Ottimizzazione delle condizioni di PCR	pag. 64
3.3 Valutazione della sensibilità del protocollo ddPCR	pag. 66
3.4 Prova del protocollo con una popolazione naturale	pag. 68
4 Discussione	pag. 69

CAPITOLO 3

Valutazione dell'aggressività e virulenza di *Zymoseptoria tritici* nei confronti di diverse varietà di frumento tenero e duro

1 Introduzione	pag. 72
2 Materiali e metodi.....	pag. 73
2.1 Varietà di frumento	pag. 73
2.2 Isolati di <i>Z. tritici</i> usati nelle prove.....	pag. 74
2.3 Schema sperimentale delle prove in serra	pag. 74
2.4 Schema sperimentale della prova in campo	pag. 74
2.5 Elaborazione statistica	pag. 75

3 Risultati	pag. 75
3.1 Prove in serra	pag. 75
3.2 Prova in campo	pag. 85
4 Discussione	pag. 86
CONCLUSIONI	pag. 88
BIBLIOGRAFIA	pag. 91
RINGRAZIAMENTI	pag. 101

ABSTRACT

Mycosphaerella graminicola, anamorfo *Zymoseptoria tritici*, è l'agente causale della septoriosi. Questo patogeno, diffuso in Nord e Centro Europa, in Italia solo in tempi recenti è causa di notevoli perdite di produzione. L'impiego di cultivar tolleranti è un importante mezzo di controllo ma il più diffuso è il trattamento con fungicidi.

L'obiettivo principale dello studio è stato valutare la sensibilità di isolati italiani di *Z. tritici* alle famiglie di fungicidi impiegate nella difesa (QoI, DMI e SDHI). Questo ha portato anche alla messa a punto di un protocollo in droplets digital PCR (ddPCR) per valutare la frequenza della G143A, sostituzione responsabile della resistenza ai QoI. Un altro obiettivo ha invece riguardato la sensibilità di varietà di frumento coltivate in Italia a *Z. tritici* approfondendo la specificità di infezione di isolati del patogeno al frumento tenero e duro.

Dalla valutazione della sensibilità a QoI, DMI e SDHI e dall'analisi delle sequenze *cytb*, *cyp51* e *Sdhb-c-d* è emersa la presenza, di riduzioni di sensibilità del patogeno nei confronti di QoI e DMI per i quali risulta ancor più importante seguire le strategie anti-resistenza proposte dal FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). L'utilizzo della ddPCR nello studio della frequenza della G143A ha permesso di quantificare accuratamente questa sostituzione amminoacidica. Protocolli simili potrebbero essere sviluppati nei confronti di altre mutazioni causanti resistenza ai fungicidi, sia in *Z. tritici* che in altri patogeni.

La valutazione della sensibilità delle varietà di frumento al patogeno, è avvenuta attraverso l'inoculazione delle piante con isolati provenienti da frumento duro e tenero. I risultati hanno mostrato la presenza di una specializzazione degli isolati alle due specie di frumento ma il proseguimento degli studi appare necessario per confermare il fenomeno.

Si ritiene che lo studio condotto abbia e possa ulteriormente contribuire alla gestione delle infezioni di *Z. tritici* in pieno campo.

INTRODUZIONE

1) Frumento

1.1) Cenni botanici ed evoluzione

La grande famiglia delle Poaceae è suddivisa in 10 tribù che comprendono molte piante di interesse agrario (Tabella 1). All'interno della tribù Hordeae troviamo il genere *Triticum*.

Tab 1. Elenco delle tribù appartenenti alla famiglia delle Poaceae e piante di appartenenza (Tripodi, 2010 modificata).

Famiglia	Tribù	Piante di appartenenza
<i>Poaceae</i>	Bambuseae	Generi: <i>Bambusa</i> , <i>Arundinaria</i> , <i>Phyllostachys</i> .
	Maydeae	<i>Zea mays</i> (granturco).
	Andropogoneae	<i>Saccharum officinarum</i> (canna da zucchero), <i>Andropogon sorgum</i> (sorgo).
	Oryzeae	<i>Oryza sativa</i> (riso).
	Phalarideae	<i>Anthoxanum odoratum</i> (paleino), <i>Phalaris canariensis</i> (scagliola).
	Agrostideae	<i>Alopecurus pratensis</i> (coda di topo) <i>Agrostis alba</i> (capellini), <i>Phleum pratense</i> e <i>Lagurus ovatus</i> (coda di lepre).
	Chlorideae	<i>Cynodon dactylon</i> (gramigna).
	Aveneae	<i>Avena sativa</i> (avena), <i>Trisetum flavescens</i> e <i>Arrhenatherum elatius</i> (foraggere).
	Festuceae	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Cynosorus cristatus</i> , <i>Briza media</i> (foraggere), <i>Arundo donax</i> (canna nostrana), <i>Phragmites communis</i> (cannuccia di palude) e <i>Saccharum officinarum</i> (canna da zucchero).
	Hordeae	Genere <i>Triticum</i> , <i>Secale cereale</i> (segale) e <i>Hordeum vulgare</i> (orzo).

La classificazione del genere *Triticum* è molto complessa ed ha subito nel corso del tempo numerosi cambiamenti. La prima suddivisione fu condotta da Linneo nel 1753, il quale basandosi su caratteri morfologici descrisse sette specie: *T. aestivum*, *T. hybernum*, *T. turgidum*, *T. spelta*, *T. monococcum*, *T. polonicum*, *T. compositum*.

La situazione cambiò nel 1918 quando Sakamura introdusse il numero cromosomico. Questa nuova classificazione, che è anche quella usata attualmente, divide il genere *Triticum* in tre gruppi: diploide 14 (n=7) AA, tetraploide 28 (n=14) AABB e esaploide 42 (n=21) AABBDD.

La moderna classificazione del frumento che tiene conto anche del numero cromosomico è rappresentata in tabella 2.

Tab 2. Raggruppamento del genere *Triticum* in sezioni in base alla struttura del genoma e classificazione in specie e sottospecie. (Matsuoka 2011 modificata)

Sezione	Specie e sottospecie	Struttura del genoma
Monococcon	<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i> subsp. <i>monococcum</i>	AA
	<i>Triticum urartu</i>	AA
Dicoccoidea	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i> subsp. <i>dicoccon</i> subsp. <i>durum</i> subsp. <i>polonicum</i> subsp. <i>turanicum</i> subsp. <i>turgidum</i> subsp. <i>carthlicum</i> subsp. <i>paleocolchium</i>	AABB
	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> subsp. <i>timopheevii</i>	AAGG
Triticum	<i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>aestivum</i> subsp. <i>compactum</i> subsp. <i>sphaerococcum</i> subsp. <i>macha</i> subsp. <i>spelta</i>	AABBDD
	<i>Triticum zhukovskyi</i>	AAAAGG

Oggi il 95% del frumento coltivato a livello mondiale è esaploide mentre il restante 5% è tetraploide. (Shewry, 2009).

1.2) Importanza della coltura

Il frumento rappresenta il secondo cereale più prodotto al mondo (771.718.579 t) preceduto solo dal mais (1.134.746.667 t) e seguito dal riso (769.657.791 t) (dati del 2017 FAOSTAT 2019).

Il frumento è importante sia per la nutrizione umana sia per quella del bestiame, infatti per l'uomo rappresenta la prima fonte di carboidrati (Curtis, 2002). Anche il suo contenuto proteico, che è superiore a quello di mais e riso, non va sottovalutato, soprattutto nei paesi in via di sviluppo dove cibi come il pane rappresentano una parte importante della dieta. Rappresenta inoltre un'importante fonte di vitamina E e del complesso del gruppo B (Shewry, 2009).

Con la macinazione del frumento tenero è possibile ottenere la farina mentre con la macinazione del frumento duro si ottiene la semola. Entrambe vengono poi utilizzate nella preparazione di molti prodotti quali: pane, pasta, pizza, biscotti, cous cous e bulgur (Shewry, 2009).

Il frumento può anche essere impiegato per la produzione di birra o distillati, come materia prima per la produzione di biocarburanti, mentre la paglia è utilizzata come lettiera, per foraggiare il bestiame fino alla creazione di piccoli manufatti (cestini) (Fones and Gurr, 2015).

1.3) Esigenze climatiche

La complessità del suo genoma conferisce al frumento grande adattabilità, permettendogli di essere coltivato da 67°N in Scandinavia e Russia, a 45°S in Argentina (Feldman, 1995) e fino a un'altitudine di 4.570 m s.l.m (Percival, 1921).

Il frumento è una specie microterma, per crescere non ha quindi bisogno di temperature elevate. L'optimum è rappresentato da 25°C ma può crescere da un minimo di 3-4°C a un massimo di 30-32°C (Briggle, 1980). Nei climi caratterizzati da inverni miti viene seminato in autunno e raccolto in primavera, nelle regioni caratterizzate da inverni rigidi viene seminato a fine inverno e raccolto in estate avanzata.

Il fabbisogno idrico può variare da un minimo di 250 mm a un massimo di 1750 mm di pioggia all' anno (Leonard and Martin, 1963) e per una buona produzione la pianta necessita di un adeguata umidità relativa durante la crescita (Percival, 1921).

1.4) Produzione

Il frumento è coltivato su una superficie mondiale di oltre 200 milioni di ha (Figura 1) e il suo commercio è maggiore di tutte le colture combinate assieme (Curtis, 2002). La produzione globale è cresciuta costantemente, passando da 525.435.518 t nel 1994 ad oltre 700 milioni di t nel 2017 (Figura 1).

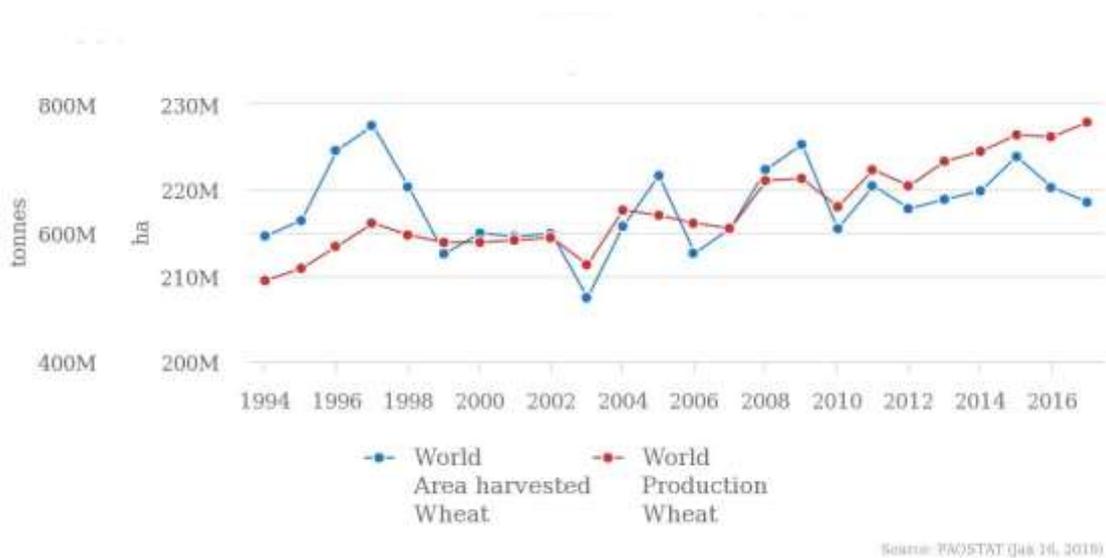


Fig 1. Produzione (t) e superficie mondiale (ha) coltivata a frumento dal 1994 al 2017 (FAOSTAT 2019).

Di queste 771.718.579 tonnellate il 43,5% viene prodotto in Asia, il 32,6% in Europa, il 17,2% in America mentre il 3,3 e 3,4% vengono prodotte rispettivamente in Africa e Oceania (Figura 2).

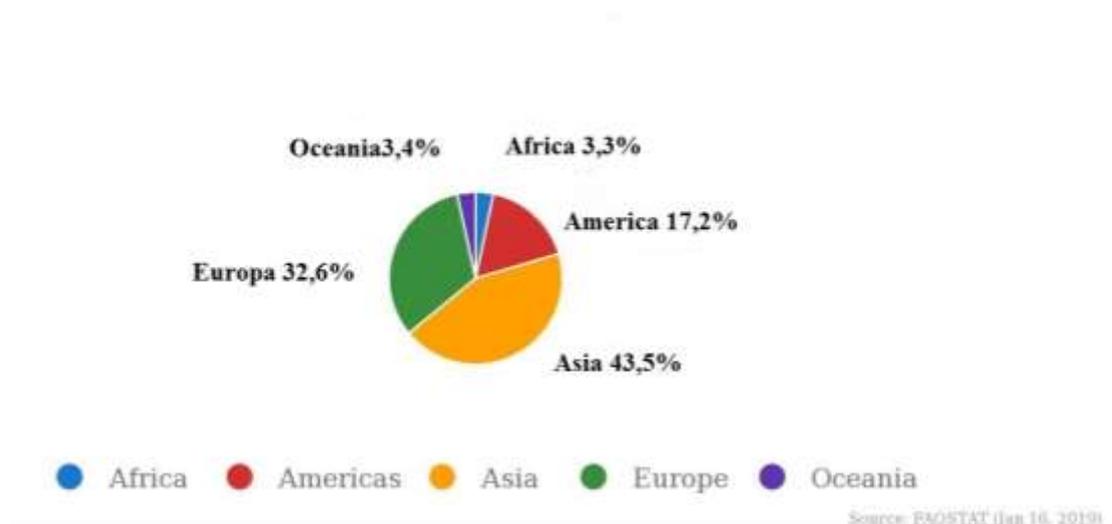


Fig 2. Produzione mondiale di frumento (%) dell'anno 2017 ripartita fra i vari continenti (FAOSTAT 2019).

L'Europa risulta il secondo continente produttore di frumento e nel corso degli anni ha mantenuto un *trend* crescente, passando da 120.000.000 t nel 1990 a 270.142.633 t nel 2017.

All'interno dell'Unione Europea i paesi maggiori produttori sono la Francia con 36.924.938 t, la Germania con 24.481.600 t e il Regno Unito con 14.837.000 t (dati 2017, FAOSTAT 2019).

In Italia la superficie coltivata a frumento è di 1.844.035 ha con una produzione totale di 7.476.364 t (Tabella 3). Mentre i dati sulla produzione mondiale ed europea sono riferiti prevalentemente al frumento tenero, il territorio italiano è diviso in due parti:

- Nord Italia dove viene coltivato prevalentemente frumento tenero
- Sud Italia dove prevale il frumento duro

L'unica eccezione è rappresentata dall' Emilia-Romagna che coltiva quasi in egual misura sia frumento tenero (880.440 t) che duro (524.692 t) (Tabella 3).

Tab 3. Produzione Italiana (t) di frumento tenero e duro nel 2017 (ISTAT 2018).

Regione	Produzione di frumento tenero (t)	Produzione di frumento duro (t)	Produzione totale (t)
Produzione italiana	2.887.714	4.588.650	7.476.364
Piemonte	503.642	15.531	519.174
Valle d'Aosta	15	-	15
Lombardia	335.721	97.348	432.570
Liguria	401	-	401
Trentino-Alto Adige	240	20	260
Veneto	538.528	96.827	635.355
Friuli-Venezia Giulia	59.660	2.109	61.769
Emilia-Romagna	880.440	524.692	1.405.132
Toscana	85.737	240.144	325.881
Umbria	111.447	100.205	211.652
Marche	72.295	479.343	551.638
Lazio	53.550	144.350	197.900
Abruzzo	97.145	138.101	235.246
Molise	9.050	221.325	230.375
Campania	55.683	178.158	233.841
Puglia	35.850	961.000	996.850
Basilicata	19.581	326.577	346.158
Calabria	30.139	70.074	100.213
Sicilia	1.050	890.900	891.950
Sardegna	226	108.242	108.469

1.5) Generalità sulle principali malattie fungine del frumento

Il frumento è interessato da diverse malattie fungine. Tra le più importanti in Italia c'è la ruggine, causata da numerose specie e forme speciali. Le principali sono tre; *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* anche detta ruggine bruna che attacca la foglia causando la formazione di pustole rossastre sulla pagina superiore (uredosori) disposte in maniera casuale e pustole marrone scuro sulla pagina inferiore (teleutosori). I danni maggiori si verificano quando attacca la foglia a bandiera e provoca una diminuzione di peso della

cariosside e di numero di cariossidi per spiga (Pasquini and Delogu 2003). Un'altra ruggine è la gialla, causata da *Puccinia striiformis* tipica degli ambienti freschi e umidi (Chen *et al.*, 2014). Questa ruggine causa la formazione di pustole gialle disposte in modo parallelo alle nervature (uredosori) mentre i teleutosori si formano raramente. Poco presente in Italia, può causare danni rilevanti in annate con clima favorevole, su cultivar di frumento tenero. La ruggine nera causata da *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, si manifesta con pustole localizzate lungo il culmo o lungo le nervature fogliari e causa una diminuzione della dimensione delle cariossidi e un allettamento delle piante, con conseguenti perdite di produzione. Il ceppo Ug99 segnalato in Uganda nel 1988 ha causato notevoli perdite di produzione. Questa ruggine non presente in Europa dal 1950 è riapparsa in Sicilia nel 2016 (Bhattacharya, 2017). Un altro patogeno importante agente causale della fusariosi della spiga, è *Fusarium graminearum* che oltre a provocare ingenti perdite di produzione determina la sintesi di pericolose micotossine, tra cui la più famosa è il deossivalenolo (DON). La quantità di micotossine presente negli alimenti è regolamentata dall'Unione Europea, con livelli che vanno da 1250 a 1750 ppb per i prodotti non processati e fra 200-750 ppb per i prodotti finiti (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex%3A32006R1881>). Altri patogeni che attaccano la spiga sono *Ustilago tritici* agente causale del carbone, *Tilletia caries* e *Tilletia foetida* agenti causali della carie. Tutti causano la comparsa di una polvere nera che nel caso della carie è contenuta all'interno di sori. Entrambe le malattie sono molto distruttive ma poco preoccupanti infatti i rispettivi patogeni compiono una sola generazione all'anno, inoltre vengono controllate attraverso la concia del seme con fungicidi o con acqua calda (Autori vari, 2018). La carie è quella che provoca i danni maggiori infatti in caso di forti attacchi possono insorgere problematiche igienico-sanitarie (Pasquini and Delogu 2003). Due malattie molto diffuse nei nostri areali cerealicoli sono anche il mal del piede e l'oidio. Con il termine mal del piede si fa riferimento a diversi patogeni che possono attaccare il frumento singolarmente o in associazione e colpiscono la parte basale della pianta. Questi patogeni causano una mancata germinazione del seme, la morte delle plantule e imbrunimenti del fusticino (Autori vari, 2018). I danni che ne derivano sono ingenti e possono arrivare a causare anche elevate perdite di produzione se i semi non vengono adeguatamente concati (Pasquini and Delogu 2003). L'oidio è causato da *Blumeria graminis* che provoca la diminuzione di amido nella granella con conseguente diminuzione di resa e qualità. Solo con condizioni climatiche particolarmente favorevoli causa danni rilevanti (Pasquini and

Delogu 2003). Un'altra malattia molto preoccupante è la septoriosi causata da *Zymoseptoria tritici* che verrà meglio descritta nei capitoli seguenti. Anche se non tipica dei nostri areali tra i patogeni che attaccano la spiga è importante citare la *Parastagonospora nodorum* agente causale della stagonosporiosi. Questo patogeno tipico delle latitudini nordiche (Leath *et al.*, 1993) ha perso importanza in paesi come il Regno Unito (Shaw, 1999) e la Germania dove *Z. tritici* è diventata preponderante (Eyal *et al.*, 1999). La *P. nodorum* causa sintomi sulle foglie, ma i danni maggiori si verificano quando vengono attaccate le cariossidi dove si formano lesioni di colore bruno in grado di coinvolgere l'intera spiga (Friskop and Liu 2016).

2) *Zymoseptoria tritici*

2.1) Tassonomia

Mycosphaerella graminicola anamorfo *Zymoseptoria tritici* è un fungo ascomicete, agente causale della septoriosi (Kema *et al.*, 1996a) che rappresenta una delle più importanti malattie fungine del frumento (Stukenbrock *et al.*, 2010).

Regno: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycota

Classe: Dothideomycetes

Famiglia: Mycosphaerellaceae

Genere: *Mycosphaerella*

Specie: *graminicola*

Anamorfo: *Zymoseptoria tritici*

Al genere *Mycosphaerella* appartengono molti altri importanti patogeni come: *M. fijiensis* che causa la malattia nota come "Black sigatoka" del banano, *M. fragaria* agente della vaiolatura della fragola e *M. citri* che dà origine al "greasy spot" degli agrumi (Agrios, 2004).

2.2) Sintomi

I primi sintomi appaiono in autunno o primavera, all'emergenza delle piante, e sono costituiti da macchie grigio-verdi dalla forma allungata e irregolare aventi dimensioni di

1-5 x 4-15 mm. Successivamente le lesioni necrotizzano e confluiscono, causando un generale disseccamento sul quale si sviluppano i picnidi, aventi aspetto globoso e colore bruno-nerastro (Figura 3 a-b).

I sintomi appaiono prima sulle foglie basali e gradualmente arrivano a interessare le foglie di nuova formazione. I danni maggiori si verificano quando viene infettata la foglia a bandiera (Eyal, 1981, Eyal *et al.*, 1987).

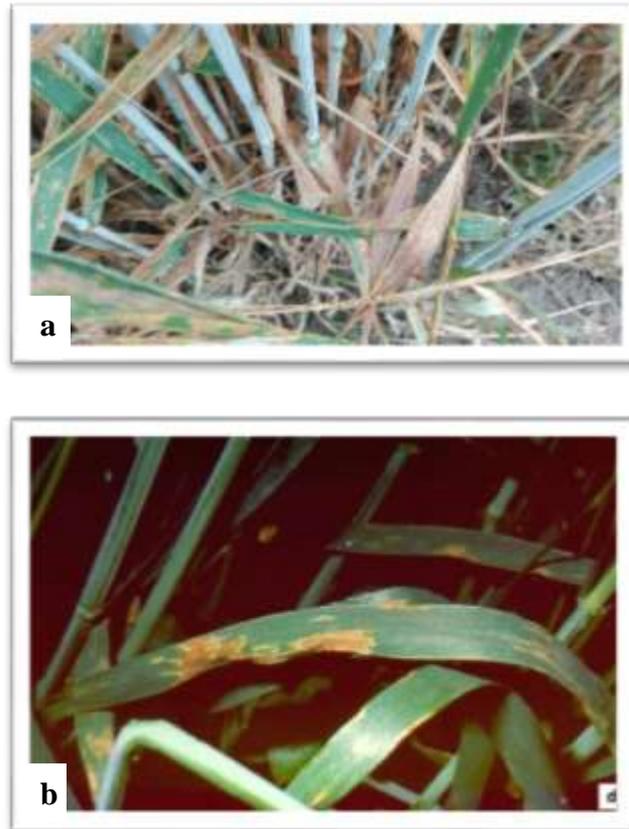


Fig 3 (a-b). Sintomi di *Zymoseptoria tritici* su foglia. (Foto di **a** Battistini, **b** Prodi)

2.3) Ciclo biologico

Z. tritici è un patogeno caratterizzato da un processo infettivo composto da due fasi. La seconda fase viene definita necrotrofica ed è caratterizzata dalla morte programmata delle cellule. La modalità di acquisizione dei nutrienti da parte del patogeno durante la prima fase, non è stata ancora ben chiarita questo rende difficile classificare il patogeno che si comporta sia da biotrofo in quanto entra all'interno della cellula che da endofita in quanto è caratterizzato da una fase asintomatica (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015).

Il patogeno svolge il suo ciclo biologico svernando come micelio, picnidi o pseudotecii nei residui della vegetazione (Figura 4). Le prime infezioni si verificano in autunno o

primavera e sono causate dalle ascospore rilasciate dagli pseudotecii che vengono trasportate dal vento, ma anche dalle picnidiospore che arrivano sulla vegetazione attraverso gli schizzi di pioggia.

Durante la prima fase le strutture svernanti penetrano attraverso gli stomi. Dopo 12-24 h inizia lo sviluppo delle ife fungine che invadono la cavità sottostomatica e colonizzano l'apoplasto. Il fungo non sviluppa austeri e non è chiaro se in questo stadio viva utilizzando le risorse della pianta (Kettles and Kanyuka, 2016). Questa fase che può durare da 6 a 36 giorni, è caratterizzata dall'assenza di sintomi e viene definita "periodo di latenza".

Con l'attivazione dei meccanismi di difesa della pianta, che danno origine alla morte programmata delle cellule (Keon *et al.*, 2007), inizia la fase necrotrofica. Conseguentemente appaiono i primi sintomi costituiti da macchie necrotiche, sulle quali si sviluppano i picnidi. Quest'ultimi si formano sotto gli stomi, rimanendo incorporati nell'epidermide della pianta (Kema *et al.*, 1996a) e hanno dimensioni che possono variare da 60 a 200 μm (Sanderson *et al.*, 1985). In condizioni di elevata umidità, dai picnidi fuoriescono le picnidiospore contenute all'interno di cirri gelatinosi. Queste rappresentano la fase agamica del patogeno e ne permettono la diffusione a brevi distanze attraverso gli schizzi di pioggia. Quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli e sulle foglie infette si trovano due individui aventi diverso mating-type ha inizio la fase gamica che porta alla formazione del corpo fruttifero contenente le ascospore.

Le ascospore aventi forma ellittica e una dimensione variabile in un range tra 2,5-4 x 9-16 μm , permettono lo svernamento del patogeno e la sua diffusione a lunghe distanze attraverso il vento. Sono divise in due parti di dimensione non omogenea e sono contenute all'interno del corpo fruttifero denominato pseudotecio. Ogni corpo fruttifero, avente dimensioni variabili da 68 a 114 μm , contiene 8 ascospore (Ponomarenko *et al.*, 2011).

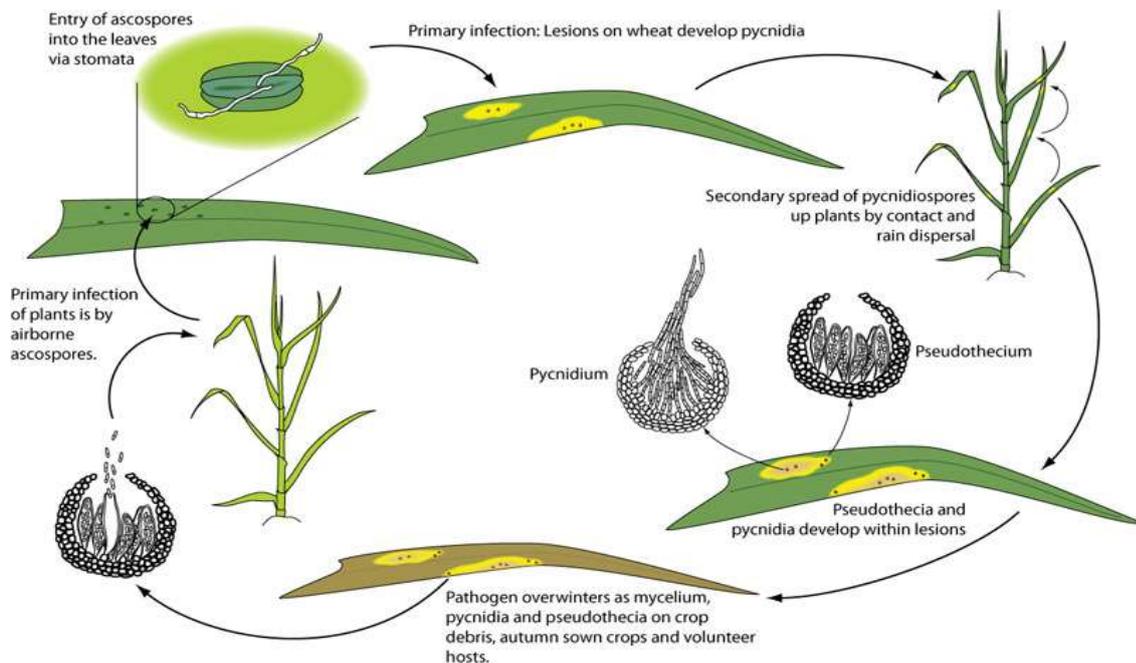


Fig 4. Ciclo biologico di *Zymoseptoria tritici* (Ponomarenko *et al.*, 2011).

2.4) Importanza del patogeno

Zymoseptoria tritici è il patogeno del frumento più diffuso in Europa e può arrivare a causare perdite di produzione del 30-50% quando viene colpita la foglia a bandiera (Eyal *et al.*, 1987). Questo rende chiaro come degli 1,3 milioni di euro di valore del mercato europeo dei fungicidi utilizzati su frumento, 0,9 milioni vengono impiegati per la difesa nei confronti del patogeno (Torriani *et al.*, 2015). In Inghilterra le perdite medie annuali si aggirano intorno al 20% del raccolto, su cultivar sensibili che non vengono trattate con fungicidi, mentre su cultivar resistenti adeguatamente trattate, le perdite sono del 5-10%. Per aiutare gli agricoltori nella gestione della septoriosi la Home Grown Cereal Authority ogni anno emette una lista con le caratteristiche delle principali varietà di frumento, fra le quali assume particolare importanza la resistenza a *Z. tritici* (<https://cereals.ahdb.org.uk/media/1328185/Table-1-Winter-wheat-AHDB-Recommended-List-2018-19.pdf>). In Danimarca e sud della Svezia è il patogeno predominante e causa perdite di produzione del 10% (Jørgensen *et al.*, 2014). La septoriosi è tipica anche degli areali mediterranei. In Tunisia le perdite possono arrivare al 30-50% (Fakhfakh *et al.*, 2009) mentre rappresenta il più frequente patogeno fogliare del frumento in Marocco (Siah *et al.*, 2014). Negli Stati Uniti *Z. tritici* è tra i primi tre patogeni che causano i maggiori danni economici su frumento (Ponomarenko *et al.*, 2011) mentre in Australia le perdite di produzione possono raggiungere il 30% (Bhathal *et al.*, 2003). In Italia le prime segnalazioni di danni causati dal patogeno risalgono al 2007, e le

infezioni hanno seguito un andamento altalenante con anni caratterizzati da una perdita di produzione superiore al 30%, accanto a anni con scarsa pressione della malattia. (Tonti *et al.*, 2019).

2.5) Difesa

La difesa nei confronti di *Z. tritici* si basa principalmente sull'uso di cultivar tolleranti e sull'impiego di fungicidi. Non vanno però dimenticati gli accorgimenti agronomici che possono sfavorire la diffusione del patogeno come: le rotazioni, la bruciatura o l'interramento delle stoppie, la riduzione della densità di semina e una concimazione bilanciata.

2.5.1) Impiego di cultivar tolleranti

L'utilizzo di cultivar tolleranti rappresenta un importante mezzo per contrastare il patogeno. Il tipo di resistenza che le piante manifestano può essere di tipo genetico o morfologico (Ponomarenko *et al.*, 2011).

La resistenza morfologica è rappresentata dalle caratteristiche della pianta che sfavoriscono la diffusione del patogeno, ad esempio un aumento della distanza degli internodi e una ridotta lunghezza delle foglie (Arraiano *et al.*, 2009).

La resistenza genetica può essere di tipo qualitativo o quantitativo (Arraiano and Brown, 2006, Arraiano *et al.*, 2009).

La resistenza qualitativa è controllata da pochi geni, che sono in grado di conferire una forte resistenza. Nel frumento tenero 21, di questi sono già stati largamente investigati e mappati. Il più studiato è *Stb6*, che è stato per la prima volta identificato in Gran Bretagna nelle cultivar Flame e Hereward e conferisce resistenza a un isolato tedesco di *Z. tritici* IPO323 (Brown *et al.*, 2015).

Nel frumento duro questa resistenza non è stata ancora molto investigata. Soltanto in Tunisia un'antica cv di frumento duro 'Agili', si è dimostrata molto resistente nei confronti dell'isolato Tun6. Questo tipo di resistenza, è controllata da un singolo gene dominante, e studi indicano un'interazione gene-for-gene fra la cultivar e l'isolato (Ferjaoui *et al.*, 2010).

La resistenza qualitativa è molto usata nei programmi di breeding ma uno dei principali svantaggi è rappresentato dalla scarsa permanenza dei suoi effetti nel tempo, infatti questi geni vengono facilmente superati dal patogeno (Mundt, 2014).

La resistenza quantitativa è controllata da molti geni che hanno un effetto additivo, conferiscono quindi una resistenza che può variare da bassa a moderata. I Quantitative Trait Loci (QTL) coinvolti sono distribuiti su tutto il genoma del frumento, con particolare abbondanza nelle braccia del cromosoma 3BL, 6BS e 7DL (Brown *et al.*, 2015). Questa resistenza ha il vantaggio di essere più stabile nel tempo, in quanto perde i suoi effetti gradualmente (Krenz *et al.*, 2008).

2.5.2) Impiego di fungicidi

L'impiego di fungicidi rappresenta il mezzo di difesa più comune contro la septoriosi. Le famiglie di fungicidi utilizzate sono: gli analoghi delle strobilurine (QoI), gli Inibitori della Demetilazione (DMI) e gli Inibitori della Succinato Deidrogenasi (SDHI).

QoI

I QoI agiscono nel ciclo della respirazione a livello del complesso III del citocromo bc₁, andando a inibire il trasporto di elettroni. Questo impedisce la sintesi di adenosine triphosphate (ATP) che causa un deficit energetico nel patogeno. La nascita di questi prodotti è stata ispirata da una serie di fungicidi naturali, derivati dell'acido β-metossiacrilico, prodotti da un *range* di funghi basidiomiceti causanti carie del legno. Le prime strobilurine introdotte nel 1996 sono state azoxystrobin e kresoxim-methyl che venivano impiegate nella difesa delle colture cerealicole. In seguito sono state introdotti, trifloxystrobin, metominostrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, famoxadone e fenamidone (Bartlett *et al.*, 2002).

Questa classe di fungicidi è ad ampio spettro e viene impiegata contro ascomiceti, basidiomiceti e oomiceti, ma a causa del meccanismo d'azione molto specifico viene classificata dal Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) come ad alto rischio di resistenza <http://www.frac.info/working-group/qol-fungicides>. Il FRAC è un gruppo costituito dai maggiori esperti delle aziende agrochimiche, che ha lo scopo di fornire linee guida sulla gestione e prevenzione delle resistenze ai fungicidi. Proprio per questo ogni anno effettua attività di monitoraggio, sulle popolazioni dei patogeni fungini con le famiglie di prodotti impiegate nella difesa, allo scopo di mettere in luce eventuali fenomeni di resistenza. Un'altro importante compito del FRAC è la divulgazione dei dati e delle metodologie usate nei monitoraggi. Queste attività permettono di prolungare l'efficacia dei prodotti "a rischio" e limitare le perdite di raccolto in caso di resistenza.

La resistenza ai QoI è monogenica e si sviluppa in breve tempo. Le sostituzioni che causano una parziale o completa resistenza sono:

- G143A (sostituzione di una glicina con una alanina in posizione 143): conferisce una resistenza totale. Il Fattore di resistenza ($FR = DE_{50}$ di isolato resistente / DE_{50} di isolato sensibile) è > 100 .
- F129L (sostituzione di una fenilalanina con una leucina in posizione 129): conferisce una resistenza parziale. Il FR è più basso rispetto alla G143A.
- G137R (sostituzione di una glicina con una arginina in posizione 137): conferisce una resistenza parziale. Il FR è più basso rispetto alla G143A.

La sostituzione responsabile della resistenza alle strobilurine in *Z. tritici* è la G143A ed è molto comune nelle popolazioni europee. La G143A è comune anche in molti altri patogeni, nel 1998 è stata individuata in Germania in *Blumeria (Erysiphe) graminis* f.sp. *tritici* (Felsestein, 1999), nel 2000 in *Mycosphaerella fijiensis* (Sierotzki *et al.*, 2000) e *Venturia inaequalis* (Zheng *et al.*, 2000), nel 2003 in *Alternaria alternata* (Malandrakis *et al.*, 2018). Il FRAC riporta una lista più completa dei patogeni che comprende anche: *Alternaria mali*, *Ascochyta rabiei*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola*, *Colletotrichum graminicola*, *Corynespora cassicola*, *Didymella bryoniae*, *Erisiphe necator*, *Glomerella cingulata*, *Microdochium nivale*, *Microdochium majus*, *Mycosphaerella musicola*, *Mycovellosiella natrassii*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Plasmopara viticola*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pyricularia grisea*, *Ramularia collo-cygni*, *Rhynchosporium secalis*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Stemphylium vesicarium*, *Venturia pirina*.

Le sostituzioni F129L e/o G137R sono meno comuni e sono state ritrovate in isolati di: *Alternaria solani*, *Passalora fulva*, *Plasmopara viticola*, *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pyricularia grisea*, *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. (FRAC [http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-\(updated-2012\).pdf?sfvrsn=4](http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-(updated-2012).pdf?sfvrsn=4)).

Oltre alle sostituzioni sopra elencate, in *A. alternata*, *Pyrenophora teres* e nel genere *Puccinia* è stata osservata, subito dopo la tripletta GGT che codifica per la glicina in posizione 143, l'inserzione di un introne. In questi casi una sostituzione nucleotidica in posizione 143 impedisce lo *splicing* dell'introne portando a un citocromo *b* inefficiente che causa la morte del patogeno. Di conseguenza l'insorgere della resistenza alle strobilurine causato dalla G143A non può verificarsi in patogeni portanti l'introne

(Grasso *et al.*, 2006). La presenza dell'introne è stata verificata anche in *Monilinia laxa*, *M. fructicola*, e *Guignardia bidwelli* (Miessner and Stammeler 2010, Luo *et al.* 2010, Miessner *et al.*, 2011).

DMI

I DMI agiscono inibendo la demetilazione a livello del carbonio 14 (*erg11/cyp51*) coinvolto nella sintesi degli steroli in particolare dell'ergosterolo responsabile dell'integrità della membrana cellulare. Questi prodotti hanno un ampio spettro d'azione contro importanti patogeni che attaccano piante arboree ed erbacee.

Questa classe è composta da diversi gruppi chimici: piperazine, piridine, pirimidine, imidazoli, triazoli, triazolinthioni e viene classificata dal FRAC con un rischio di resistenza medio. Il primo fungicida introdotto sul mercato è stato triforine nel 1969 e negli anni '70 ne seguirono altri come triadimefon e imazalil (1973), fenarimol, nuarimol e buthiobate (1975), triadimenol e procloraz (1977), bitertanolo e etaconazolo (1979) (Russel, 2005).

La resistenza che coinvolge i DMI è poligenica, quindi caratterizzata da una perdita di efficacia graduale nel tempo, e incrociata fra i principi attivi appartenenti a uno stesso gruppo chimico.

In *Z. tritici* sono stati descritti tre meccanismi responsabili di cali di efficacia in questa classe:

- Presenza di mutazioni nel gene *CYP51* aventi effetto additivo, che provocano una progressiva perdita di efficacia.
- Super espressione del gene *CYP51* legata all'inserzione di 120 bp nella regione del promotore.
- Capacità della membrana cellulare di ridurre l'accumulo del fungicida.

La presenza di mutazioni nel gene *CYP51* rappresenta il meccanismo di resistenza più comune. In *Z. tritici* numerose mutazioni sono state descritte (Tabella 4).

Tab 4. Mutazioni ritrovate in isolati provenienti da campo di *Z. tritici*. (Cools and Fraaije 2013 modificata).

Mutazioni in MgCYP51	Anno di identificazione/ Rara o comune nelle moderne popolazioni Europee	Referenze
L50S	1988/ Comune	Leroux <i>et al.</i> , 2007, Cools <i>et al.</i> , 2010
D107V	1998/ Rara	Stammler <i>et al.</i> , 2008
D134G	2006/ Comune	Leroux <i>et al.</i> , 2011, Stammler <i>et al.</i> , 2008
V136A	2003/ Comune	Cools <i>et al.</i> , 2011, Leroux <i>et al.</i> , 2007
V136C	2004/ Comune	Leroux <i>et al.</i> , 2007 Stammler and Semar 2011
V136G	2004/ Rara	Stammler and Semar 2011
Y137F	1993/ Rara	Cools <i>et al.</i> , 2011, Leroux <i>et al.</i> , 2007
M145L	1993/ Rara	Leroux <i>et al.</i> , 2011
N178S	1995/ Rara	Cools and Fraaije 2012
S188N	1993/ Comune	Leroux <i>et al.</i> , 2007, Cools <i>et al.</i> , 2011
S208T	2009, 2010/ Comune	Stammler and Semar 2011
N284H	2009, 2010/ Comune	Stammler and Semar 2011
H303Y	2011/ Rara	Cools and Fraaije 2013
A311G	2006/ Rara	Cools and Fraaije 2013
G312A	2003/ Rara	Cools and Fraaije 2012
A379G	2003/ Comune	Leroux <i>et al.</i> , 2007
I381V	2001/ Comune	Fraaije <i>et al.</i> , 2007, Leroux <i>et al.</i> , 2007
A410T	2009, 2010/ Rara	Stammler and Semar 2011
G412A	2009, 2010/ Rara	Stammler and Semar 2011
Y459C	1992/ Rara	Brunner <i>et al.</i> , 2006
Y459D	2003/ Comune	Leroux <i>et al.</i> , 2007
Y459N	Rara	Stammler <i>et al.</i> , 2008
Y459P	1999/ Rara	Brunner <i>et al.</i> , 2006
Y459S	2004/ Rara	Brunner <i>et al.</i> , 2006
G460D	1992/ Rara	Brunner <i>et al.</i> , 2006
Y461D	1999/ Rara	Brunner <i>et al.</i> , 2006
Y461H	2001/ Comune	Leroux <i>et al.</i> , 2007, Cools <i>et al.</i> , 2010
Y461S	1999/ Comune in popolazioni Irlandesi	Cools <i>et al.</i> , 2011, Leroux <i>et al.</i> , 2007

ΔY459 o ΔG460	2004/ Rara	Brunner <i>et al.</i> , 2006
ΔY459/G460	1999/ Comune	Leroux <i>et al.</i> ,2007, Cools <i>et al.</i> ,2011
V490L	2006/ Rara	Stammler and Semar 2011
G510C	2004/ Rara	Leroux <i>et al.</i> ,2007
N513K	1993/ Comune	Leroux <i>et al.</i> ,2007
S524T	2001/ Comune	Cools <i>et al.</i> ,2011

La combinazione di queste mutazioni porta alla formazione di diversi aplotipi (Leroux *et al.*, 2007; Stammler *et al.*, 2008; Huf *et al.*, 2018) rendendo difficile individuare il fattore di resistenza associato alla singola mutazione.

Una ridotta sensibilità ai DMI si è verificata anche in altri patogeni tra cui: *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (Fletcher and Wolfe 1981), in isolati greci di *Cercospora beticola* (Karaoglanidis *et al.*, 2000) e in una popolazione di New York di *Fusarium graminearum* (Spolti *et al.*, 2014). Un elenco dettagliato dei patogeni aggiornato al 2018 è disponibile nel sito del FRAC http://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms_may_2018.pdf?sfvrsn=a2454b9a_2.

La super espressione del gene *CYP51* è un meccanismo di resistenza comune in molti patogeni fra cui *V. inaequalis* (Schnabel and Jones 2001) e *C. beticola* (Nikou *et al.*,2009). Diversi studi condotti su isolati di *Z. tritici* hanno riportato la presenza di questo meccanismo (Stergiopoulos *et al.*, 2003, Chassot *et al.*, 2008, Leroux and Walker, 2011).

La capacità della membrana cellulare di ridurre l'accumulo del fungicida è un meccanismo di resistenza molto comune in *Candida albicans* ed è legato alla super espressione di una pompa di deflusso legata alla membrana cellulare. Alcuni isolati di *Z. tritici* provenienti da Francia e Gran Bretagna, che manifestavano questa super espressione, presentavano resistenza a diverse classi di fungicidi (multiple drug resistance, MDR) (Leroux and Walker, 2011). Recentemente un'inserzione di 519bp nella regione del promotore del MFS1 (Major Facilitator Superfamily) è stata correlata alla presenza della MDR (Omrane *et al.*,2017).

SDHI

La succinato deidrogenasi (Sdh) è un importante complesso enzimatico della respirazione mitocondriale, composta da quattro polipeptidi che costituiscono le quattro subunità A, B, C e D della molecola. Le prime due sono idrofile (Sdh-A e Sdh-B) e rappresentano la parte solubile, mentre le rimanenti due sono idrofobiche (Sdh-C e Sdh-D) e rappresentano la parte insolubile.

Gli SDHI agiscono nel ciclo della respirazione, a livello del complesso II, andando a competere con il sito di legame dell'ubiquinone appunto formato dall'unione delle subunità B, C e D della SDH inibendo il trasporto di elettroni (Ulrich and Mathre, 1972) (Figura 5).

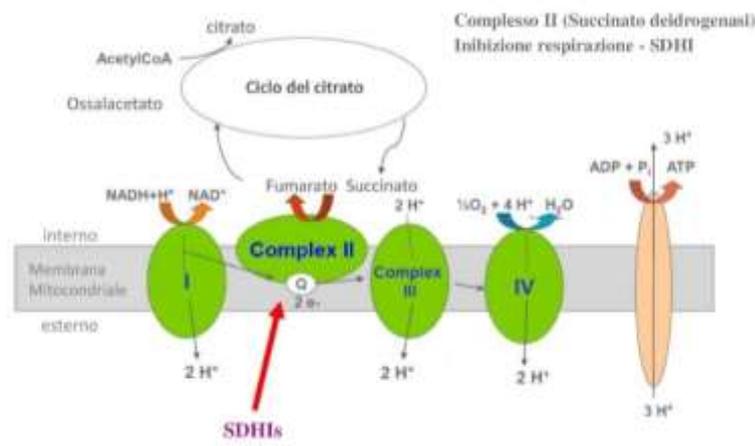


Fig 5. Meccanismo d'azione degli SDHI (www.dowagro.com modificata).

Il primo SDHI introdotto sul mercato, circa 40 anni fa, è stato la carboxina ma aveva uno spettro d'azione limitato ai basidiomiceti e veniva impiegata sul seme come conciante. A partire dal 2003 è stata introdotta una nuova generazione di prodotti ad azione fogliare e con uno spettro d'azione più ampio. Il primo prodotto appartenente alla nuova generazione è stato il boscalid e all'attualità si contano 17 principi attivi appartenenti a questo gruppo (Sierotzki and Scalliet, 2013).

Gli SDHI vengono classificati dal FRAC come prodotti a rischio di resistenza medio-alto e hanno una resistenza di tipo poligenico. Mutazioni che conferiscono una ridotta sensibilità a questi fungicidi, sono state ritrovate in isolati provenienti da campo e mutanti creati in laboratorio di diversi patogeni ma essendo fungicidi di recente introduzione, l'elenco è in continuo aggiornamento. L'effetto di queste mutazioni è difficile da determinare infatti in uno studio di Sierotzki and Scalliet, (2013) la stessa mutazione ha

avuto ripercussioni differenti in base a: specie del patogeno, uso dei fungicidi, provenienza degli isolati. Le mutazioni ritrovate in isolati provenienti da campo, o mutanti di *Z. tritici* sono elencate in tabella 5.

Tab 5. Elenco di mutazioni ritrovate in isolati provenienti da campo o mutanti di *Z. tritici* creati in laboratorio.

Subunità della Sdh	Sostituzione	Mutanti creati in laboratorio	Isolati provenienti da campo	Referenze
B	K48R		X	Fraaije <i>et al.</i> , 2012
B	N225I		X	FRAC
B	H267Y/L	X		Skinner <i>et al.</i> , 98; Fraaije <i>et al.</i> , 2012
B	R265/P		X	FRAC
B	T268I/A		X	FRAC
B	C276R		X	Fraaije <i>et al.</i> , 2012
C	I29V		X	Fraaije <i>et al.</i> , 2012
C	N33T		X	Fraaije <i>et al.</i> , 2012
C	N34T		X	Fraaije <i>et al.</i> , 2012
C	S51P		X	Fraaije <i>et al.</i> , 2012
C	R54G		X	Fraaije <i>et al.</i> , 2012
C	T79N/I		X	FRAC
C	W80S		X	FRAC
C	A84V	X		Scalliet <i>et al.</i> , 2012
C	S83G	X		Scalliet <i>et al.</i> , 2012
C	N86S/A		X	FRAC
C	N86K	X		Fraaije <i>et al.</i> ,2012
C	R151S/T/M		X	FRAC
C	H152R	X	X	Scalliet <i>et al.</i> , 2012, Dooley <i>et al.</i> , 2016
C	V166M		X	FRAC
C	T168R		X	FRAC
D	A10G		X	Fraaije <i>et al.</i> ,2012
D	R47P		X	Fraaije <i>et al.</i> ,2012
D	I50F		X	FRAC
D	M114V		X	FRAC
D	D129 E/G		X	Fraaije <i>et al.</i> ,2012

2.5.3) Impiego di fungicidi contro la septoriosi in Italia

Grazie a un clima più mite, l'Italia, rispetto al Nord Europa, può ricorrere a un solo intervento per il controllo della malattia, effettuato alla fase fenologica di foglia a bandiera (BBCH39) (Ponti *et al.*, 2018). Tuttavia la migliore strategia per un buon contenimento, sia in condizioni di bassa che di alta pressione infettiva, è la combinazione di un trattamento in levata con uno in spigatura (Blandino *et al.*, 2010). Le tre classi di fungicidi descritte dovrebbero essere impiegate seguendo le indicazioni sulle strategie anti resistenza consigliate dal FRAC <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf?sfvrsn=8> che prevedono di:

- Non usare un prodotto da solo ma applicarlo in miscela con prodotti a diverso meccanismo d'azione
- Trattare solo quando strettamente necessario in modo da limitare il numero di trattamenti per stagione
- Usare la concentrazione di prodotto raccomandata dai produttori
- Evitare trattamenti eradicanti
- Non adottare una difesa esclusivamente di tipo chimico ma inserirla all'interno di una difesa integrata

I fungicidi impiegati in Italia per il contenimento di *Z. tritici* sono elencati in tabella 6.

Tab 6. Fungicidi utilizzati in Italia per il contenimento della septoriosi del frumento.

Sito target	Gruppo	Prodotto
Multi sito	Composti inorganici	Rame, Zolfo
Multi sito	Cloronitrili	Clorotalonil
Multi sito	Ditiocarbammati	Mancozeb
Inibitori della demetilazione (<i>erg11/cyp 51</i>)	DMI	prochloraz, bromuconazolo, ciproconazolo, difenoconazolo, epoxyconazolo, flutriafol, metconazolo, tebuconazolo, tetraconazolo, propiconazolo, prothioconazolo
Complesso III: citocromo <i>bc1</i>	QoI	azoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin
Complesso II: succinato deidrogenasi	SDHI	bixafen, fluxapyroxad, isopyrazam, Solatenol

SCOPO DELLA TESI

Z. tritici è un patogeno molto importante e diffuso nel nord-centro Europa, dove causa ingenti perdite di produzione. Ogni anno fino a quattro interventi sono necessari per contenere le infezioni (Fones and Gurr, 2015) e data la sua importanza economica è stato largamente investigato. In Italia il patogeno è diventato preoccupante in epoca più recente (dal 2007), con intensità delle infezioni non omogenea (presenza di anni con grave compromissione della produzione, superiore al 30%, accanto a anni con scarsa pressione della malattia) (Tonti *et al.*, 2019).

Il territorio italiano, al contrario del nord Europa, è caratterizzato dalla predominante coltivazione del frumento duro che è notoriamente più sensibile a *Z. tritici* (Pascal *et al.*, 2002, Pasquini *et al.*, 2006) mentre la regione Emilia-Romagna coltiva frumento tenero e duro in quasi egual misura. Precedenti studi condotti in Europa hanno evidenziato la specializzazione di isolati di *Z. tritici* al frumento duro e tenero (Eyal *et al.*, 1973; Kema *et al.*, 1996a, b; Medini and Hamza, 2008) e hanno ipotizzato la presenza di una interazione “gene-for-gene”.

Le suddette peculiarità del patogeno e della pianta ospite che caratterizzano il territorio italiano hanno condotto a una diversa gestione di *Z. tritici* rispetto al Nord-Centro Europa con un inferiore numero di applicazioni di fungicidi e, in parte, a un loro diverso posizionamento. La segnalazione, in particolare proveniente dall’areale emiliano della regione, di cali di efficacia dei QoI ha recentemente portato a incrementare l’interesse verso il patogeno anche sotto l’aspetto della sensibilità ai fungicidi.

Lo scopo dello studio condotto nel triennio di dottorato è stato quindi quello di prendere in esame le principali strategie utilizzate in campo per il contenimento di *Z. tritici*, che prevedono l’impiego di fungicidi e l’uso di cultivar tolleranti con l’obiettivo di ampliare e approfondire le conoscenze in un contesto territoriale diverso da quello Nord-Europeo.

Nello specifico, il primo obiettivo è stato quello di valutare la sensibilità di popolazioni di *Z. tritici* alle principali famiglie di fungicidi impiegate nella difesa quali QoI, DMI e SDHI. All’interno di questa tematica è stato anche individuato e sviluppato un rapido, sensibile e accurato protocollo per la determinazione della frequenza allelica della G143A, sostituzione responsabile della resistenza ai QoI. La messa a punto del protocollo è avvenuta utilizzando la Droplets Digital PCR, metodo alternativo alla qPCR. Un altro obiettivo è stato quello di valutare la sensibilità di cultivar italiane a *Z. tritici* verificando

anche la eventuale presenza della specificità degli isolati italiani sulle singole specie di frumento tenero e duro.

La sensibilità del patogeno ai fungicidi e quella di cultivar italiane alla septoriosi rappresentano le basi fondamentali per stabilire la migliore strategia di difesa, specialmente in Italia dove, considerato il recente interesse verso il patogeno, studi di questo tipo non sono mai stati condotti.

CAPITOLO 1

SENSIBILITÀ DI ISOLATI ITALIANI DI *ZYMOSEPTORIA TRITICI* A QoI, DMI E SDHI

1) Introduzione

La septoriosi è una delle più importanti malattie fogliari del frumento ed è causata dal fungo patogeno *Mycosphaerella graminicola* (anamorfo *Zymoseptoria tritici*). È molto diffusa nel Nord-Centro Europa e ogni anno causa ingenti perdite di produzione.

Contro la septoriosi l'utilizzo di cultivar tolleranti non è completamente efficace, conseguentemente per effettuare una adeguata difesa occorre ricorrere all'impiego di fungicidi. Le principali classi impiegate sono gli Inibitori della Demetilazione (DMI), gli Inibitori della Succinato Deidrogenasi (SDHI) e gli analoghi delle strobilurine (che appartengono al gruppo dei QoI).

I primi DMI sono stati introdotti nel 1970 (Russell, 2005) e agiscono a livello del carbonio 14 (*CYP51*) coinvolto nella sintesi dell'ergosterolo. I meccanismi che causano cali di efficacia in questa classe sono tre e il più comune è lo sviluppo di sostituzioni nel gene target (*CYP51*). Le principali sostituzioni descritte nelle popolazioni europee di *Z. tritici* sono le seguenti: L50S, S188N, N513K, Y137F, D134G, V136A, I381V, A379G, Δ Y459/G460 e S524T (Cools and Fraaije, 2013). Queste sostituzioni e la delezione possono presentarsi singolarmente ma alcune anche contemporaneamente negli isolati fungini dando origine a diversi aplotipi tali da rendere molto complesso associare ad ogni sostituzione una specifica resistenza nei confronti di un determinato principio attivo (Leroux *et al.*, 2007; Stammler *et al.*, 2008; Huf *et al.*, 2018). Per le sostituzioni I381V e A379G si è invece stati in grado di associarle alla ridotta sensibilità rispettivamente al tebuconazolo e prothioconazolo (Cools *et al.*, 2011).

Il secondo meccanismo responsabile di fenomeni di resistenza è la super espressione del gene *CYP51* che è correlata con l'inserzione di 120 bp nella regione del promotore. Isolati portanti questa alterazione sono stati trovati in Francia, Germania, Inghilterra e Irlanda (Stergiopoulos *et al.*, 2003, Chassot *et al.*, 2008, Leroux *et al.*, 2011, Walker *et al.*, 2010). Nello studio di Cools *et al.*, 2012, isolati che presentavano l'inserzione sono risultati meno sensibili a tutti i triazoli provati sia *in vitro* che *in vivo*.

L'ultimo meccanismo responsabile di cali di efficacia è poi la *Multi Drug Resistance* (MDR) che si esprime attraverso la capacità della membrana di ridurre l'accumulo del

fungicida all'interno della cellula fungina. Questo fenomeno è legato alla super espressione dei geni di trasporto della membrana (MFS1), che provocano l'espulsione del fungicida dalla cellula. Alcuni isolati provenienti da Francia e Regno Unito hanno manifestato questa resistenza (Leroux *et al.*, 2011).

Nonostante i cali di efficacia precedentemente descritti, i DMI, se applicati secondo le linee guida delle società produttrici, sono ancora in grado di contenere adeguatamente il patogeno in campo (Heick *et al.*, 2017; Cools *et al.*, 2011).

I QoI sono stati introdotti nel 1996 e agiscono inibendo il trasporto di elettroni a livello del complesso III del citocromo bc1, la cui espressione è codificata a livello del genoma mitocondriale. (Bartlett *et al.*, 2002). I QoI sono prodotti monosito che vengono considerati ad alto rischio di sviluppo di resistenza, infatti un anno dopo la loro introduzione si è verificata, in popolazioni di *Mycosphaerella fijiensis*, la prima segnalazione di cali di efficacia in campo dimostratasi legata a resistenza (Sierotzki *et al.*, 2000). La sostituzione di una glicina con una alanina in posizione 143 (G143A) nel complesso III della catena respiratoria è stata diffusamente associata al fenomeno di resistenza a questa categoria di prodotti. Il primo caso di resistenza in *Z. tritici* risale al 2001 nel Regno Unito (Fraaije *et al.*, 2003) seguito da una rapida diffusione in altri paesi Europei come il Belgio (Amand *et al.*, 2003), Irlanda (Gisi *et al.*, 2005; McCartney *et al.*, 2007), Francia (Siah *et al.*, 2010), Repubblica Ceca (Drabešová *et al.*, 2013) e nelle Regioni Baltiche (Heick *et al.*, 2017). Attualmente la resistenza ai QoI è diffusa in tutta l'Europa Occidentale (Fraaije *et al.*, 2005). Isolati portanti la G143A sono stati trovati anche in Nord America (Estep *et al.*, 2013) e Nuova Zelanda (Stewart *et al.*, 2014). La situazione è diversa in Africa dove le strobilurine sono state meno impiegate rispetto all'Europa; la resistenza è infatti presente ma con basse frequenze dell'allele mutato in Tunisia, Marocco e Algeria (Taher *et al.*, 2014, Siah *et al.*, 2014, Alloui *et al.*, 2016). La veloce diffusione della sostituzione può essere spiegata dalla migrazione delle ascospore trasportate dal vento a lunghe distanze (Fraaije *et al.*, 2005) o dalla sua emergenza indipendente in almeno quattro occasioni, documentate nelle popolazioni Europee (Torriani *et al.*, 2009).

Il più recente gruppo di fungicidi impiegati nella difesa sono gli SDHI che agiscono nel ciclo della respirazione a livello del complesso II andando a inibire la succinato-ubichinone ossido-reduttasi. Il primo SDHI introdotto nel mercato nel 1969 è stato la carboxina mentre negli ultimi anni una nuova generazione di molecole aventi uno spettro

d'azione più ampio è stata registrata come boscalid, isopirazam, bixafen, penthiopyrad, solatenol. La resistenza agli SDHI è stata prima studiata con mutanti creati in laboratorio (Skinner *et al.*, 1998; Stammler *et al.*, 2011; Fraaije *et al.*, 2012; Scalliet *et al.*, 2012) mentre il primo caso di cali di sensibilità di popolazioni provenienti da campo risale al 2012. Oggi casi di ridotta sensibilità sono stati riportati in Irlanda, Regno Unito, nord della Germania. Diverse sostituzioni nella subunità B, C e D della Succinato Deidrogenasi sono state associate alla resistenza ai fungicidi. Nella subunità B sono state caratterizzate le sostituzioni N225I, R265P, T268I/A, nella subunità C le sostituzioni T79N/I, W80S, N86S/A, R151S/T/M, H152R, V166M, T168R, nella subunità D le sostituzioni I50F e M114V (<http://www.frac.info/docs/default-source/sdhi-wg/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2018-sdhi-meeting-11-12th-of-december-2018-with-recommendations-for-2019.pdf>).

La sostituzione SdhB-H267Y è stato dimostrato essere la causa di una ridotta sensibilità alla carboxina (Skinner *et al.*, 1998) mentre bassi livelli di resistenza agli SDHI sono stati trovati in ceppi portanti le sostituzioni: SdhC-T79N e SdhC-W80S (2012), SdhC-N86S (2013), SdhB-N225T (2014) e SdhB-T268I (2015) (Rehfus *et al.*, 2018). Mutanti portanti la sostituzione SdhC- H152R hanno dato alti fattori di resistenza a tutti gli SDHI saggiati (Stammler *et al.*, 2011), così come gli isolati da campo provenienti da Irlanda e Regno Unito che manifestavano la sostituzione (Dooley *et al.*, 2016). Isolati che mostravano una ridotta sensibilità a fluopyram e isofetamid, ma senza nessuna sostituzione amminoacidica, sono stati ritrovati in Francia e Regno Unito (Yamashita and Fraaije, 2018).

Z. tritici è un patogeno molto diffuso in Europa sul quale sono già stati condotti ampi monitoraggi. In Italia solo recentemente ha causato perdite di produzione di conseguenza studi riguardanti la sensibilità di popolazioni Italiane sono assenti. Per il controllo del patogeno le tre classi di fungicidi descritte in precedenza sono adottate da sole o in miscela. Nel Nord-Centro Europa le strobilurine non sono più raccomandate per il controllo della septoriosi a causa della presenza diffusa della G143A (Heick *et al.*, 2017), mentre in Italia i QoI hanno ancora un ruolo importante nella difesa dal patogeno.

La buona efficacia di un trattamento fungicida dipende oltre che dalla sensibilità del patogeno anche dall'adeguata epoca di intervento. Generalmente la fase fenologica BBCH39 (foglia a bandiera) è quella adeguata per l'applicazione fungicida (Anonymous 1986; Cook *et al.*, 1999, Blandino *et al.*, 2010; Alvisi *et al.*, 2014), ma un trattamento

precedente, eseguito in BBCH32 (levata), può incrementare il controllo del patogeno (Cook *et al.*, 1999).

In questo studio è stata per la prima volta determinata la sensibilità di isolati Italiani di *Z. tritici* a QoI, DMI, SDHI allo scopo di migliorare le strategie di difesa affinché possano tenere conto non solo del più adeguato momento del ciclo vegetativo nel quale effettuare l'intervento ma anche prevenire e gestire eventuali fenomeni di resistenza.

2) Materiali e metodi

2.1) Isolamento del fungo

I campioni sono stati raccolti in Emilia-Romagna durante il 2015 e 2016 da diverse cultivar di frumento tenero e duro provenienti da differenti tipi di campi: commerciali, sperimentali e uno campo non trattato situato in zona calanchifera non coltivata a frumento, da usare come riferimento (tabella 7). Durante il 2016 alcuni campioni provenienti da campi sperimentali sono stati raccolti prima e dopo il trattamento (in quest'ultimo caso sono stati denominati "bis"). Da ogni campione si è originata una popolazione. Le foglie sono state poste su carta filtro in condizioni di elevata umidità relativa per 24 ore quindi, tramite l'utilizzo di un ago, almeno 10 cirri appartenenti a foglie diverse, sono stati trasferiti su Potato Destrose Agar (PDA) contenente Solfato di streptomicina (Sigma Aldrich). Le piastre sono poi state incubate a 18°C per sei giorni con fotoperiodo 12/12

Da ogni popolazione, sono stati ottenuti isolati monoconidici attraverso diluizione dei conidi in acqua sterile fino a una concentrazione di 50.000 conidi /ml, trasferiti in piastre di PDA contenenti Solfato di streptomicina (Sigma Aldrich). Dopo sei giorni di incubazione a 18 °C, singole colonie sono state trasferite in nuove piastre.

Tab 7. Popolazioni di *Z. tritici* campionate durante il 2015-2016 e numero di isolati monoconidici ottenuti

Pop.	N° di isolati monoconidici	Tipo di campo	Provincia	Anno di isolamento	Tenero/ Duro
3	1	Sperimentale	RA	2015	Duro
5	3	Sperimentale	BO	2015	Duro
6	5	Sperimentale	BO	2015	Duro
7	2	Sperimentale	BO	2015	Duro
8	2	Sperimentale	BO	2015	Duro
9	2	Commerciale	BO	2015	Duro
10	3	Sperimentale	FE	2015	Duro
11	4	Commerciale	BO	2015	Duro
12	4	Commerciale	BO	2015	Tenero
13	4	Sperimentale	BO	2015	Duro
14	6	Sperimentale	BO	2015	Duro
16	4	Commerciale	BO	2015	Duro
18	6	Riferimento	BO	2015	Duro
20	3	Commerciale	BO	2015	Duro
21	4	Commerciale	BO	2015	Tenero
22	3	Commerciale	BO	2015	Tenero
25	5	Commerciale	BO	2015	Tenero
28	5	Commerciale	BO	2015	Duro
29	5	Commerciale	BO	2015	Duro
33	5	Sperimentale	BO	2016	Duro
33bis	5	Sperimentale	BO	2016	Duro
34bis	6	Sperimentale	FE	2016	Duro
35	4	Sperimentale	FE	2016	Duro
35bis	5	Sperimentale	FE	2016	Duro
36	4	Sperimentale	BO	2016	Duro
36bis	4	Sperimentale	BO	2016	Duro
37	4	Sperimentale	BO	2016	Duro
37bis	5	Sperimentale	BO	2016	Duro
38	5	Sperimentale	BO	2016	Duro

38bis	5	Sperimentale	BO	2016	Duro
39	4	Sperimentale	BO	2016	Duro
39 bis	5	Sperimentale	BO	2016	Duro
40bis	6	Sperimentale	FE	2016	Duro
41bis	6	Sperimentale	FE	2016	Duro
42bis	6	Sperimentale	FE	2016	Duro
43	4	Sperimentale	BO	2016	Duro
44	4	Sperimentale	BO	2016	Duro
47	3	Sperimentale	MO	2016	Duro
48	3	Sperimentale	MO	2016	Duro
49	4	Sperimentale	MO	2016	Duro
51	4	Sperimentale	BO	2016	Duro
Totale	177				

2.2) Test di sensibilità ai fungicidi

Gli isolati monoconidici sono stati testati per la sensibilità a QoI, DMI e SDHI attraverso microtiter test. I principi attivi tecnici usati (fornita da Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) e le relative concentrazioni saggate, sono elencati in tabella 8. Nelle piastre a pozzetto oltre ai fungicidi è stato aggiunto il substrato YE composto da 10g/l di yeast extract e 30g/l di D+ glucosio, addizionato con la sospensione conidica avente concentrazione di 10^7 spore/ml. Le piastre sono rimaste in incubazione a 18°C per 6 giorni e la crescita è stata valutata con lo spettrofotometro a 405nm

Tab 8. Lista dei principi attivi tecnici usati nei test di sensibilità di *Z. tritici* e concentrazioni saggiate

QoI	Concentrazioni (mg/l)
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
DMI	
Protioconazolo (PTC)	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
Tebuconazolo (TBC)	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
Ciproconazolo (CPC)	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
Metconazolo (MTC)	0-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10-40
Difenoconazolo (DFC)	0-0,0024-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10
Epossiconazolo (EPC)	0-0,0024-0,0098-0,039-0,156-0,625-2,5-10
SDHI	
Fluopyram	0-0,00001-0,0001-0,001-0,01-0,1-1-10
Isopirazam	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

Essendo il microtiter test dispendioso in termini di tempo, non tutti gli isolati monoconidici sono stati saggiati con i prodotti sopra elencati. Gli isolati saggiati sono sempre stati scelti in maniera rappresentativa, in modo da avere almeno un isolato monoconidico per popolazione e sono stati 78 per la sensibilità ad azoxystrobin, 54 per il pyraclostrobin, 120 per i DMI e 121 per gli SDHI.

2.3) Analisi statistica dei dati ottenuti da test con microtiter

Tutti i dati ottenuti da analisi spettrofotometrica sono stati elaborati utilizzando il modello probit, allo scopo di ottenere la Dose Efficace 50 (DE₅₀). Con i valori di DE₅₀ relativi ad azoxystrobin e pyraclostrobin appartenenti ai diversi tipi di campi (sperimentale, commerciale, campo di riferimento) sono stati costruiti dei Box-plot con il programma Exel 2013. Le differenze fra le DE₅₀ appartenenti ai diversi tipi di campo sono state calcolate usando prima l'Anova e poi il test post-hoc di Duncan per p= 0,05 con il programma Statgraphics versione 2.1.

2.4) Individuazione delle mutazioni

Il DNA di 95 isolati monoconidici scelti in modo rappresentativo da ogni popolazione è stato estratto utilizzando un protocollo C-TAB (Prodi *et al.*, 2011). La reazione di PCR è stata costituita in un volume totale di 40 µl composti da: 26,66 µl di acqua, 4 µl di buffer 10x, 3,2 µl di dNTP, 0,8 µl per ogni primer (entrambi 10 µM) e 0,2 µl di Ex Taq DNA polimerase. L'individuazione delle mutazioni è avvenuta amplificando le parti delle sequenze interessate dalle mutazioni che conferiscono resistenza ai fungicidi, appartenenti ai geni *cytb* (QoI), *cyp51* (DMI) e *SdhB-C-D* (SDHI), utilizzando i seguenti set di primers e protocolli termici:

QoI

Mg_cytb F 5'-TCG TTA CTG GTG TTA CAC TTG C-3'

Mg_cytb R 5'-GCC ATA ACA TAA TTC TCG CTG TCA CC-3'

Protocollo termico: Riscaldamento iniziale 96 °C per 2 min, 35 cicli di 1min per la denaturazione a 96 °C, 45 s di *annealing* a 54,2 °C, 1 min di estensione a 72° e 72 °C per 5 min.

DMI

ST_Cyp51 upstr_F2 5'- TCG AAC GAT AAT TTG GTC TGG-3'

ST_Cyp51_8R 5'- GGA CAA TGT GTG TTG CGT GTT-3'

Protocollo termico: Riscaldamento iniziale 95 °C per 5 min, 35 cicli di 1min per la denaturazione a 95 °C, 30 s di *annealing* a 55 °C, 3 min di estensione a 72° e 72 °C per 7 min.

SDHI

SdhB

sdhB_St_fw2 5'- CTG GCG GCA TCA TAG ACT TG -3'

sdhB_St_rv2 5'- AAC TGC TCC CTC TTG ACT GG -3'

Protocollo termico: Riscaldamento iniziale 95 °C per 3 min, 30 cicli di 25 sec per la denaturazione a 95 °C, 30 s *annealing* a 60 °C, 1.5 min di estensione a 72° e 72 °C for 7 min.

SdhC

SdhC_St_fw2 5'- ATC CTG TCC TGT GAT CCT GG -3'

SdhC_St_rv2 5'-CGG CGA TTC ATC TTC TCA TGT CG -3'

Protocollo termico: Riscaldamento iniziale 95 °C per 3 min, 30 cicli di 25 sec a 95 °C per la denaturazione, 30 s di *annealing* a 58.5 °C, 1 min di estensione a 72° e 72 °C per 7 min.

SdhD

SdhD_St_fw1 5'- GCA ATA GAA GGC AGC CTG AG -3'

SdhD_St_rv3 5'-GTC TTG AAT CTC TGT CTT GC -3'

Protocollo termico: Riscaldamento iniziale 95 °C per 3 min, 30 cicli di 25 sec a 95 °C per la denaturazione, 30 s *annealing* a 61 °C, 1 min di estensione a 72° e 72 °C for 7 min.

In seguito i frammenti amplificati sono stati sequenziati con metodo Sanger utilizzando per i geni e *SdhB-C-D*, gli stessi primers sopra citati, mentre per i geni *Cyt b* e *Cyp51* i seguenti primers:

Mg_cytb_fw6 5' -CAA CCG CAT TCT TAG GGT ATG -3'

Mg_cytb_fw7 5' -CAC CTG CTA TAG TGC CTG AAT G -3'

St_Cyp51_5fw 5'-GGT ACC ATG GGT CTC CTC CAG GAA G -3'

St_Cyp51_13r 5'- GGA CAG GAT GTC GTC TGG AT -3'

St_Cyp51_3r 5'- CGG CTG AAC AAA CTG CTG TA -3'

L'allineamento dei frammenti amplificati è avvenuto utilizzando il programma Sequencer 5.4.6. Per ogni classe di fungicidi vengono mostrati i risultati dei cromatogrammi di buona qualità che hanno permesso l'allineamento dei frammenti, che sono 86 per i QoI, 57 per i DMI, 88 per la *SdhB*, 71 per la *SdhC* e 95 per la *SdhD*.

2.5) Individuazione della frequenza allelica della sostituzione G143A

Le popolazioni del 2015, sono state analizzate con la droplet digital PCR (ddPCR) per la determinazione della frequenza dell'allele resistente (A143). Nelle righe sottostanti si riporta sinteticamente il protocollo utilizzato scaturito dalla messa a punto del saggio condotto precedentemente e riferito nel capitolo 2. A questo scopo un saggio validato in

silico ddPCR Mutation Detection assay è stato disegnato inserendo nel sito della Bio-rad <https://www.bio-rad.com/digital-assays/#/assays-create/mutation> il seguente MIQE context:

CTGATGATGGCAACCGCATTCTTAGGGTATGTATTACCTTATGGTCAAATGT
CTTTATGAG[G/C]AGCAACAGTTATAACTAACTTATTGAGTGCAATACCTTG
AGTTGGACAAGACATAGTTGAA preso dal genoma mitocondriale completo di *Z. tritici* IPO323 (EU090238) disponibile su NCBI.

Una mix di 20 µl è stata preparata utilizzando acqua ultra pura. Per tutte le reazioni la concentrazione finale dei componenti è stata: 1X Bio-Rad dd PCRTM supermix per probes (no dUTP, concentrata 2X), 1X dd Assay primers-probe mix (20X concentrato ready-to-use), 900 nM primers/250 nM per ogni sonda. Le gocce sono state generate dal QX 200 Droplets Generator (Bio-Rad) in cartridge da 8. La PCR è stata corsa nel termociclatore Bio-Rad T100 con il seguente protocollo termico: 95°C per 10 min seguiti da 39 cicli a 94°C per 30 sec con una *ramp speed* di 2°C/sec, 54°C per 1 min e 98°C per 10 min. Alle reazioni di PCR è stato aggiunto 0,1 ng di DNA. Dopo la corsa il prodotto di PCR è stato trasferito nel lettore QX200 ddPCR. I dati sono stati analizzati da Quanta Soft 1.7.4.0917 e Quanta Soft Analysis Pro Software 1.0. La *threshold* è stata settata manualmente in modo da permettere una buona identificazione delle gocce positive e negative.

3) Risultati

3.1) Sensibilità degli isolati monoconidici ai QoI

Cinquantacinque isolati monoconidici del 2015 sono stati testati per la sensibilità ad azoxystrobin e hanno mostrato valori di DE₅₀ compresi tra 0,01 e 4,7 mg/l (Tabella 9). Almeno un isolato monoconidico per popolazione, per un totale di 31 isolati, è stato testato per la sensibilità a pyraclostrobin con valori di DE₅₀ aventi un range da 0,01 a 0,54 mg/l (Tabella 9). Per la collezione campionata nel 2016 gli isolati raccolti prima e dopo il trattamento sono stati considerati come un'unica popolazione senza attuare distinzioni. Almeno un isolato monoconidico per popolazione per un totale di 23 isolati, è stato testato con entrambi i prodotti, mostrando valori di DE₅₀ compresi tra 0,01 e 9,66 mg/l per azoxystrobin e tra 0,01 e 0,92 mg/l per pyraclostrobin (Tabella 10). I fattori di resistenza (FR) di tutti gli isolati calcolati come rapporto tra DE₅₀ isolato resistente/ DE₅₀ isolato sensibile di riferimento, sono variati tra 1 e 966 (Tabella 9 e 10).

Tab 9. Dose efficace 50 (DE50) e fattore di resistenza (FR) degli isolati monoconidici di *Z. tritici* isolati nel 2015 nei confronti di azoxystrobin e pyraclostrobin

Popolazione	Axoxystrobin			Pyraclostrobin		
	DE ₅₀ media	FR	N. di isolati monoconidici testati	DE ₅₀ media	FR	N. di isolati monoconidici testati
3	4,7	470	1	0,22	22	1
5	1,31	131	3	0,25	25	2
6	0,14	14	3	0,32	32	2
7	0,42	42	2	0,04	4	1
8	0,11	11	2	0,07	7	1
9	0,1	10	2	0,01	1	1
10	0,01	1	3	0,01	1	1
11	1,46	146	3	0,1	10	3
12	0,89	89	2	0,17	17	2
13	3,09	309	4	0,23	23	4
14	3,11	311	1	0,54	54	1
16	0,87	87	3	0,2	20	3
18 *	0,01	-	6	0,01	-	1
20	1,92	192	1	0,12	12	1
21	0,15	15	2	0,17	17	2
22	0,24	24	2	0,09	9	1
25	0,02	2	5	0,01	1	1
28	0,06	6	5	0,01	1	1
29	1,37	137	5	0,21	21	2
Totale			55			31

* Popolazione sensibile di riferimento

Tab 10. Dose efficace 50 (DE50) e fattore di resistenza (FR) degli isolati monoconidici di *Z. tritici* isolati nel 2016 nei confronti di azoxystrobin e pyraclostrobin

Popolazione	Azoxystrobin		Pyraclostrobin		N. di isolati monoconidici testati
	DE ₅₀ media	FR	DE ₅₀ media	FR	
33	0,88	88	0,69	69	2
34	0,2	20	0,33	33	1
35	0,43	43	0,17	17	2
36	1,87	187	0,31	31	2
37	0,22	22	0,21	21	2
38	3,41	341	0,76	76	2
39	1,84	184	0,34	34	2
40	1,93	193	0,17	17	1
41	0,71	71	0,22	22	1
42	1,2	120	0,91	91	1
43	4,12	412	0,68	68	1
44	7,2	72	0,92	92	1
47	9,66	966	0,64	64	1
48	0,35	35	0,19	19	1
49	2,55	255	1,32	132	2
51	1,61	161	0,53	53	1
Totale					23

Osservando i valori di DE₅₀ del 2015 e 2016 e suddividendoli in base al tipo di campo di provenienza, si evince come gli isolati monoconidici provenienti da campi sperimentali abbiano fornito la mediana più alta (Figura 6 a-b). Nel caso di azoxystrobin i valori di DE₅₀ con la mediana più alta sono stati quelli degli isolati monoconidici provenienti da campi sperimentali trattati seguiti da: commerciali trattati, sperimentali non trattati, commerciali non trattati e campo di riferimento. Differenze statisticamente rilevanti sono emerse fra il campo di riferimento e i campi sperimentali trattati e non trattati. Per il pyraclostrobin, i valori di DE₅₀ con la mediana più alta sono stati quelli degli isolati monoconidici provenienti da campi sperimentali non trattati seguiti da: sperimentali trattati, commerciali trattati e commerciali non trattati. Per il campo di riferimento non è stato possibile costruire il box plot in quanto è stato saggiato un solo isolato monoconidico. Per questo prodotto non sono emerse differenze statisticamente rilevanti fra i campi analizzati.

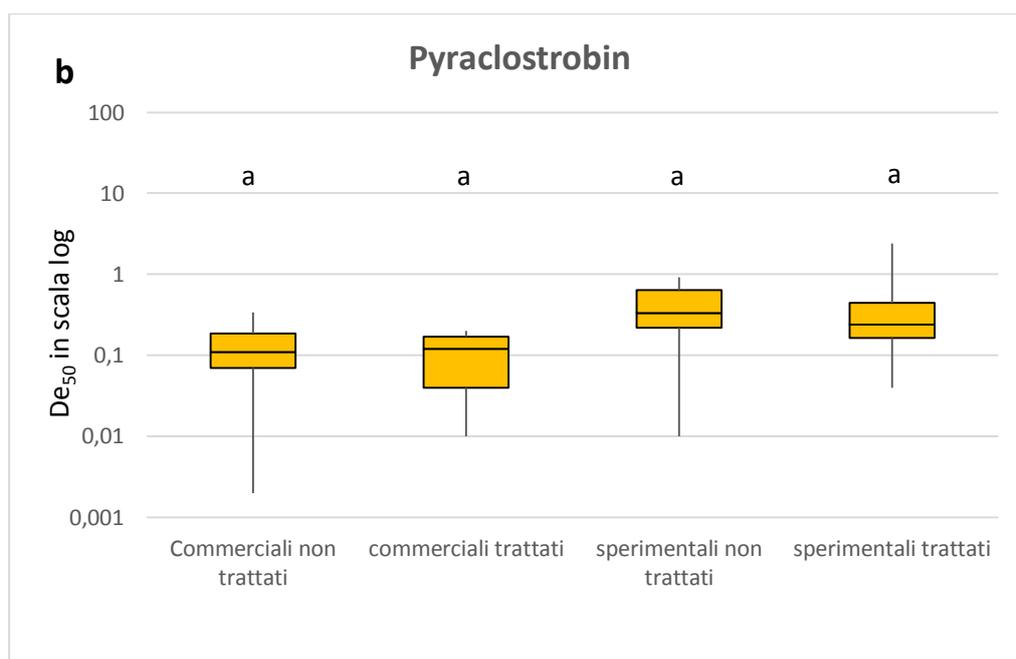
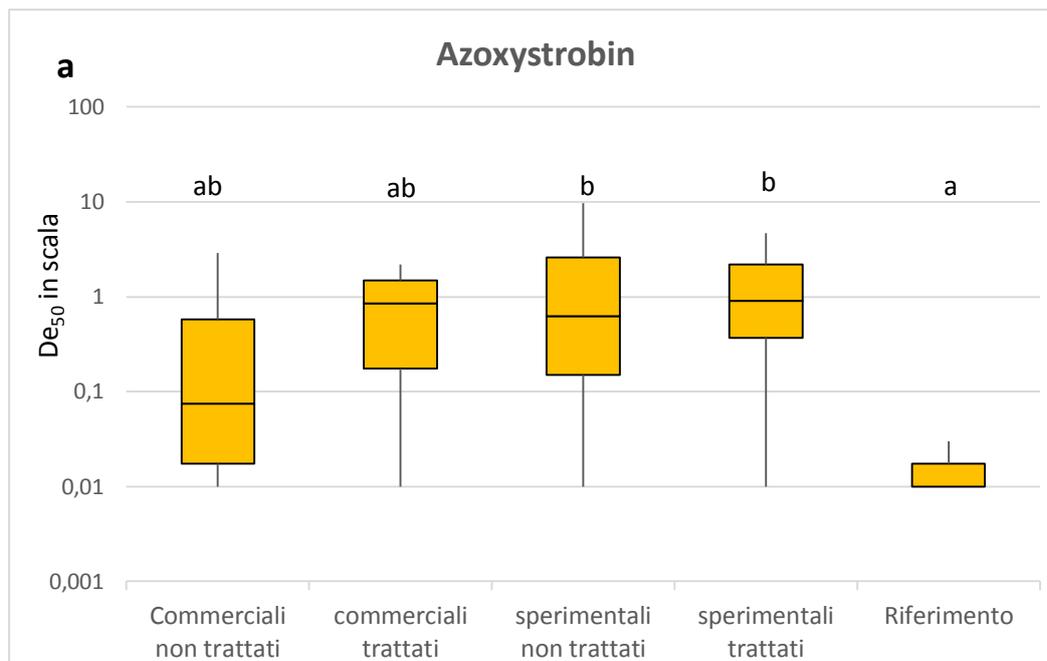


Fig 6 a-b. Sensibilità degli isolati monoconidici di *Z. tritici* isolati nel 2015-2016 nei confronti di azoxystrobin (a) e pyraclostrobin (b). La linea orizzontale all'interno del box plot indica la mediana, l'estremo inferiore il 1° quartile, quello superiore il 3° quartile mentre gli estremi dei *baffi* indicano il valore minimo e massimo. Box plot caratterizzati dalla stessa lettera non sono statisticamente differenti per $p=0,05$ (post-hoc test di Duncan).

Il sequenziamento Sanger per l'individuazione della mutazione G143A è stato effettuato su almeno un isolato monoconidico per popolazione. Sono stati saggiati 86 isolati monoconidici, 61 provenienti da campi sperimentali, 22 da campi commerciali, 3 dal

campo di riferimento. I risultati hanno mostrato la presenza della sostituzione nei campi sperimentali e commerciali rispettivamente nel 95,1 e 72,8 % degli isolati analizzati, mentre gli isolati dal campo abbandonato non hanno manifestato la sostituzione (Tabella 11).

Tab 11. Presenza della mutazione G143A in isolati monoconidici di *Z. tritici* e campo di provenienza.

Popolazione	Aa 143 in <i>cyt. b</i>	N° di isolati monoconidici	Tipo di campo
3	A	1	Sperimentale
5	A	3	Sperimentale
6	A	3	Sperimentale
7	A	2	Sperimentale
8	A	2	Sperimentale
9	G	2	Commerciale
10	G	3	Sperimentale
11	A	2	Commerciale
12	A	1	Commerciale
13	A	1	Sperimentale
14	A	1	Sperimentale
16	A	3	Commerciale
18	G	3	Riferimento
20	A	1	Commerciale
21	A	2	Commerciale
22	A	2	Commerciale
25	G	2	Commerciale
28	G	2	Commerciale
29	A	5	Commerciale
33	A	5	Sperimentale
34	A	1	Sperimentale
35	A	4	Sperimentale
36	A	3	Sperimentale
37	A	4	Sperimentale
38	A	4	Sperimentale
39	A	5	Sperimentale
40	A	2	Sperimentale
41	A	2	Sperimentale
42	A	1	Sperimentale
43	A	3	Sperimentale
44	A	3	Sperimentale
47	A	2	Sperimentale
48	A	2	Sperimentale
49	A	2	Sperimentale
51	A	2	Sperimentale
Totale		86	

La frequenza dell'allele R (A143) è stata calcolata per 17 popolazioni isolate nel 2015 con un protocollo messo a punto in ddPCR. Quando l'isolato monoconidico analizzato con sequenziamento Sanger ha manifestato la presenza della sostituzione, la frequenza della mutazione nella popolazione corrispondente è stata del 100%, fatta eccezione per la popolazione 16 con una percentuale del 99,97%. La popolazione di riferimento ha mostrato una frequenza dell'allele sensibile (G143) del 100%. Due popolazioni in cui gli isolati monoconidici mostravano l'allele sensibile hanno manifestato una percentuale dell'allele R dello 0,38% e 0,03% (Tabella 12).

Tab 12. Frequenza dell'allele R nelle popolazioni di *Z. tritici* analizzate con ddPCR

Popolazione	Campo	Aa 143 in <i>cyt.b</i>	Frequenza dell'allele R (%)
3	Sperimentale	A	100
5	Sperimentale	A	100
6	Sperimentale	A	100
7	Sperimentale	A	100
8	Sperimentale	A	100
9	Commerciale	G	0,38
10	Sperimentale	G	0,03
11	Commerciale	A	100
12	Commerciale	A	100
13	Sperimentale	A	100
14	Sperimentale	A	100
16	Commerciale	A	99,97
18	Riferimento	G	0
21	Commerciale	A	100
22	Commerciale	A	100
25	Commerciale	G	0
28	Commerciale	G	0

3.2) Sensibilità degli isolati monoconidici ai DMI

La sensibilità degli isolati monoconidici analizzati con microtiter test ed espressa come valore di DE₅₀, è riportata in tabella 13 e rappresentata nella figura 7.

Tab 13. Sensibilità (DE₅₀) degli isolati monoconidici di *Z. tritici* isolati durante il 2015-2016 a 6 DMI (PTC = protioconazolo, TBC= tebuconazolo, CPC= ciproconazolo, MTC= metconazolo, DFC= difenoconazolo, EPC= epossiconazolo).

Pop.	N° isolati monoconidici testati	Valore medio di DE ₅₀ (mg/l)					
		PTC	TBC	CPC	MTC	DFC	EPC
3	1	0,870	0,980	4,410	0,420	0,150	0,044
5	3	0,560	2,150	2,793	0,340	0,340	0,190
6	5	0,224	4,504	1,792	0,226	0,646	0,28
7	1	0,67	0,200	0,655	0,226	0,070	0,780
8	2	0,36	0,77	9,510	0,077	0,113	0,48
9	1	0,130	3,170	7,355	0,158	0,058	0,050
10	2	0,080	0,785	2,340	0,009	0,008	0,009
11	4	0,388	2,573	2,322	0,435	0,128	0,393
12	4	0,328	1,165	8,575	0,126	0,082	0,187
13	2	1,043	0,401	0,895	0,142	0,042	0,100
14	6	4,020	0,017	4,920	0,469	0,018	1,222
16	4	7,671	2,953	3,703	0,435	0,061	0,416
18*	5	0,192	0,015	0,114	0,009	0,003	0,020
20	3	10,142	7,945	3,606	0,495	0,272	0,481
21	4	17,112	4,313	0,933	0,177	0,101	0,371
22	3	15,373	7,362	2,465	0,608	0,185	0,684
28	3	0,277	0,036	0,063	0,039	0,003	0,006
29	2	3,877	3,799	3,945	0,290	0,048	0,179
33	1	43,007	4,977	7,388	0,224	0,094	0,164
33bis	2	25,562	13,991	7,181	0,360	0,122	0,694
35	4	2,088	0,267	0,498	0,141	0,049	0,092
35bis	3	8,850	4,323	1,324	0,350	0,209	0,771
36	3	8,159	4,648	0,380	0,145	0,055	0,135
36bis	3	4,643	1,658	0,416	0,094	0,043	0,091
37	3	10,131	3,147	0,459	0,334	0,323	0,342
37bis	3	11,434	10,709	2,219	0,363	0,171	0,488
38	2	28,249	10,360	2,362	0,406	0,142	0,629
38bis	4	18,619	10,208	4,186	0,608	0,301	0,552

39	1	110,04	12,27	7,837	0,310	0,120	0,740
39bis	5	46,276	8,149	3,374	0,407	0,122	0,609
40bis	4	2,246	2,691	2,296	0,172	0,151	0,340
41bis	5	2,655	3,848	0,902	0,212	0,222	0,221
42bis	6	4,834	8,439	3,080	0,454	0,184	0,489
43	3	6,985	14,634	6,422	0,562	0,078	0,734
44	2	2,896	7,327	6,036	0,457	0,065	0,492
47	2	0,517	3,671	2,720	0,187	0,036	0,272
48	2	5,459	18,833	6,510	0,570	0,075	1,442
49	3	130,23	4,704	5,047	0,206	0,101	0,653
51	4	22,85	13,250	5,096	0,452	0,207	0,496
Totale	120						

* Popolazione sensibile di riferimento

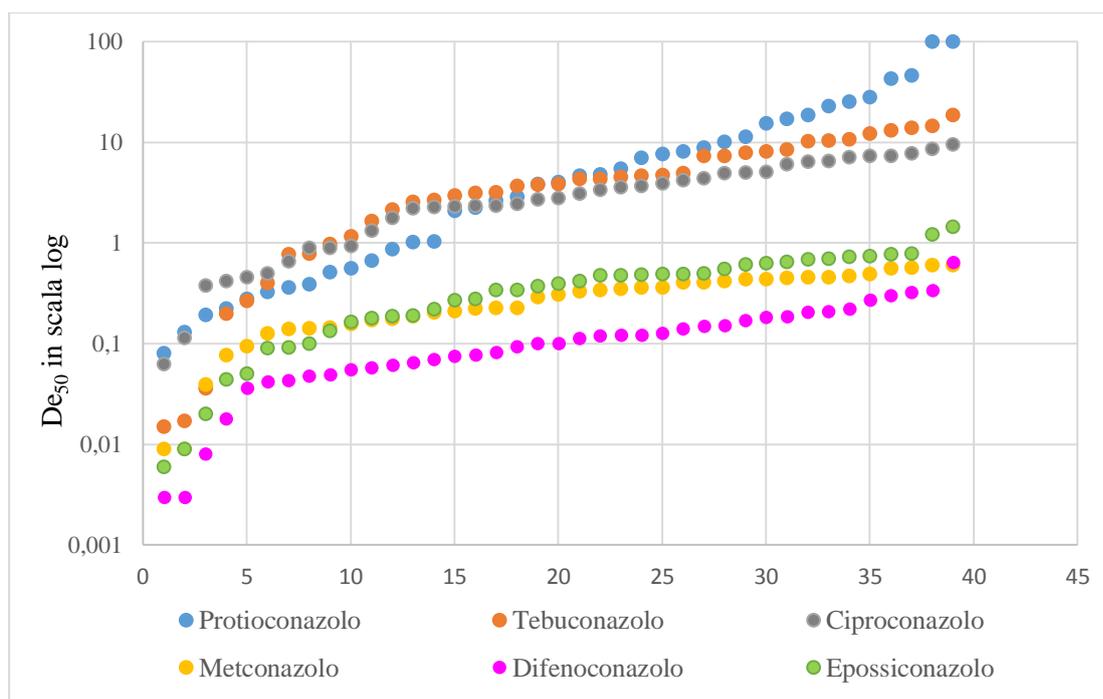


Fig 7. Sensibilità (in termini di DE₅₀) degli isolati monoconidici di *Z. tritici* isolati durante il 2015-2016 ai DMI.

I range di DE₅₀ dei 120 isolati monoconidici saggiati per ciascun principio attivo sono stati:

- 0,08 -130,23 mg/l per protioconazolo
- 0,015 – 18,833 mg/l per tebuconazolo

- 0,063 – 9,510 mg/l per cyproconazolo
- 0,009-0,608 mg/l per metconazolo
- 0,003-0,646 mg/l per difenoconazolo
- 0,006-1,442 mg/l per epossiconazolo

Il sequenziamento Sanger di 57 isolati monoconidici ha poi permesso di evidenziare la presenza delle seguenti sostituzioni amminoacidiche: L50S, S188N, A311G, A379G, I381V, Y459D o S, Y461A o S, ΔG460 e ΔY461, N513K. Sulla base delle sostituzioni ritrovate, gli isolati sono stati quindi suddivisi in 24 aplotipi rappresentati con colori differenti (tabella 14).

Tab 14. Suddivisione in aplotipi degli isolati monoconidici di *Z. tritici* sottoposti a sequenziamento del CYP51. Il numero di isolati monoconidici osservati per ogni popolazione (Pop) è indicato tra parentesi.

		Sostituzioni aminoacidiche										
Pop	Aplotipo	L50S	S188N	A311G	A379G	I381V	Y459D	Y459S	Y461A	Y461S	Δ G460 e Δ Y 461	N513K
5 (2)	1	x	x			x		x				
5 (1)	2	x				x		x				
8 (2)		x				x		x				
21 (2)		x				x		x				
21 (1)	3					x		x				
25 (1)						x		x				
6 (3)	4	x	x		x	x					x	
16 (1)	5	x	x		x	x					x	x
20 (3)		x	x		x	x					x	x
35bis (1)		x	x		x	x					x	x
41bis (1)		x	x		x	x					x	x
42bis (1)		x	x		x	x					x	x
43 (2)		x	x		x	x					x	x
47 (1)		x	x		x	x					x	x
48 (1)		x	x		x	x					x	x
39bis (2)	6	x	x		x	x					x	
33bis (1)	7		x		x	x					x	x
35 (2)	8	x	x	x							x	x
7 (1)	9	x				x			x			
29 (1)		x				x			x			
39(1)		x				x			x			
44(3)		x				x			x			
14 (1)	10					x			x			
38 (1)	11	x				x			x			x
13 (1)	12					x	x					
36 (2)	13	x					x					
9 (1)	14	x								x		
29 (2)	15	x				x						
34bis (2)		x				x						
48 (1)		x					x					
33 (1)	16		x			x						
36bis(1)	17	x							x			
38 (1)	18	x							x			x
38bis (2)	19	x	x		x	x			x		x	
40bis (2)	20	x	x			x					x	x
49 (2)	21		x			x					x	
51 (1)	22	x				x					x	
47 (1)	23	x	x								x	x
28 (1)	24											

Per gli isolati raccolti da campi sperimentali prima e dopo il trattamento si può vedere come la sostituzione A379G appaia sempre dopo l'applicazione del fungicida effettuata con prodotti a base di p.a. diversi, fatta eccezione per la popolazione 36bis. Anche in una parcella non trattata questa sostituzione è emersa nel secondo campionamento (Tabella 15).

Tab 15. Genotipizzazione degli isolati monoconidici di *Z. tritici* prima e dopo il trattamento. Il numero di isolati analizzati per ogni popolazione (Pop) è indicato tra parentesi.

Pop.	Sostituzioni aminoacidiche											Applicazioni
	311 A/G	379 A/G	381 I/V	459 Y/D	459 Y/S	461 Y/A	461 Y/S	Δ G460 e Δ Y461	50 L/S	188 S/N	513 N/K	
33 (1)	A	A	V	Y	Y	Y	Y			N	N	Non trattato
33bis (1)	A	G	V	Y	Y	Y	Y	x		N	K	
35 (2)	G	A	I	Y	Y	Y	Y	x	X	N	K	Fluxapyroxad + pyraclostrobin
35bis (2)	A	G	V	Y	Y	Y	Y	x	X	N	K	
36 (2)	A	A	I	D	Y	Y	Y		X	S	N	Bixafen+ tebuconazole
36bis (1)	A	A	I	Y	Y	A	Y		X	S	N	
38 (1)	A	A	V	Y	Y	A	Y		X	S	K	Pyraclostrobin
38 (1)	A	A	I	Y	Y	A	Y		X	S	K	
38bis (2)	A	G	V	Y	Y	A	Y	x	X	N	N	
39 (1)	A	A	V	Y	Y	A	Y		X	S	N	Tebuconazole
39bis (2)	A	G	V	Y	Y	Y	Y	x	X	N	N	

3.3) Sensibilità degli isolati monoconidici agli SDHI

La sensibilità degli isolati monoconidici scaturita dai test con microtiter espressa come valore DE₅₀ è riportata in tabella 16 e rappresentata in figura 8.

Tab 16. Sensibilità degli isolati monoconidici di *Z. tritici* isolati durante il 2015-2016 nei confronti degli SDHI.

Popolazione	N° isolati monoconidici testati	Valore medio di DE ₅₀ (mg/l)			
		Fluopyram	Isopyrazam	Solatenol	Bixafen
3	1	1,587	0,128	0,123	0,087
5	3	0,516	0,401	0,111	0,072
6	5	0,255	0,096	0,109	0,121
7	2	0,193	0,022	0,049	0,044
8	2	0,755	0,399	0,087	0,558
9	1	0,601	0,207	0,175	0,027
10	2	0,225	0,044	0,025	0,042
11	4	3,081	0,239	0,144	0,115
12	4	1,754	0,124	0,273	0,249
13	2	2,578	0,069	0,057	0,087
14	6	1,483	0,279	0,234	0,607
16	3	0,224	0,035	0,059	0,074
18*	5	1,282	0,039	0,049	0,026
20	3	0,405	0,037	0,101	0,077
21	4	5,078	0,082	0,092	0,098
22	3	1,582	0,043	0,029	0,051
28	3	0,227	0,039	0,092	0,024
29	3	1,923	0,059	0,175	0,099
33	1	1,724	0,210	0,130	0,102
33 bis	2	1,607	0,185	0,301	0,103
35	4	0,452	0,015	0,006	0,017
35 bis	3	0,825	0,052	0,028	0,069
36	3	0,423	0,149	0,185	0,198
36 bis	3	0,632	0,061	0,025	0,048
37	3	3,775	0,62	0,435	0,555
37 bis	3	2,157	0,324	0,206	0,246
38	2	0,712	0,452	0,094	0,055
38 bis	4	1,325	0,037	0,094	0,049

39	1	1,526	0,107	0,032	0,114
39 bis	5	0,504	0,276	0,084	0,197
40 bis	4	0,625	0,029	0,073	0,109
41 bis	5	0,28	0,095	0,147	0,085
42 bis	6	1,157	0,063	0,151	0,088
43	3	1,111	0,041	0,485	0,459
44	2	0,137	0,119	0,873	0,387
47	2	0,597	0,046	0,847	1,045
48	2	1,358	0,061	1,273	2,244
49	3	0,968	0,016	1,373	0,701
51	4	0,127	0,087	1,103	3,98
Totale	121				

* Popolazione sensibile di riferimento

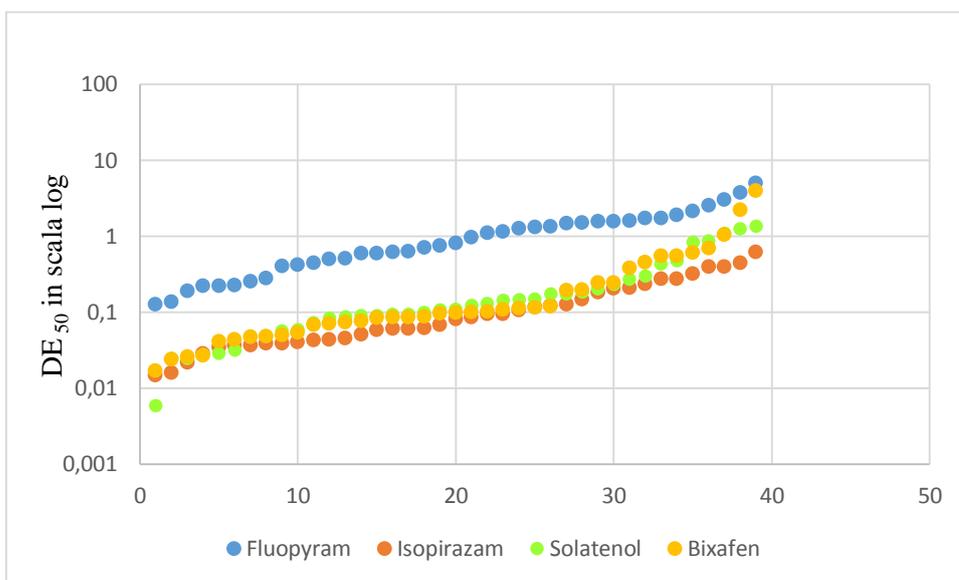


Fig 8. Sensibilità agli SDHI (in termini di DE₅₀) degli isolati monoconidici di *Z. tritici* isolati durante il 2015-2016.

Sono stati testati 121 isolati monoconidici. I *range* di DE₅₀ per ogni principio attivo sono stati:

- 0,127 - 5,078 mg/l per fluopyram
- 0,015 - 0,620 mg/l per isopyrazam
- 0,006 - 1,373 mg/l per solatenol
- 0,017 - 3,98 mg/l per bixafen

Sono stati sequenziati 88 isolati monoconidici per la subunità SdhB, 71 isolati per la subunità SdhC e 95 isolati per la subunità SdhD.

Il sequenziamento Sanger ha permesso di evidenziare la presenza delle seguenti sostituzioni amminoacidiche nella subunità SdhC: I29V, N33T, N34T, R40C, I161V (Tabella 17). Le sostituzioni più diffuse sono state la SdhC-N33T e SdhC-N34T che sono state sempre ritrovate insieme su 49 isolati monoconidici mentre le altre sostituzioni hanno mostrato solo una presenza sporadica.

Tab 17. Isolati monoconidici delle popolazioni fungine con sostituzioni nella subunità SdhC. Il numero di isolati monoconidici analizzati per ogni popolazione è indicato tra parentesi.

Popolazioni	Sostituzioni aminoacidiche			
	I29V	N33T-N34T	R40C	I161V
7(2)		X		X
8(2)	X			
10(3)		X	X	
11(2)		X		
20(3)		X		
22(3)		X		
25(3)	X			
28(2)	X			
29(3)		X		
33(2)		X		
33bis(2)		X	X	
35(2)		X		
36(2)		X		
36bis(1)		X		
37(2)		X		
37bis(2)		X		
38(2)		X		
38bis(2)		X		
39(3)		X		
39bis(1)		X		
40bis(2)		X		
43(3)		X		X
44(3)		X		
47(1)		X		
49(2)		X		
51(1)		X		

4) Discussione

In Europa la septoriosi è una delle malattie più comuni del frumento e all'interno del mercato europeo dei fungicidi utilizzati sulla coltura, che vale 1,3 milioni di euro, 0,9 milioni vengono impiegati per la difesa nei confronti di *Z. tritici* (Torriani *et al.*, 2015). Le famiglie di fungicidi impiegate sono i QoI, DMI e SDHI con un numero di applicazioni dipendente dalle condizioni metereologiche ma generalmente pari a 3 o 4 per stagione (Creissen *et al.*, 2018).

In Europa le strobilurine sono diventate inefficaci a causa dello sviluppo di fenomeni di resistenza (Fraaije *et al.*, 2005), quindi non vengono raccomandate per il controllo del patogeno (Heick *et al.*, 2017) mentre DMI e SDHI sono largamente impiegati. I DMI sono caratterizzati dalla presenza di numerose sostituzioni (Cools and Fraaije, 2013) che combinandosi fra loro danno origine a un elevato numero di aplotipi (Leroux *et al.*, 2007; Stammler *et al.*, 2008; Huf *et al.*, 2018). Alcune di queste sostituzioni causano anche una ridotta sensibilità verso alcuni prodotti, le più comuni sono la I381V e la A379G che causano rispettivamente una ridotta sensibilità al tebuconazolo e prothioconazolo (Cools *et al.*, 2011). L'effetto additivo delle sostituzioni ha portato all'adattamento delle popolazioni europee ai DMI dove è rara la presenza di ceppi altamente sensibili (Stammler and Semar, 2011). Diversa è la situazione degli SDHI, le prime segnalazioni di cali di efficacia risalgono al 2012 e nonostante siano emerse mutazioni nelle subunità B-C-D della Sdh c'è ancora una situazione di totale sensibilità (Fraaije *et al.*, 2012).

In Italia il controllo del patogeno avviene attraverso due trattamenti: il primo fatto alla fase fenologica BBCH 39 (foglia a bandiera) è specifico per la septoriosi, il secondo fatto alla fase fenologica BBCH 61 (fioritura) è principalmente rivolto a contrastare la fusariosi. I prodotti impiegati corrispondono alle tre classi precedentemente descritte, somministrate in miscela (Blandino *et al.*, 2010, Alvisi *et al.*, 2014) infatti in Italia le strobilurine vengono ancora inserite nelle strategie di difesa.

I risultati di sensibilità alle strobilurine hanno mostrato valori di DE₅₀ compresi tra 0,01 e 9,6 mg/l per azoxystrobin e tra 0,01 e 0,92 mg/l per pyraclostrobin, con fattori di resistenza che variano complessivamente da 1 a 966 ma in molti casi sono maggiori di 100. Questi dati potrebbero rappresentare, in un paese come l'Italia caratterizzato da un basso numero di trattamenti con fungicidi e da una scarsa pressione della malattia, l'emergere della resistenza, ma nei paesi europei in cui il fenomeno è diffuso, i valori di

DE₅₀ e i fattori di resistenza sono più alti rispetto a quelli di questo studio (Gisi *et al.*, 2005; Fraaije *et al.*, 2005; Siah *et al.*, 2010 e 2014; Stewart *et al.*, 2014).

Suddividendo gli isolati sulla base del campo di provenienza, per azoxystrobin gli isolati provenienti dal campo di riferimento (non trattato e localizzato in zona non coltivata a frumento) si sono differenziati statisticamente da quelli provenienti da campi sperimentali sia trattati che non trattati. Per pyraclostrobin nessuna delle quattro categorie esaminate si è differenziata a livello statistico (Figura 6 a-b).

Il 95,1% degli isolati monoconidici provenienti da campi sperimentali ha manifestato la presenza della sostituzione G143A, mentre quelli isolati da campi commerciali hanno mostrato una minore presenza (72,8%) della sostituzione. Quando gli isolati monoconidici esibivano la sostituzione, la corrispondente popolazione ha mostrato una frequenza dell'allele resistente (A143) maggiore del 99%. Quando gli isolati monoconidici non presentavano la sostituzione, le popolazioni corrispondenti avevano una frequenza dell'allele R dello 0% fatta eccezione per le popolazioni 9 e 10 che avevano una frequenza rispettivamente dello 0,38% e 0,03%. Nel campo di riferimento c'è stata una totale presenza dell'allele sensibile (Tabella 12).

Complessivamente è stato evidenziato come i trattamenti attuino una selezione sulle popolazioni di *Z. tritici*, infatti le mediane dei valori di DE₅₀ degli isolati provenienti da campi trattati di tutte le tipologie (sperimentale, commerciale) sono, nel caso dell'azoxystrobin più alte rispetto a quelle degli isolati provenienti dagli stessi non trattati e il campo di riferimento si differenzia da quelli commerciali e sperimentali anche a livello statistico. La selezione si evidenzia anche nei confronti della G143A infatti i campi sperimentali, che sono caratterizzati da un elevato numero di trattamenti, presentano una elevata presenza (95,1% dei casi) e frequenza della sostituzione sia negli isolati monoconidici che nelle popolazioni, mentre nei campi commerciali dove il numero dei trattamenti è inferiore, la presenza di isolati monoconidici portanti la sostituzione è pari al 72,8% e la frequenza della sostituzione nelle popolazioni rimane alta.

L'elevata presenza e frequenza della sostituzione G143A negli isolati del fungo analizzati, potrebbe essere stata determinata dalla prolungata applicazione del fungicida in una fase più precoce (levata) rispetto a quella raccomandata (emissione della foglia a bandiera). Infatti spesso gli agricoltori usavano applicare il trattamento contro la septoriosi combinandolo con il controllo delle infestanti indipendentemente dall'evoluzione della malattia (Alvisi *et al.*, 2018). Ciononostante prodotti a base di

strobilurine continuano ad essere utilizzati con efficacia ancora soddisfacente e ciò è probabilmente legato alla tendenzialmente bassa pressione infettiva che caratterizza l'areale italiano con infezioni che, a partire dal 2007, si sono manifestate in maniera altalenante (Pasquini *et al.*, 2015). Questo quindi potrebbe aver contribuito a rallentare lo sviluppo di evidenti cali di efficacia nonostante l'elevata frequenza della sostituzione nei campioni analizzati.

Gli isolati monoconidici testati per la sensibilità ai DMI hanno dato *range* differenti fra i prodotti saggiati. Il prodotto che ha dato i valori di DE₅₀ più alti è stato il protioconazolo con una DE₅₀>100 mg/l. Risultati simili sono emersi in Danimarca, Svezia e nelle regioni baltiche dove il valore di DE₅₀ più alto per il protioconazolo è stato 73 mg/l (Heick *et al.*, 2017). Per il tebuconazolo e ciproconazolo questo studio ha riportato valori massimi rispettivamente di 18,83 e 9,51 mg/l che hanno rispecchiato quanto trovato in Tunisia da Taher *et al.*, (2014) dove il tebuconazolo ha dato un valore massimo di DE₅₀ >10mg/l e da Ronis *et al.*, (2014) dove i valori medi di DE₅₀ in Lituania per il ciproconazolo variavano da 1,51 a 10,66 mg/l.

Per l'eossiconazolo i valori di DE₅₀ riportati in precedenti studi sono eterogenei: in Tunisia il valore massimo ritrovato è stato 0,481 mg/l (Taher *et al.*, 2014), in Europa il valore più alto fra il 2006 e il 2008 è stato 1 mg/l (Stammler and Semar, 2011), in Lituania nel triennio 2009-2011 il valore medio di DE₅₀ è variato tra 1,02 e 3,15 mg/l (Ronis *et al.*, 2014) mentre in Danimarca il più alto valore è stato di 9 mg/l (Heick *et al.*, 2017). I valori di DE₅₀ della popolazione italiana di *Z. tritici* hanno range di 0,006-1,442 mg/l e sono simili a quelli citati negli altri studi.

I prodotti che hanno esibito la maggiore sensibilità sono stati difenoconazolo e metconazolo che hanno avuto dei valori massimi di DE₅₀ rispettivamente di 0,646 e 0,608 mg/l. Questi valori sono conformi a quelli ritrovati da Taher *et al.*, (2014) in Tunisia dove il valore massimo di DE₅₀ del metconazolo è stato 0,460 mg/l. Studi riguardanti la sensibilità al difenoconazolo non sono stati ritrovati.

I valori di DE₅₀ evidenziati in questo studio sono conformi a quelli ritrovati in Europa e potrebbero riflettere una situazione di adattamento di *Z. tritici* ai DMI infatti ceppi altamente sensibili che esibiscono valori di DE₅₀ <0,01 mg/l sono scarsamente presenti (Taher *et al.*, 2014, Torriani *et al.*, 2015). Questa considerazione viene confermata dalle sostituzioni amminoacidiche ritrovate, infatti alcune come la L50S, S188N e N513K non influenzano la sensibilità ai fungicidi (Cools and Fraaije, 2013), altre possono causare

una ridotta sensibilità. La sostituzione I381V, apparsa per la prima volta nel 2000 e ora molto presente nelle popolazioni europee, è la più diffusa negli isolati di questo studio. Questa mutazione è stato dimostrato essere la responsabile di una ridotta sensibilità al tebuconazolo (Fraaije *et al.*, 2007) e si presenta di solito insieme a sostituzioni o delezioni nelle posizioni comprese fra Y459-Y461. Diversi tipi di SNP possono interessare questa regione, in questo studio sono emerse le sostituzioni Y459D/S, Y461A/S e una doppia delezione in posizione Δ G460, Δ Y461 mentre Leroux *et al.*, (2007) ha riportato in isolati da campo la presenza di Y461H/G e della doppia delezione in posizione Δ Y459, Δ G460.

La sostituzione A379G, è stata per la prima volta documentata in Europa nel 2003, ed è diventata molto comune in queste popolazioni (Leroux *et al.*, 2007). Questa sostituzione, è presente in questo studio in 20 isolati monoconidici, ma non sono noti i suoi effetti sulla sensibilità ai fungicidi. Sembra essere selezionata dalla maggior parte dei trattamenti presi in esame, infatti osservandone la presenza negli isolati provenienti da campi sperimentali, prima e dopo il trattamento, è quasi sempre apparsa dopo il trattamento (Tabella 15).

Nonostante il protioconazolo abbia dato i più alti valori di DE₅₀ presenti in questo studio, non è stata ritrovata la sostituzione S524T che è stata dimostrata essere la causa di una ridotta sensibilità a questo prodotto (Leroux *et al.*, 2007, Fraaije *et al.*, 2007).

La genotipizzazione degli isolati monoconidici sulla base delle mutazioni possedute ci ha permesso di suddividerli in 24 aplotipi (Tabella 14). Il modo più comune per classificare gli aplotipi è suddividerli in “resistant type” (R-types) in base al fenotipo e all’evoluzione putativa del gene CYP51 (Leroux *et al.*, 2007), mentre una più recente classificazione suddivide gli aplotipi utilizzando una combinazione di lettere e numeri, allo scopo di darne una classificazione più sistematica e sostenibile (Huf *et al.*, 2018). In questo lavoro non sono emerse correlazioni fra genotipi e DE₅₀, se non l’abbondante presenza della mutazione I381V abbinata con alti valori di DE₅₀ per il tebuconazolo. Ciò ha reso impossibile l’applicazione delle classificazioni sopra descritte.

I valori massimi di DE₅₀ degli isolati monoconidici nei confronti degli SDHI sono stati uniformi per tutti i prodotti, con valori che hanno superato solo in pochi casi 1 mg/l. Questi risultati sono in accordo con la *baseline* riportata da Dooley *et al.*, (2016). Il prodotto che ha dato valori di DE₅₀ che si sono scostati dalla *baseline* è stato il bixafen dove il *range* di DE₅₀ proposto era di 0,018-0,882 mg/l mentre nelle nostre popolazioni il valore massimo è stato di 3,98 mg/l. Secondo lo studio proposto da Yamashita and Fraaije (2018) i valori di DE₅₀ di questo studio sono leggermente alti, infatti gli isolati

vengono definiti moderatamente resistenti con valori di $DE_{50} > 0,5$ mg/l e resistenti con valori di $DE_{50} > 5$ mg/l. Il sequenziamento Sanger ha riportato la presenza di mutazioni che interessano la subunità SdhC tra cui le più frequenti sono state la N33T e N34T sempre presenti insieme. Queste sostituzioni, sono state ritrovate anche in isolati irlandesi sensibili a tutti gli SDHI testati (Dooley *et al.*, 2016). Altre sostituzioni come la I29V, R40C, I161V hanno interessato pochi isolati monoconidici. Data la lontananza della mutazione I29V dal sito di legame dell'ubiquinone, non può avere un effetto diretto sul fungicida (Fraaije *et al.*, 2012). Risultano assenti sostituzioni come la SdhC-H152R che causano una ridotta sensibilità agli SDHI o SdhB-H267Y che causa una ridotta sensibilità alla carboxina (Skinner *et al.*, 98).

CAPITOLO 2

UN NUOVO APPROCCIO PER DETERMINARE LA FREQUENZA ALLELICA DELLA SOSTITUZIONE G143A ATTRAVERSO L'UTILIZZO DELLA DROPLET DIGITAL PCR IN *ZYMOSEPTORIA* *TRITICI*

1) Introduzione

La Septoriosi è un'importante malattia del frumento causata dal fungo ascomicete *Mycosphaerella graminicola* (anamorfo *Zymoseptoria tritici*), che può causare ingenti perdite di produzione quando non controllata attraverso l'impiego di fungicidi. Le famiglie di prodotti maggiormente impiegate nella lotta sono DMI, QoI e SDHI. I QoI sono prodotti monosito che vengono quindi classificati dal FRAC come ad alto rischio di sviluppo di resistenza (<http://www.frac.info/working-group/QoI-fungicides>). La mutazione responsabile di cali di efficacia è la sostituzione di una glicina con una alanina in posizione 143 (G143A). Questa sostituzione è molto diffusa in Europa (Gisi *et al.*, 2005, Torriani *et al.*, 2009) quindi le strobilurine non vengono ulteriormente raccomandate per il controllo del patogeno (Heick *et al.*, 2017). In Italia *Z. tritici* è un patogeno di recente introduzione e i QoI rappresentano ancora importanti fungicidi utilizzati nelle strategie di difesa. Monitoraggi condotti dal FRAC (http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2017-qoi-meeting-updated-in-may-2018-recommendations-for-2018.pdf?sfvrsn=a0764b9a_2) ma anche i risultati del capitolo 1 della tesi, mostrano la presenza della sostituzione G143A in popolazioni italiane di *Z. tritici*.

La quantificazione delle mutazioni coinvolte nella resistenza dei funghi ai fungicidi è di fondamentale importanza allo scopo di poter valutare quanto più possibile le potenziali ripercussioni dei fenomeni di resistenza a livello pratico. La metodologia più diffusa per quantificare le mutazioni è attualmente la Real-time PCR (qPCR) mentre recentissima è l'introduzione, anche in questo settore, della droplet digital PCR (ddPCR).

La qPCR è una tecnica che permette l'amplificazione e la quantificazione del DNA sulla base della emissione di fluorescenza da parte di un fluoroforo: maggiore è l'accumulo dei prodotti di PCR maggiore sarà la fluorescenza. La quantificazione in real-time può essere assoluta o relativa. Nella quantificazione assoluta viene costruita una curva standard, partendo da un campione a concentrazione nota e facendo delle diluizioni seriali. A ogni diluizione viene associato un ciclo di *threshold* (C_T) e l'insieme di questi valori va a

costituire la curva standard. Interpolando il C_T del campione ignoto con quello della curva si arriva a determinare la concentrazione del target. Nella quantificazione relativa vengono inseriti nello stesso esperimento sia un controllo endogeno sia i campioni da analizzare e vengono valutati i ΔC_T tra controllo e campione. La qPCR è stata largamente impiegata nella quantificazione della G143A in *Z. tritici* (Mc Cartney *et al.*, 2007, Stammler *et al.*, 2012, Heick *et al.*, 2017), *V. inaequalis* (Turan and Nanni, 2016) e *Blumeria graminis* f sp. *tritici* (Fraaije *et al.*, 2002). Inoltre è stata utilizzata nello studio di resistenze conferite da altre sostituzioni in *Erysiphe necator* e *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Blumeriella jaapii* (Dufour *et al.*, 2011; Bauske *et al.*, 2018; Banno *et al.*, 2008, Ma *et al.*, 2006).

La ddPCR è una tecnica innovativa che si basa sulla partizione della reazione di PCR in tante gocce rappresentanti ognuna una singola reazione. Attraverso l'uso di sonde ogni reazione viene classificata come positiva se contiene il DNA target o negativa se non lo contiene. La quantificazione avviene in n° di copie μ^{-1} utilizzando la distribuzione di Poisson, anche chiamata distribuzione degli eventi rari. Questo modello definisce M come il numero medio di copie target per reazione ed è determinato con la seguente formula $M = -\ln(1-P/R)$ dove P è il numero di gocce positive e R è il numero totale di gocce misurate (Pinheiro *et al.*, 2012). Per una corretta applicazione della distribuzione sono necessarie almeno 10.000 gocce totali nella reazione (Bio-Rad Droplets digital™ PCR Applications guide 2014).

In campo agro-alimentare esistono poche applicazioni della ddPCR, è stata ad esempio impiegata nella quantificazione di OGM (Gerdes *et al.*, 2016, Paternò *et al.*, 2018); nell'individuazione di *Salmonella typhimurium* nel latte (Wang *et al.*, 2018); nella genotipizzazione attraverso SNP della barbabietola da zucchero per distinguere tra piante a fioritura annuale o biennale (Stevanato and Biscarini 2016) e nell'individuazione di *Phytophthora nicotianae* a basse concentrazioni in piante di peperone (Blaya *et al.*, 2016). Nell'ambito della ricerca sulla sensibilità ai fungicidi è stata impiegata esclusivamente in *Blumeria graminis* nella quantificazione di mutazioni all'interno del gene CYP51 (Zulak *et al.*, 2018). Il principale vantaggio di questa tecnica è quello di permettere una veloce quantificazione evitando la determinazione della curva standard. Studi recenti hanno dimostrato l'elevata riproducibilità e ripetibilità della ddPCR (Mc Cartney *et al.*, 2007) e hanno evidenziato una maggiore precisione rispetto alla qPCR (Sanders *et al.*, 2011, Köppel *et al.*, 2018, Koch *et al.*, 2016).

Lo scopo dello studio riportato in questo secondo capitolo è stato quello di mettere a punto un rapido, sensibile e accurato protocollo per investigare la frequenza della G143A, sostituzione coinvolta nella resistenza ai QoI, in popolazioni di *Z. tritici*.

2) Materiali e metodi

2.1) DNA dei campioni

Due isolati monoconidici A e B sono stati isolati da due popolazioni naturali campionate in Emilia-Romagna. Attraverso sequenziamento Sanger è stato possibile classificare l'isolato A come sensibile (S) in quanto presentava l'allele G143 e l'isolato B come resistente (R) in quanto presentava l'allele A143. Il DNA degli isolati monoconidici è stato estratto attraverso un protocollo CTAB (Prodi *et al.*, 2011).

Per saggiare il protocollo è stata usata una popolazione naturale campionata in Emilia-Romagna nel 2015. Il DNA di questa popolazione è stato estratto con il Kit Qiagen DNeasy Plant Mini Kit.

Di tutti i DNA è stata determinata la qualità e la concentrazione usando rispettivamente lo spettrofotometro Nano Quant infinite M200PRO e il Nano Drop Qubit 3.0.

2.2) Setup della reazione di ddPCR e componenti usati

La messa a punto degli esperimenti è avvenuta seguendo le direttive della Digital MIQE Guidelines: Minimum Information of Quantitative Digital PCR Experiments (Huggett *et al.*, 2013).

In tutti gli esperimenti è stato utilizzato il ddPCR Mutation Detection Assay (FAM+HEX) fornito dalla Bio-Rad, specificatamente disegnato per la ddPCR, attraverso l'uso di un algoritmo Bio-Rad. Questo saggio necessita di una validazione in laboratorio prima di essere utilizzato, in quanto non viene validato dalla Bio-Rad prima di essere fornito. La sonda FAM ha come target l'allele mutato (R) mentre la sonda HEX quello wild type (S) (<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000050422.pdf>). Il MIQE context inserito nella web page della Bio-Rad <https://www.bio-rad.com/digital-assays/#/assays-create/mutation> per disegnare il Mutation Detection Assays è stato: CTGATGATGGCAACCGCATTCTTAGGGTATGTATTACCTTATGGTCAAATGTCTTTATGAG[G/C]AGCAACAGTTATAACTA ACTTATTGAGTGCAATACCTTG

AGTTGGACAAGACATAGTTGAA preso dal genoma mitocondriale completo di *Z. tritici* IPO323 (EU090238) disponibile su NCBI.

Utilizzando acqua ultrapura è stata preparata una mix da 20 µl. Per tutte le reazioni i vari componenti sono stati usati alla concentrazione finale di: 1X per la Bio-Rad dd PCRTM supermix per probes (no dUTP, concentrata 2X); 1X per il dd assay primers-probe mix (concentrato 20X e pronto all'uso), 900 nM primers/250 nM per ogni sonda. Quantità differenti di DNA sono state aggiunte, come indicato in ogni esperimento. Le gocce sono state generate da QX 200 Droplets Generator (Bio-Rad) in cartridge da 8 (Bio-Rad, cod. 186-4008) come indicato nella Droplet DigitalTM PCR Applications Guide (2014). Le PCR sono state corse nel termociclatore Bio-Rad T100. Dopo l'amplificazione i prodotti di PCR sono stati trasferiti in un lettore QX200 ddPCR reader e i dati sono stati successivamente analizzati da Quanta Soft Version 1.7.4.0917 e Quanta Soft Analysis Pro Software Version 1.0. La *threshold* è sempre stata settata manualmente usando il cluster in 2D in modo da avere una buona distinzione tra gocce positive e negative.

2.3) Esperimento preliminare sulla generazione di gocce

Per essere sicuri di avere, alle nostre condizioni, una generazione di gocce appropriata sono stati fatti due esperimenti indipendenti di generazione di gocce da due diversi operatori. Ogni operatore in ogni esperimento ha eseguito quattro repliche.

In entrambi gli esperimenti il protocollo termico utilizzato è stato: 95°C per 10 min, seguito da 39 cicli a 94°C per 30 sec con una *ramp speed* di 2°C/sec, 60°C per 1 min e 98°C per 10 min. Le temperature di *annealing/extension* scelte sono state le più alte consigliate dal fornitore per il nostro ddPCR mutation detection assay. Non essendo indispensabile in questa reazione non è stato aggiunto DNA allo scopo di conservarlo per le reazioni future.

2.4) Ottimizzazione delle condizioni di PCR

Per ottimizzare la temperatura di *annealing/extension* e la quantità di DNA degli isolati monoconidici A e B, sono stati fatti due esperimenti. Nel primo esperimento sono stati saggiati 56, 58 e 60 °C di *annealing/extension* e 5, 2 e 0,5 ng di DNA genomico sia per l'isolato sensibile che per quello resistente. Nel secondo esperimento sono stati saggiati 52, 54 e 56 °C e 0,1ng di DNA genomico per entrambi gli isolati.

In entrambi gli esperimenti il protocollo termico è stato: 95°C per 10 min, seguito da 39 cicli a 94°C per 30 sec con una *ramp speed* di 2°C/sec, gradienti termici descritti sopra per 1 min e 98°C per 10 min.

2.5) Valutazione della sensibilità del protocollo ddPCR

In questo esperimento, per determinare l'accuratezza e la sensibilità del valore di frequenza allelica, ottenuto con il ddPCR Mutation Detection Assay alle condizioni ottimizzate, sono stati miscelati i DNA dei due isolati monoconidici.

Sono stati costruiti due gruppi di campioni, mantenendo costante il n° di copie di un allele e diluendo serialmente di quattro volte l'altro, in modo da ottenere otto campioni per ogni gruppo. La composizione dei campioni è riportata in tabella 18.

Tab 18. Composizione dei campioni da 1 a 8.

	N° di copie degli alleli per ogni campione (S/R)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Gruppo 1	1000/ 1000	1000/ 250	1000/ 62,5	1000/ 15,6	1000/ 3,9	1000/ 0,9	1000/ 0,22	1000/ 0,056
Gruppo 2	1000/ 1000	250/ 1000	62,5/ 1000	15,6/ 1000	3,9/ 1000	0,9/ 1000	0,22/ 1000	0,056/ 1000

Il protocollo termico è stato: 95°C per 10 min seguito da 39 cicli a 94°C per 30 sec con una *ramp speed* di 2°C/sec, 54°C per 1 min e 98°C per 10 min.

2.6) Prova del protocollo con una popolazione naturale

Il protocollo ottimizzato è stato saggiato per la sua capacità di determinare la frequenza allelica in una popolazione naturale di *Z. tritici*. Il protocollo termico usato è stato: 95°C per 10 min, seguiti da 39 cicli a 94°C per 30 sec con una *ramp speed* di 2°C/sec, 54°C per 1 min e 98°C per 10 min. Alla reazione di PCR sono stati aggiunti 0,1 ng di DNA.

3) Risultati

3.1) Esperimento preliminare sulla generazione di gocce

Complessivamente, i risultati ottenuti da questo esperimento mostrano un numero totale di eventi sempre maggiore di 10.000, con un *range* che varia da 11.987 a 17.169 (Tabella 19).

Tab 19. Numero totale di eventi generato da due diversi operatori in due esperimenti indipendenti.

	Numero totale di eventi nell' esperimento 1			
Operatore 1	14.943	17.169	13.794	16.954
Operatore 2	14.001	14.700	14.670	16.565
	Numero totale di eventi nell' esperimento 2			
Operatore 1	14.946	14.246	14.110	11.978
Operatore 2	13.946	14.054	14.351	13.206

3.2) Ottimizzazione delle condizioni di PCR

Nel primo esperimento finalizzato all'ottimizzazione della temperatura di *annealing/extension* e all'individuazione della migliore quantità di DNA, 2 e 5 ng hanno portato alla saturazione del segnale FAM (Figura 9A, campioni 13-18). La quantità di DNA che ha reso possibile una buona separazione delle gocce sia nel canale 1 (Figura 9A, campioni 10-12) che nel 2 (Figura 9B, campioni 1-3) è stata di 0,5 ng. Tra le temperature di *annealing/extension* saggiate la migliore per entrambi i canali è stata 56 °C (Figura 9A campione 12, 9B campione 3). I risultati ottenuti da questo primo esperimento non sono stati soddisfacenti e quindi nel secondo esperimento sono state saggiate temperature di *annealing/extension* più basse e la quantità di DNA è stata diminuita a 0,1 ng. La migliore separazione fra gocce positive e negative è avvenuta a 54 °C in entrambi i canali FAM (Figura 10A, campione 5) e HEX (Figura 10B, campione 2).

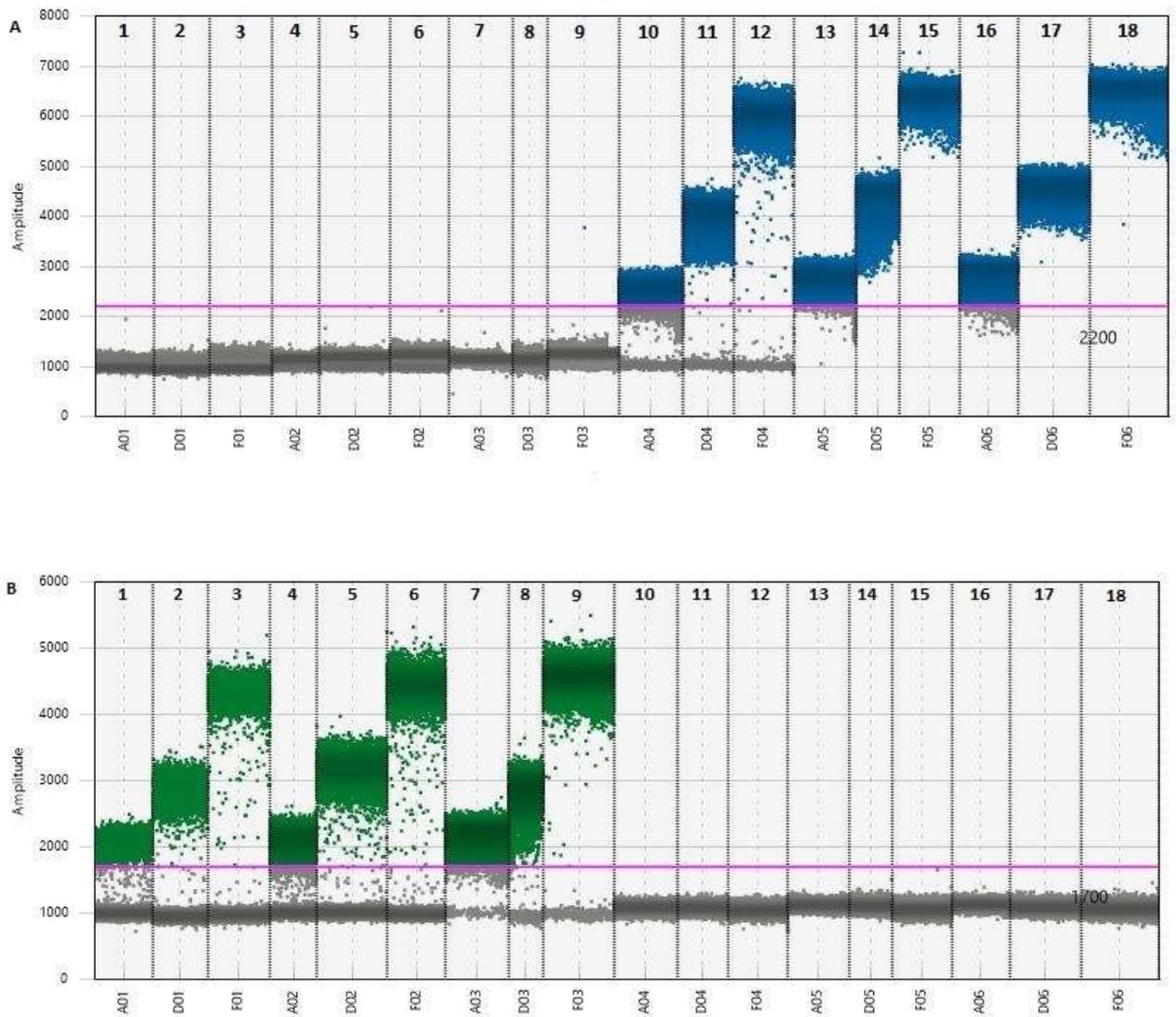


Fig 9. Primo esperimento di ottimizzazione della temperature di *annealing/extension* e individuazione della migliore quantità di DNA. I risultati del canale 1 (FAM, allele R) e del canale 2 (HEX, allele S) sono mostrati in (A) e (B).

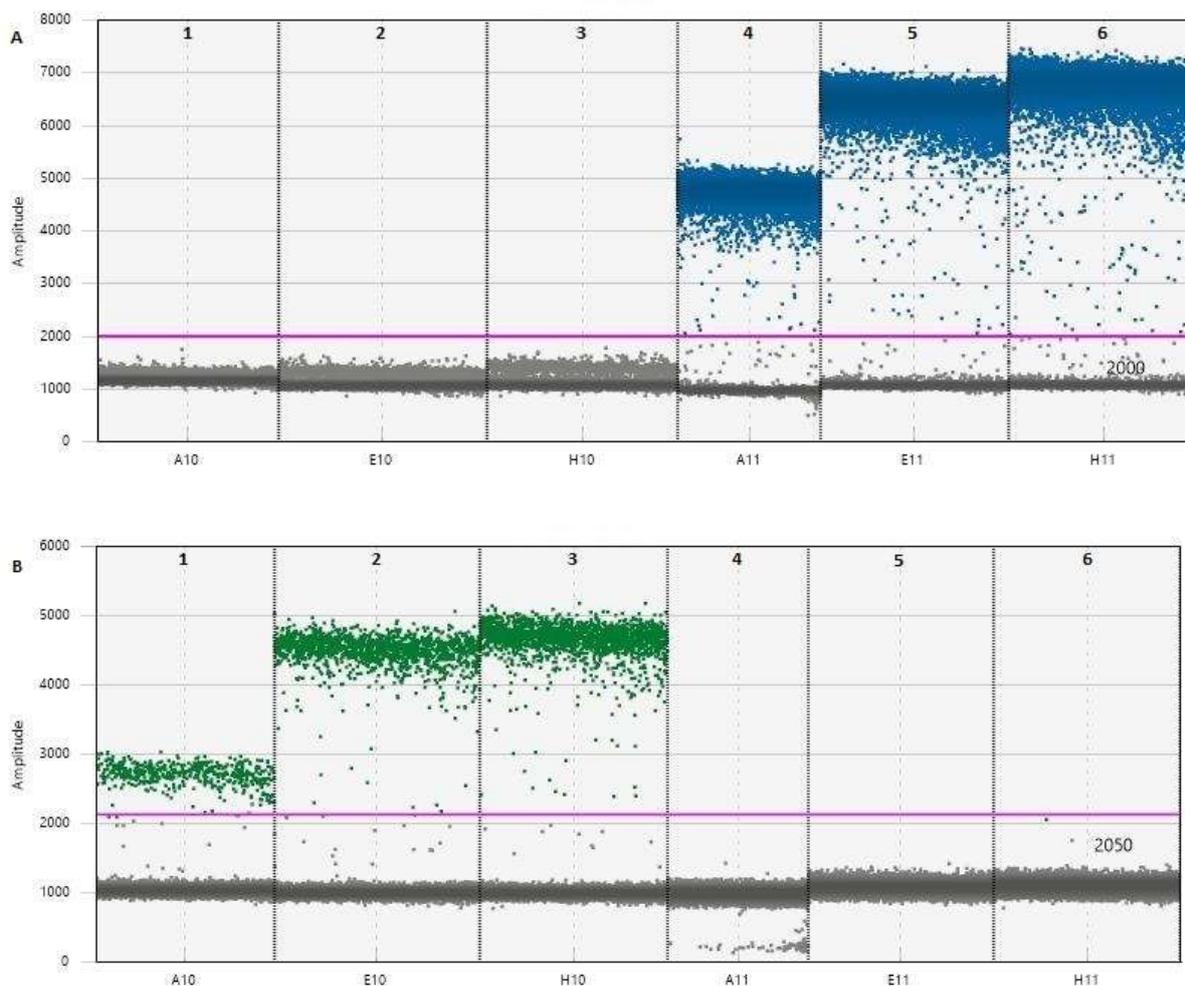


Fig 10. Secondo gradiente termico per ottimizzare la temperatura di *annealing/extension*. Nella reazione di PCR sono stati aggiunti 0,1 ng di DNA. I risultati del canale 1 (FAM, allele R) e del canale 2 (HEX, allele S) sono mostrati in (A) and (B).

3.3) Valutazione della sensibilità del protocollo di ddPCR

La ddPCR è stata in grado di confermare il numero di copie di entrambi gli alleli in tutti i campioni come mostrato in Figura 11. La frequenza allelica più bassa determinata dall'Assay alle condizioni ottimizzate è stata di 0,008% per l'allele resistente (Figura 11A) e 0,012% per l'allele sensibile (Figura 11B). La frequenza allelica è espressa come abbondanza frazionaria ($\text{alleleX}/(\text{alleleX} + \text{alleleY}) * 100$). La misura del numero di copie è stata accurata con una correlazione lineare fra n° di copie attese e reali particolarmente alta (R^2 di 0,99) sia per i campioni del gruppo 1 (Figura 12 A) che per quelli del gruppo 2 (Figura 12 B).

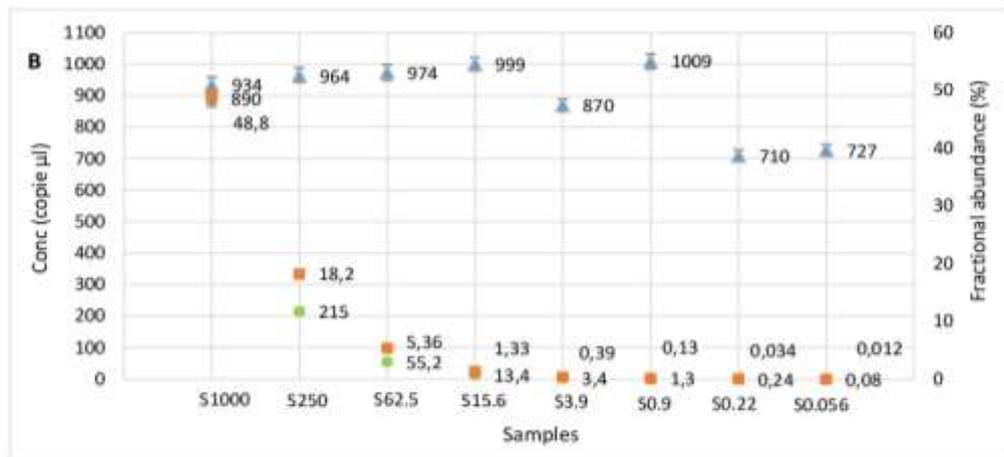
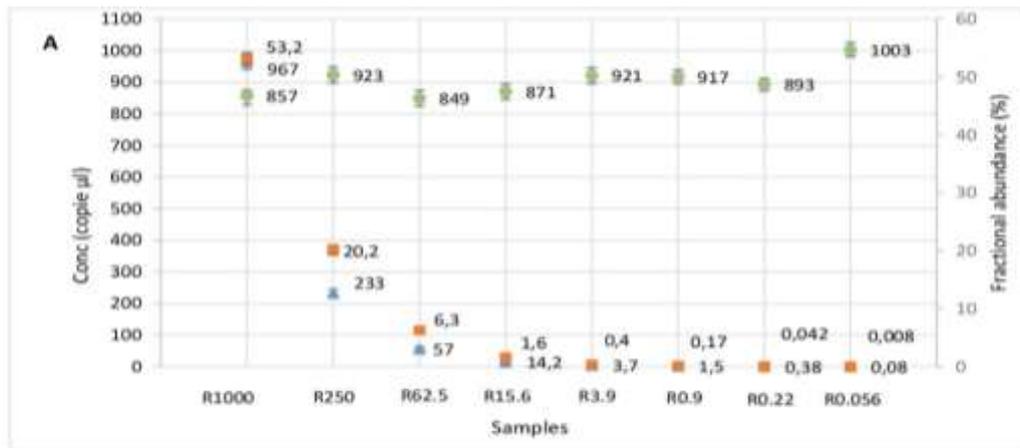


Fig 11. Concentrazione dell'allele R (triangolo), S (cerchio) e abbondanza frazionaria degli alleli (quadrato) ottenuta per i campioni del gruppo 1 (A) e del gruppo 2 (B).

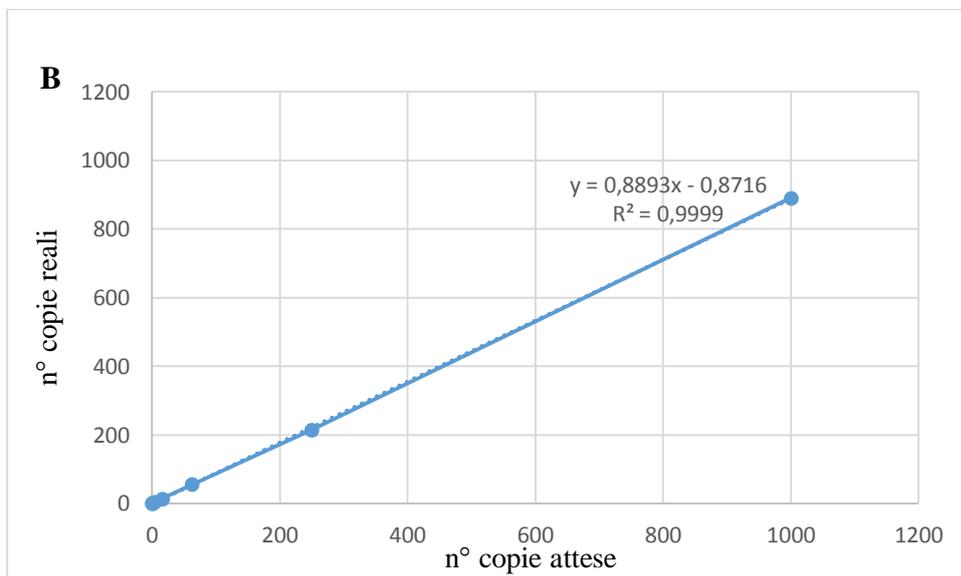
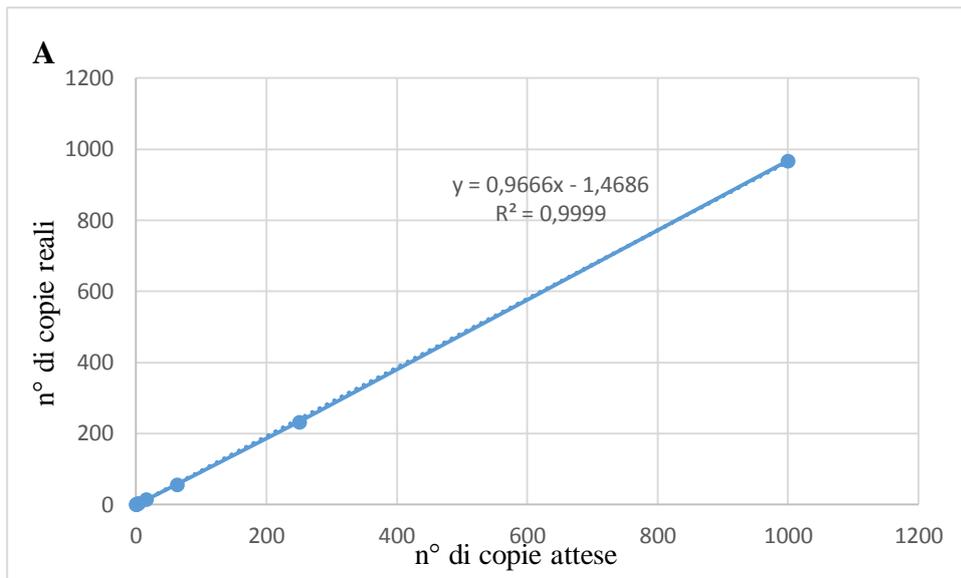


Fig 12. Correlazione lineare fra n° di copie reali e n° di copie attese per i campioni del gruppo 1(A) e 2(B).

3.4) Prova del protocollo con una popolazione naturale

Il protocollo ottimizzato è stato saggiato con una popolazione naturale di *Z. tritici* avente una concentrazione ignota dei due alleli. L'Assay è stato in grado di determinare il numero di copie dell'allele resistente e sensibile. Nella popolazione la frequenza degli alleli espressa come abbondanza frazionaria è stata di 0,38% per R (Figura 13A) e 99,62% per S (Figura 13B).

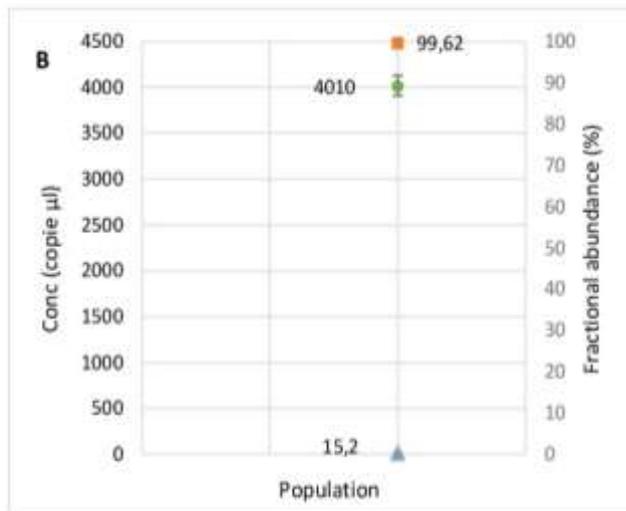
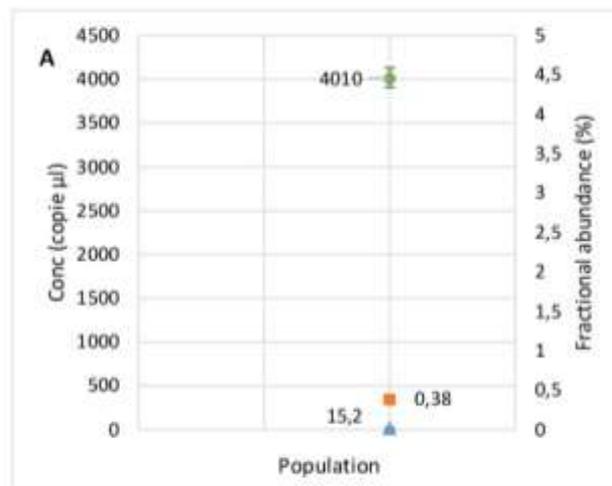


Fig 13. Concentrazione degli alleli R (triangolo), S (cerchio) e abbondanza frazionaria (quadrato) degli alleli R (A) e S (B) di una popolazione naturale di *Z. tritici*.

4) Discussione

Negli ultimi anni la ddPCR è stata applicata in diversi campi, incluso quello agrario, con risultati soddisfacenti. Solo uno studio, che stabilisce la frequenza di uno SNP associato alla resistenza ai fungicidi, è stato condotto con questa metodologia (Zulak *et al.*, 2018). Normalmente per investigare la frequenza allelica viene usata la qPCR (Mc Cartney *et al.*, 2007, Taher *et al.*, 2014), ma questo metodo richiede la calibrazione di una curva standard rendendo difficoltosa la riproducibilità dei risultati fra laboratori e all'interno

dello stesso. Inoltre la qPCR offre una inferiore accuratezza nella determinazione della frequenza allelica quando presente a livelli molto alti (100%) e molto bassi (0%).

In questo capitolo viene proposto un nuovo protocollo in ddPCR per la determinazione e quantificazione della G143A in *Z. tritici*.

È stato deciso di adottare un ddPCR Mutation Detection Assay disegnato specificatamente dall'algoritmo della Bio-Rad, per rendere possibile la veloce messa a punto del protocollo grazie ai seguenti vantaggi: basso rischio di reazione incrociata fra le sonde, specificità di segnale dato dalle sonde e conoscenza della concentrazione finale dei reagenti. Tuttavia è stato necessario determinare le migliori condizioni di PCR per una buona separazione fra gocce positive e negative ottimizzando il protocollo termico e la quantità di DNA da usare nella reazione.

Il primo esperimento condotto allo scopo di ottimizzare le condizioni di PCR, ha confermato la specificità delle sonde per entrambi gli alleli R e S ma ha rivelato che 2 e 5 ng di DNA portano alla saturazione del canale FAM. Tuttavia in entrambi i canali FAM e HEX ci sono state gocce che hanno mostrato una fluorescenza intermedia: questo comportamento viene definito “rain” e viene risolto ottimizzando le condizioni di PCR (Koch *et al.*, 2016).

Per evitare la saturazione e ridurre la “rain”, nel secondo esperimento la quantità di DNA aggiunta è stata aggiustata a 0,1 ng e il gradiente termico usato è stato di 52, 54 e 56 °C di *annealing/extension*. I risultati hanno mostrato come 54 °C e 0,1 ng di DNA fossero le migliori condizioni di amplificazione. Il software QuantaSoft imposta automaticamente una *threshold* ma per una migliore separazione tra gocce positive e negative è consigliabile impostarla manualmente (Gerdes *et al.*, 2016).

La partizione della reazione in gocce è una fase critica e per una corretta analisi dei dati sono necessari almeno 10.000 eventi totali (Droplet Digital™ PCR Applications Guide 2014). Durante l'esperimento preliminare sulla generazione di gocce, un adeguato numero di partizioni è stato ottenuto da entrambi gli operatori. Anche in tutti gli esperimenti successivi il numero di partizioni è sempre stato adeguato. Questi risultati possono anche dipendere dall'uso delle cartridge 186-4008 che migliora la partizione in gocce (Gerdes *et al.*, 2016).

Rispetto alla qPCR un importante vantaggio della ddPCR è l'accuratezza. Nello studio di Fraaije *et al.*, 2005 riguardante la frequenza della G143A in popolazioni di *Z. tritici*, la

qPCR riesce a fornire una misura accurata nel *range* che va dal 5 al 95%. Nell'esperimento di valutazione della sensibilità del protocollo di ddPCR è stato possibile ottenere una misura accurata, con un R^2 di 0,99, del n° di copie degli alleli in tutti i campioni del gruppo 1 (Figura 11A) e 2 (Figura 11B). La frequenza più bassa ottenuta per entrambi gli alleli è stata di 0,008% per R (Figura 11A) e 0,012% per S (Figura 11B) nonostante l'abbondante presenza di circa 1000 copie/ μ l dell'altro allele. Anche in una popolazione naturale la ddPCR è stata in grado di quantificare l'allele R a una frequenza molto bassa (0,38% Figura 13A) anche in presenza dell'allele S ad alta frequenza (99,62%, Figura 13B).

CAPITOLO 3

VALUTAZIONE DELL' AGGRESSIVITÀ E VIRULENZA DI *ZYMOSEPTORIA TRITICI* NEI CONFRONTI DI DIVERSE VARIETÀ DI FRUMENTO TENERO E DURO

1) Introduzione

La specializzazione di *Zymoseptoria tritici* nei confronti del frumento tenero e duro è un fenomeno riscontrato in molti areali per la prima volta documentato da Eyal *et al.*, (1973), il quale affermava che isolati del patogeno provenienti da frumento tenero erano scarsamente aggressivi su varietà di frumento duro. Sempre Eyal *et al.*, (1985) studiò la virulenza di ceppi del fungo raccolti in 22 località affermando che nei paesi in cui era predominante la coltivazione del frumento duro si era verificata una specializzazione del patogeno verso questa specie.. Negli anni seguenti la specializzazione è stata confermata da Kema *et al.*, (1996 a e b), Medini and Hamza, (2008). Allo scopo di spiegare il fenomeno è stata ipotizzata la presenza di due varianti di *Z. tritici*, una adattata al frumento duro e una al frumento tenero, ma dalla comparazione del DNA ribosomiale 5.8s di cinque isolati adattati al frumento tenero e cinque adattati al frumento duro è emersa una perfetta omologia (Hamza *et al.*, 1999). La specializzazione di *Z. tritici* suggerisce una interazione “gene-for-gene” fra ospite e patogeno (Kema *et al.*, 2000). In questa interazione per ogni gene nella pianta che conferisce resistenza, esiste il corrispondente gene di avirulenza nel patogeno (Flor 1971). Il gene di resistenza può essere superato se il patogeno acquisisce virulenza grazie alla perdita o all’alterazione del gene di avirulenza. L’unico gene qualitativo che conferisce resistenza alla septoriosi, per il quale è stata dimostrata una interazione “gene-for-gene” è *Stb6* (Brading *et al.*, 2002). In un incrocio fra due ceppi di *Z. tritici* adattati rispettivamente a frumento tenero e duro, il locus di avirulenza di *Stb6* (*AvrStb6*) è stato dimostrato essere parte della diversa capacità della progenie di infettare il frumento duro (Brading *et al.*, 2002). Questo suggerisce che la resistenza del frumento ai ceppi di *Z. tritici* specializzati è controllata in parte da una resistenza qualitativa (Ware, 2006).

In questa tesi una serie di varietà di frumento tenero e duro sono state saggiate con isolati di *Z. tritici* provenienti dalle due specie di frumento allo scopo di verificare:

- La virulenza degli isolati italiani di *Z. tritici* alle due specie di frumento
- La sensibilità delle varietà a *Z. tritici*.

L'approfondimento di queste due tematiche è stato possibile grazie alla collaborazione con la multinazionale Basf nell'ambito della Piattaforma Cereali Basf "Percorsi di Eccellenza" con la collaborazione di Società Sementiere e Molini/Pastifici con l'obiettivo di ottimizzare le differenti filiere.

2) Materiali e metodi

2.1) Varietà di frumento

Un totale di 41 varietà di frumento sono state messe a disposizione da diverse ditte sementiere. Le varietà erano suddivise in frumenti teneri e duri. I frumenti teneri erano divisi in altre tre sotto-categorie: frumenti biscottieri, panificabili e di forza (Tabella 20).

Tab 20. Elenco delle varietà di frumento suddivise per tipologia, saggiate per la sensibilità a *Z. tritici* in condizioni controllate di serra

FRUMENTI TENERI			FRUMENTI DURI
BISCOTTIERI	PANIFICABILI	DI FORZA	
Bagou (PRODUTTORI SEMENTI POLESANI)	Altamira (LIMAGRAIN)	Bologna (SIS)	Odisseo (PSB)
Amburgo (APSOV)	Asuncion (APSOV)	Rebelde (APSOV)	Colombo (APSOV)
Sofolk (CAUSSADE)	Sobred (CAUSSADE)	Sperimentale 1660 (CAUSSADE)	Haristide (CAUSSADE)
Birbante (CONASE)	Teorema (CONASE)	Metropolis (CONASE)	Solstizio (CONASE)
Ilaria (ISEA)	Afrodite (ISEA)	Standal (ISEA)	Minosse (ISEA)
Arkeos (LIMAGRAIN)	LG Ayrton (LIMAGRAIN)	Califa Sur (LIMAGRAIN)	Athoris (LIMAGRAIN)
Hystar (RV VENTUROLI)	Centurion (RV VENTUROLI)	VST790 (RV VENTUROLI)	Trapezio (RV VENTUROLI)
Catullo (SEMETICA)	Altavista (SEMETICA)	Nogal (SEMETICA)	Zetae (SEMETICA)
Modern (VENETO SEMENTI)	Basmati (VENETO SEMENTI)	ACA320 (VENETO SEMENTI)	Ismur (VENETO SEMENTI)
Santorin (SIS)	Angelico (SIS)	Giorgione (SIS)	Marco Aurelio (SIS)
			San Carlo (ISEA)

Dati riservati non divulgabili

Inoltre, due varietà per ogni tipologia di frumento, (Hystar e Modern per i biscottieri, Altamira e Sobred per quelli panificabili, Nogal e Rebelde per quelli di forza, Marco Aurelio e Minosse per i duri), sono state seminate, partendo da seme non conciato, in pieno campo e lasciate infettare in maniera naturale da *Z. tritici* senza l'applicazione di nessun fungicida.

2.2) Isolati di *Z. tritici* usati nelle prove

Quattro isolati monoconidici di *Z. tritici*, di comprovata patogenicità, sono stati impiegati nelle prove, due provenienti da frumento duro (*Triticum durum*), due da frumento tenero (*Triticum aestivum*) Un isolato proveniva dalla provincia di Ravenna e tre dalla provincia di Bologna.

2.3) Schema sperimentale delle prove in serra

Tutte le varietà sono state inoculate con i quattro isolati di *Z. tritici*. Ogni combinazione varietà-isolato è stata replicata quattro volte. Le piante sono state inoculate allo stadio di 2° foglia con una sospensione di 10^7 conidi/ml, e dopo 72h al 100% di umidità relativa e a una temperatura di 22 °C, sono state collocate in cella alla medesima temperatura ma con una umidità relativa dell'80% per 18 giorni. Trascorsi 21 giorni dall'inoculazione è stata valutata, per la prima e la seconda foglia, la gravità dell'infezione rilevando la percentuale di superficie fogliare con necrosi e quella interessata dalla presenza di picnidi.

2.4) Schema sperimentale della prova in campo

Le otto varietà di frumento precedentemente elencate, sono state seminate il 16 ottobre 2017 a Fiorentina di Medicina (BO) in parcelle di 3x26 m e sono state infettate in modo naturale da *Z. tritici*. In due differenti momenti (il 20.4.18 fase fenologica botticella BBCH42 e il 23.5.18 fase fenologica fioritura BBCH65) è stata valutata in tre diversi punti della parcella l'incidenza (% di piante infette) e la gravità dei sintomi sempre in termini di tessuto necrotizzato. La gravità è stata espressa con una scala da 1-10 dove: da 1 a 4 la sintomatologia non era presente sulla foglia a bandiera mentre da 5 a 10 l'infezione era evidente anche sulla foglia a bandiera.

I dati ottenuti in serra e in campo sono poi stati confrontati sulle varietà provate in entrambi gli ambienti, allo scopo di verificare l'attendibilità del protocollo messo a punto in ambiente controllato, per una eventuale successiva adozione su più ampia scala utile per valutare precocemente e in minor tempo la sensibilità delle nuove varietà a *Z. tritici*.

2.5) Elaborazione statistica

Dati di serra

I sintomi causati da due isolati del patogeno provenienti da frumento tenero e due isolati del patogeno provenienti da frumento duro sono stati mediati. I valori % medi di superficie fogliare con necrosi e picnidi, rilevati sulla prima e seconda foglia, sono stati elaborati con la trasformazione di Bliss. Ai dati trasformati, per interpretare la classificazione di tutte le combinazioni varietà-isolato, è stata poi applicata una Analisi della Discriminante Canonica (DCA) Candisc sulle varietà di frumento tenero e duro, un Advanced (ADV) Cluster che opera una *fuzzy clustering* a cui associa una Analisi delle Componenti Principali (PCA), entrambe usando il programma R versione 3.4.4. Alle diverse combinazioni varietà di frumento tenero, duro/isolato è stata applicata una Mixed Anova con il programma SAS versione 9.0.

Dati di pieno campo

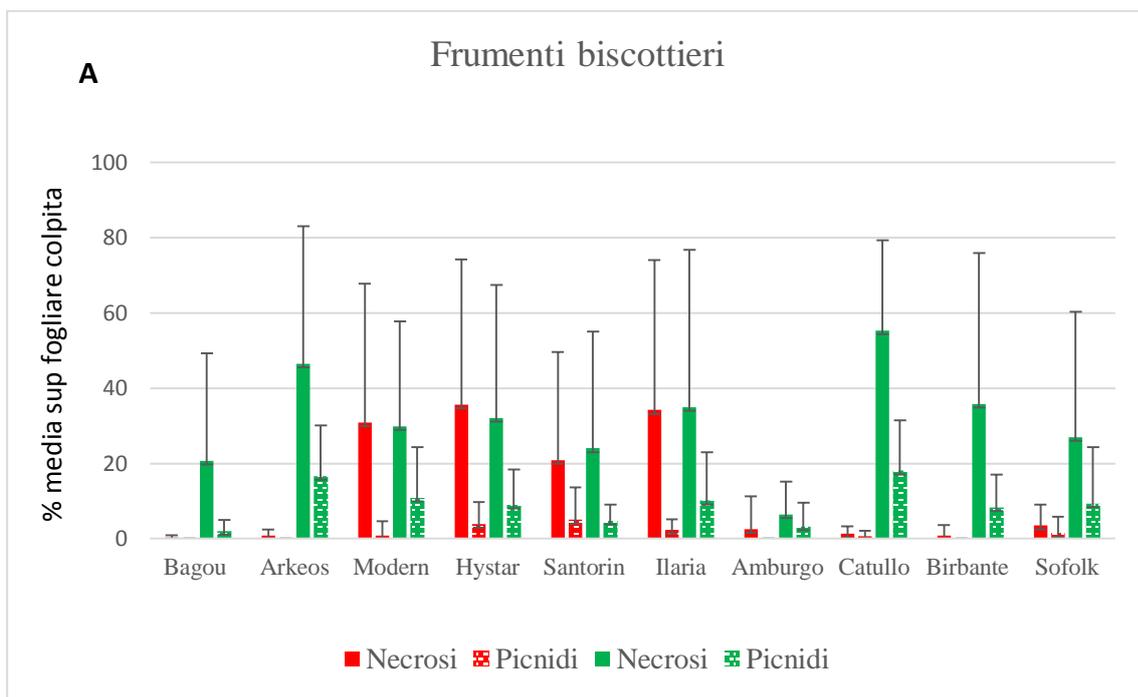
I valori di incidenza e gravità sono stati elaborati con il programma Statgraphics 2.1 applicando il test post-hoc di Duncan per $p=0,05$.

3) Risultati

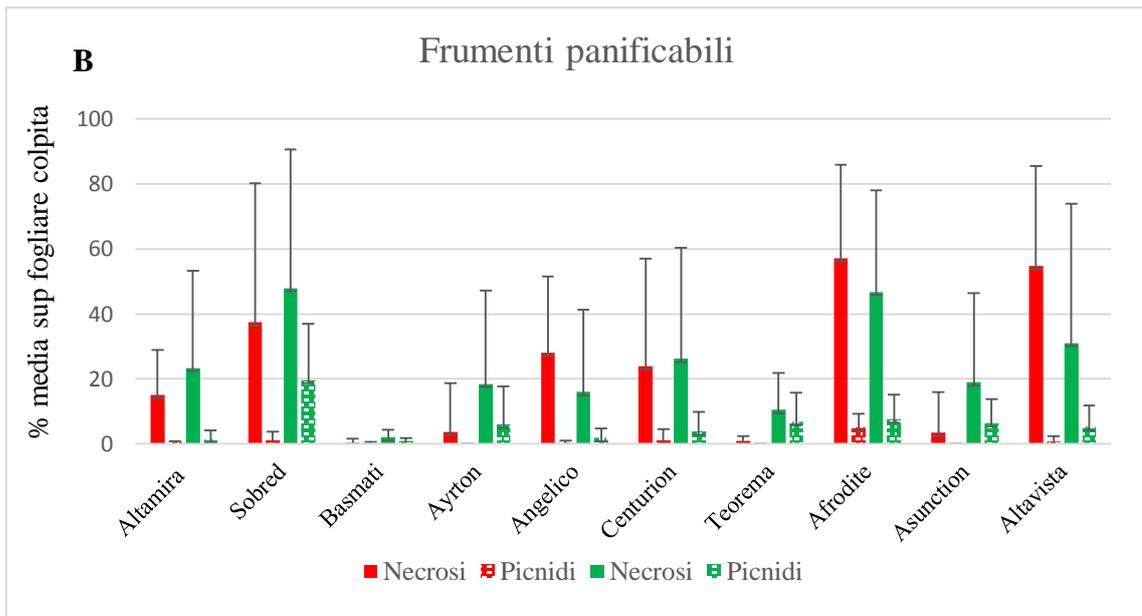
3.1) Prove in serra

Le percentuali di infezioni medie riportate di seguito sono suddivise in base alle tipologie di frumento precedentemente descritte. La figura 14 da A a D ha lo scopo di mostrare il grado di infezione manifestato da ogni varietà con le due tipologie di isolati del patogeno. Ogni varietà di frumento ha manifestato valori percentuali di necrosi e presenza di picnidi differenti, in base alla provenienza dell'isolato di *Z. tritici* con cui sono state inoculate. In tutti i grafici è evidente che quando le varietà di frumento duro vengono inoculate con gli isolati provenienti da frumento duro la percentuale di sintomi è particolarmente elevata (Figura 14 D istogrammi rossi), lo stesso vale per i frumenti teneri inoculati con gli isolati provenienti da frumento tenero (Figura 14 A-B-C istogrammi verdi). Tra i frumenti biscottieri (Figura 14A), quello che ha mostrato il minor grado di infezione quando inoculato con isolati di *Z. tritici* provenienti da entrambe le specie di frumento, è stato Bagou, che infettato con isolati provenienti da frumento duro non ha manifestato né necrosi né picnidi, mentre quando inoculato con isolati provenienti da frumento tenero ha mostrato un 20,7% di necrosi e un 2,1% di picnidi. Tra i frumenti panificabili (Figura

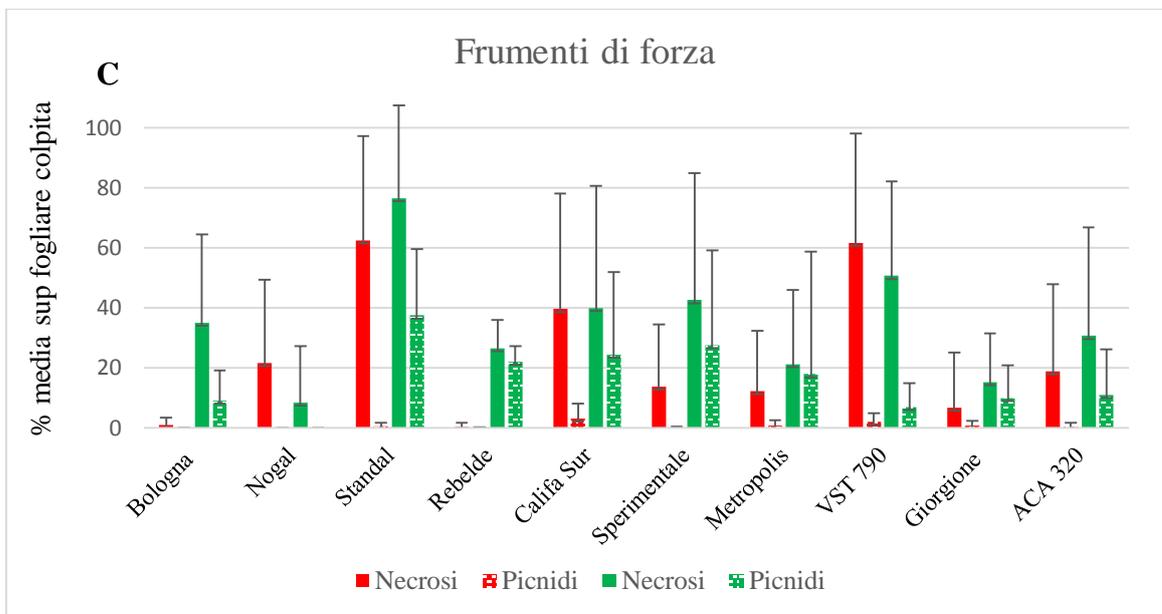
14B) la varietà che ha mostrato il minor grado di infezione, da parte di isolati provenienti da entrambe le specie di frumento, è stato Basmati che inoculato con isolati provenienti da frumento duro ha manifestato una necrosi dello 0,3% e lo 0,1% di picnidi, mentre inoculato con isolati provenienti da frumento tenero ha mostrato un 2,1% di necrosi e lo 0,9% di picnidi. Tra i frumenti di forza (Figura 14C) si è contraddistinta la varietà Nogal con un 21,5% di necrosi quando inoculato con isolati provenienti da frumento duro e un 8,4% con isolati provenienti da frumento tenero e in entrambi i casi non ha manifestato la presenza di picnidi. Nei frumenti duri, (Figura 14D) il grado di infezione è stato in generale maggiore sia quando inoculati con isolati provenienti da frumento duro che da frumento tenero. Tra le varietà si è contraddistinto Solstizio che ha manifestato una percentuale di necrosi del 19,6 e di picnidi del 9,2 quando inoculato con isolati provenienti da frumento duro, mentre quando inoculato con isolati provenienti da frumento tenero ha manifestato una percentuale di necrosi e picnidi rispettivamente del 28,4 e 5,1. La variabilità è risultata molto alta in tutte le combinazioni varietà/isolato e per tutti i sintomi valutati.



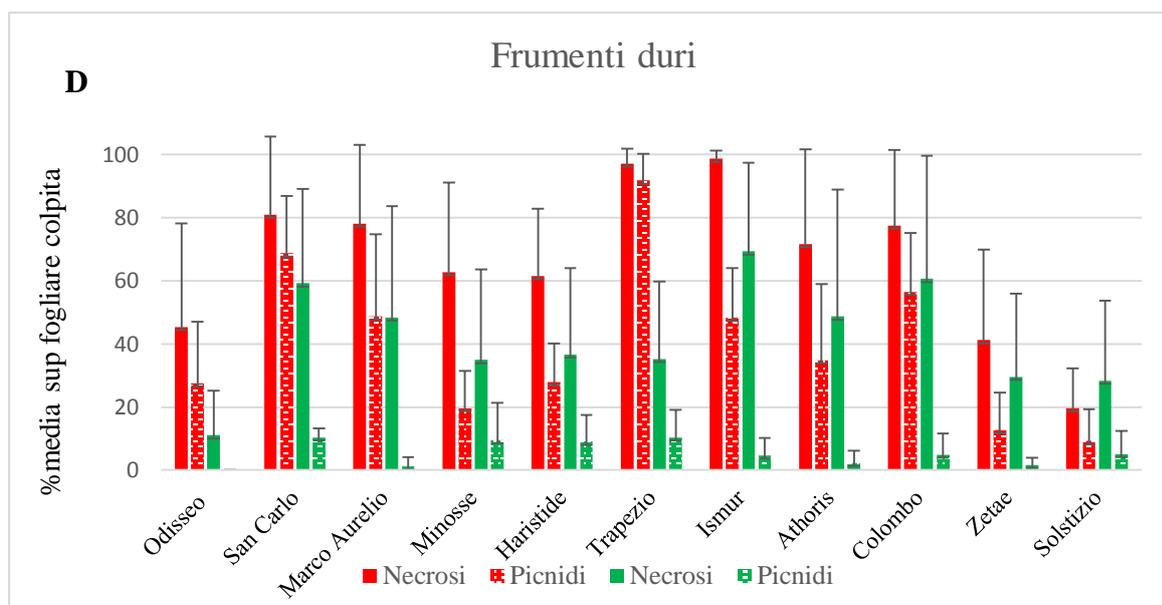
Dati riservati non divulgabili



Dati riservati non divulgabili



Dati riservati non divulgabili



Dati riservati non divulgabili

Fig 14. Percentuale media di superficie fogliare colpita da necrosi e picnidi per le quattro categorie di frumento: biscottieri (A), panificabili (B), di forza (C), duri (D) quando inoculate con isolati provenienti da frumento duro (rosso) e tenero (verde). La barra rappresenta la deviazione standard.

L'analisi DCA (Figura 15A) ha evidenziato come l'interazione, fra frumento duro (d) con un isolato proveniente da frumento duro (D) è molto forte, quindi ha dato origine a una maggiore % di sintomi, subito seguita dall'interazione fra frumento tenero (t) con un isolato proveniente da frumento tenero (T), da un frumento duro (d) con un isolato proveniente da frumento tenero (T) e da un frumento tenero (t) con un isolato proveniente da frumento duro (D). Le interazioni più forti sono quelle ottenute con i valori % di superficie fogliare con picnidi (P) (Figura 15B) ma entrambi i sintomi valutati, necrosi (N) e picnidi (P), seguono lo stesso andamento. La variabilità fra le repliche è maggiore se si analizzano i valori % di necrosi (Figura 15B).

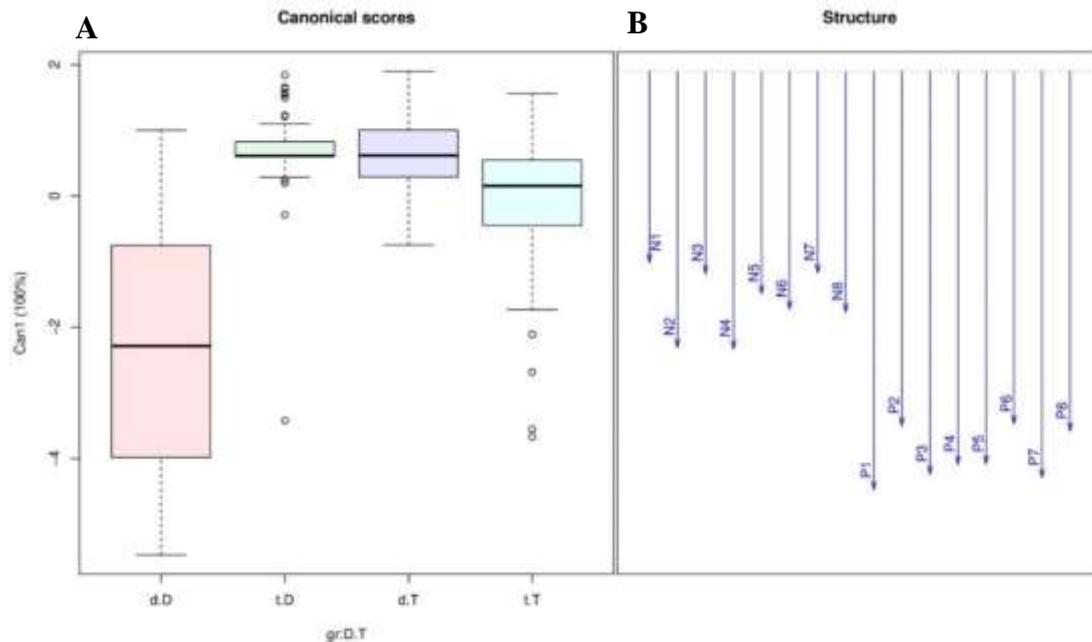


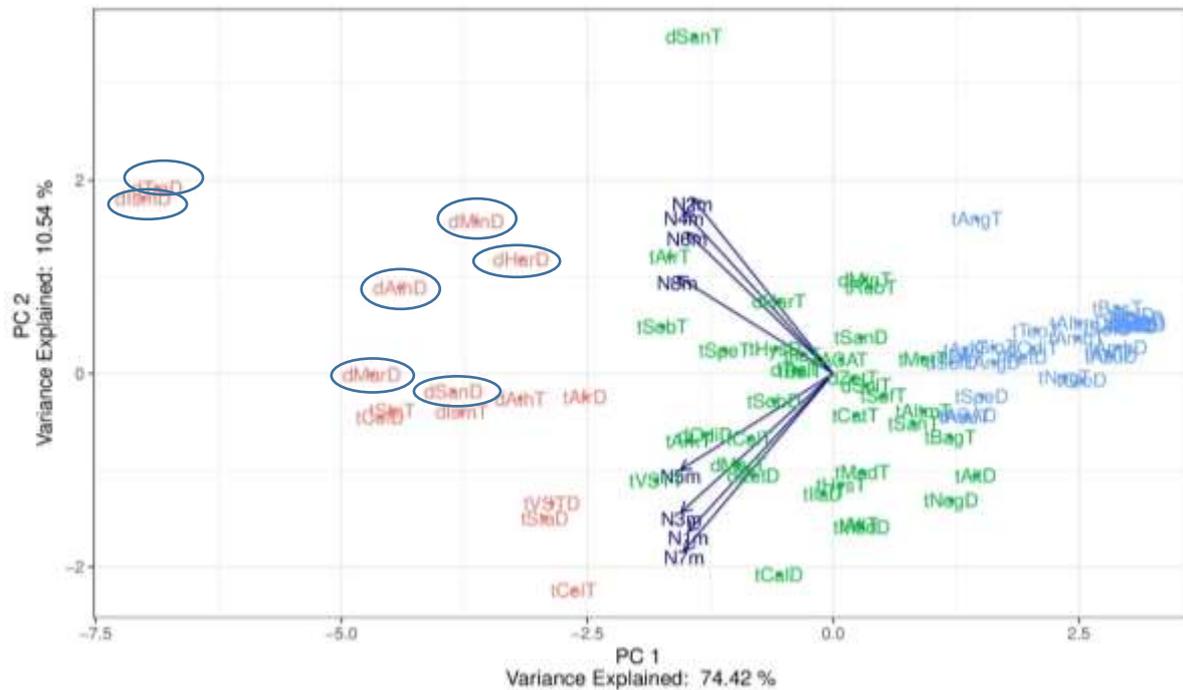
Fig 15. A - DCA su varietà di frumento duro (d) e tenero (t) inoculate con isolati di *Z. tritici* collezionati da duro (D) e tenero (T). B - Variazione di necrosi (N) e picnidi (P) nelle otto repliche e andamento delle interazioni.

Dati riservati non divulgabili

La ADV cluster della % di superficie fogliare con necrosi (Figura 16) divide i dati in tre *cluster* caratterizzati da un'alta sensibilità alla septoriosi (varietà rosse), una sensibilità intermedia nella parte centrale del grafico (varietà verdi) e una bassa sensibilità (varietà blu). Lo stesso tipo di comportamento viene confermato dalla ADV cluster della % di superficie fogliare con picnidi (Figura 17) dove il *cluster* blu rappresenta le interazioni molto sensibili, il *cluster* rosso le interazioni mediamente sensibili e il *cluster* verde quelle poco sensibili. In entrambi i grafici l'asse delle ordinate esprime la variabilità fra le repliche. L'appartenenza di tutte le combinazioni varietà isolato ai tre cluster espressa con un valore che va da 0 a 1 è riportata nelle tabelle 21 e 22.

In entrambi i grafici nel *cluster* delle interazioni molto sensibili vengono sempre inserite le varietà di frumento duro inoculate con isolati provenienti da frumento duro (Figura 16 *cluster* rosso e 17 *cluster* blu varietà cerchiato). Paragonando i grafici tra loro si può rilevare come quando si analizzano le % di superficie fogliare interessate da picnidi, le varietà di frumento duro inoculate con isolati provenienti da frumento duro vengono inserite anche nel *cluster* delle interazioni mediamente sensibili (Figura 17 *cluster* rosso varietà cerchiato) ma il *cluster* delle interazioni molto sensibili si discosta molto di più dagli altri. La variabilità fra le repliche (asse delle ordinate delle figure 16 e 17) è

maggiore se si analizzano le % di superficie fogliare con necrosi e rappresenta il 10,54% (Figura 16) mentre nella % di superficie fogliare con picnidi rappresenta il 3,8% (Figura 17).



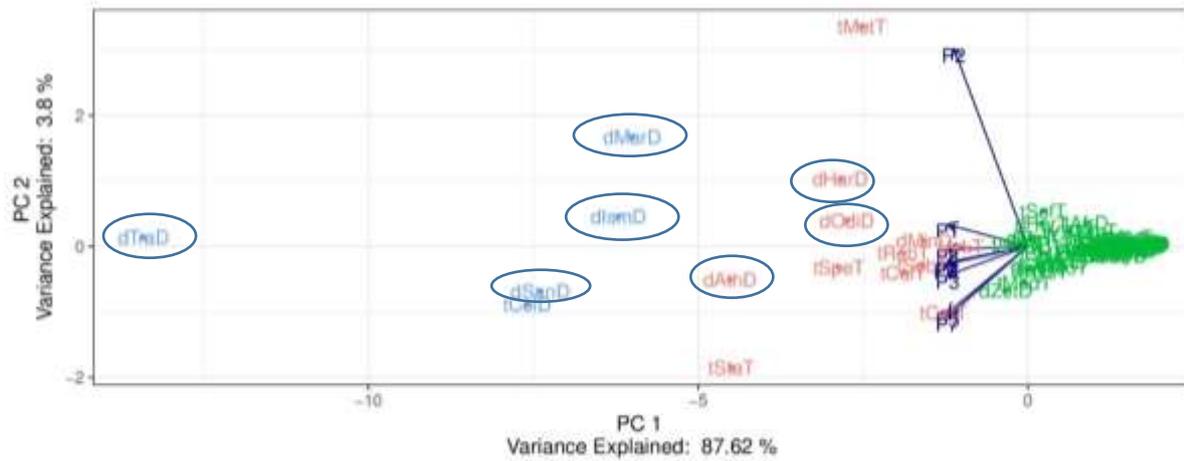
Dati riservati non divulgabili

Fig 16. ADV cluster con un Fuzzy clustering associato a una PCA sulla % di superficie fogliare con necrosi in tutte le combinazioni varietà/ isolato. **Cluster rosso** varietà molto sensibili, **verde** mediamente sensibili, **blu** poco sensibili.

Tab 21. Appartenenza di ogni combinazione varietà di frumento duro (d) o tenero (t)/ isolato proveniente da frumento duro (D) o tenero (T) espressa con un valore da 0 a 1 sulla % di superficie fogliare con necrosi, ai tre cluster. **Rosso** varietà molto sensibili, **verde** mediamente sensibili, **blu** poco sensibili.

Varietà		Cluster				Varietà		Cluster			
		Rosso	Verde	Blu	Finale			Rosso	Verde	Blu	Finale
Athoris	dAthD	0,976	0,02	0,004	Rosso	Basmati	tBasD	0	0,004	0,996	Blu
	dAthT	0,806	0,168	0,027	Rosso		tBasT	0	0,002	0,997	Blu
Haristide	dHarD	0,899	0,09	0,01	Rosso	Birbante	tBirD	0	0,003	0,997	Blu
	dHarT	0,046	0,859	0,095	Verde		tBirT	0,002	0,171	0,827	Blu
Ismur	dIsmD	0,941	0,046	0,013	Rosso	Bologna	tBolD	0	0,004	0,996	Blu
	dIsmT	0,994	0,005	0,001	Rosso		tBolT	0,015	0,945	0,041	Verde
Marco	dMarD	0,996	0,004	0,001	Rosso	Califa	tCalD	0,097	0,851	0,052	Verde
Aurelio	dMarT	0,175	0,733	0,092	Verde	Sur	tCalT	0,013	0,979	0,008	Verde
Minosse	dMinD	0,892	0,092	0,017	Rosso	Catullo	tCatD	0	0,003	0,997	Blu
	dMinT	0,013	0,679	0,308	Verde		tCatT	0,002	0,985	0,013	Verde
Odisseo	dOdiD	0,08	0,902	0,019	Verde	Colombo	tColD	0,995	0,004	0,001	Rosso
	dOdiT	0,001	0,022	0,978	Blu		tColT	0,784	0,194	0,022	Rosso
San Carlo	dSanD	0,997	0,003	0	Rosso	Giorgione	tGioD	0,001	0,013	0,986	Blu
	dSanT	0,199	0,495	0,306	Verde		tGioT	0,002	0,091	0,907	Blu
Solstizio	dSolD	0,003	0,275	0,722	Blu	Hystar	tHysD	0,016	0,952	0,032	Verde
	dSolT	0,002	0,973	0,026	Verde		tHysT	0,005	0,978	0,017	Verde
Trapezio	dTraD	0,942	0,045	0,013	Rosso	Ilaria	tIlaD	0,005	0,986	0,009	Verde
	dTraT	0,012	0,954	0,034	Verde		tIlaT	0,02	0,929	0,051	Verde
Zetae	dZetD	0,087	0,865	0,049	Verde	Metropolis	tMetD	0,001	0,031	0,968	Blu
	dZetT	0,002	0,972	0,025	Verde		tMetT	0,004	0,602	0,394	Verde
ACA 320 D	tACA	0,006	0,468	0,526	Blu	Modern	tModD	0,025	0,905	0,07	Verde
	tACAT	0,006	0,95	0,044	Verde		tModT	0,023	0,886	0,09	Verde
Afrodite	tAfrD	0,808	0,179	0,013	Rosso	Nogal	tNogD	0,021	0,695	0,284	Verde
	tAfrT	0,186	0,725	0,062	Verde		tNogT	0,004	0,082	0,914	Blu
Altamira	tAltmD	0	0,006	0,993	Blu	Rebelde	tRebD	0	0,004	0,996	Blu
	tAltmT	0,007	0,73	0,263	Verde		tRebT	0,012	0,63	0,359	Verde
Altavista	tAltD	0,022	0,546	0,432	Verde	Santorin	tSanD	0,016	0,761	0,223	Verde
	tAltT	0,015	0,945	0,041	Verde		tSanT	0,005	0,849	0,146	Verde
Amburgo	tAmbD	0	0,003	0,997	Blu	Sobred	tSobD	0,023	0,946	0,032	Verde
	tAmbT	0	0,001	0,999	Blu		tSobT	0,171	0,803	0,025	Verde
Angelico	tAngD	0,003	0,114	0,882	Blu	Sofolk	tSofD	0	0,001	0,998	Blu
	tAngT	0,007	0,116	0,877	Blu		tSofT	0,002	0,967	0,031	Verde
Arkeos	tArkD	0	0,003	0,997	Blu	Sperimendale 1660	tSpeD	0,004	0,208	0,787	Blu
	tArkT	0,223	0,736	0,042	Verde		tSpeT	0,022	0,968	0,011	Verde
Asunción	tAsuD	0	0,006	0,994	Blu	Standal	tStad	0,848	0,136	0,015	Rosso
	tAsuT	0,004	0,438	0,558	Blu		tStat	0,982	0,015	0,003	Rosso
Ayrton	tAyrD	0	0,008	0,992	Blu	Teorema	tTeoD	0	0,003	0,997	Blu
	tAyrT	0,01	0,272	0,718	Blu		tTeoT	0	0,001	0,999	Blu

Bagou	tBagD	0	0,004	0,996	Blu	VST 790	tVSTD	0,903	0,088	0,008	Rosso
	tBagT	0,007	0,657	0,336	Verde		tVSTT	0,386	0,585	0,028	Verde



Dati riservati non divulgabili

Fig 17. ADV cluster con un Fuzzy clustering associato a una PCA sulla % di superficie fogliare con picnidi in tutte le combinazioni varietà/ isolato. Cluster **blu** varietà molto sensibili, **rosso** mediamente sensibili, **verde** poco sensibili.

Tab 22. Appartenenza di ogni combinazione varietà di frumento duro (d) o tenero (t)/ isolato proveniente da frumento duro (D) o tenero (T) espressa con un valore da 0 a 1 sulla % di superficie fogliare con picnidi, ai tre cluster. **Blu** varietà molto sensibili, **rosso** mediamente sensibili, **verde** poco sensibili.

Varietà		Cluster				Varietà		Cluster			
		Rosso	Verde	Blu	Finale			Rosso	Verde	Blu	Finale
Athoris	dAthD	0,504	0,049	0,447	Rosso	Basmati	tBasD	0	1	0	Verde
	dAthT	0,002	0,998	0	Verde		tBasT	0	1	0	Verde
Haristide	dHarD	0,945	0,038	0,017	Rosso	Birbante	tBirD	0	0,999	0	Verde
	dHarT	0,039	0,96	0	Verde		tBirT	0	1	0	Verde
Ismur	dIsmD	0,049	0,005	0,947	Blu	Bologna	tBolD	0	0,999	0	Verde
	dIsmT	0,001	0,999	0	Verde		tBolT	0,049	0,951	0	Verde
Marco	dMarD	0,105	0,015	0,88	Blu	Califa	tCalD	0,001	0,999	0	Verde
Aurelio	dMarT	0	1	0	Verde	Sur	tCalT	0,954	0,041	0,005	Rosso
Minosse	dMinD	0,949	0,049	0,002	Rosso	Catullo	tCatD	0	1	0	Verde
	dMinT	0,064	0,935	0,001	Verde		tCatT	0,896	0,101	0,003	Rosso
Odisseo	dOdiD	0,968	0,021	0,011	Rosso	Colombo	tColD	0,002	0	0,997	Blu
	dOdiT	0	0,999	0	Verde		tColT	0,011	0,988	0	Verde
San Carlo	dSanD	0,01	0,002	0,988	Blu	Giorgione	tGioD	0	1	0	Verde
	dSanT	0	1	0	Verde		tGioT	0,144	0,855	0,001	Verde
Solstizio	dSolD	0,081	0,918	0,001	Verde	Hystar	tHysD	0	1	0	Verde
	dSolT	0,003	0,997	0	Verde		tHysT	0,046	0,954	0	Verde
Trapezio	dTraD	0,059	0,021	0,919	Blu	Ilaria	tIlaD	0	1	0	Verde
	dTraT	0,109	0,89	0,001	Verde		tIlaT	0,135	0,864	0,001	Verde
Zetae	dZetD	0,452	0,544	0,003	Verde	Metropolis	tMetD	0	1	0	Verde
	dZetT	0	1	0	Verde		tMetT	0,76	0,174	0,066	Rosso
ACA 320	tACAD	0	1	0	Verde	Modern	tModD	0	1	0	Verde
	tACAT	0,181	0,817	0,002	Verde		tModT	0,298	0,699	0,003	Verde
Afrodite	tAfrD	0,001	0,999	0	Verde	Nogal	tNogD	0	0,999	0	Verde
	tAfrT	0,018	0,981	0	Verde		tNogT	0	0,999	0	Verde
Altamira	tAltmD	0	1	0	Verde	Rebelde	tRebD	0	0,999	0	Verde
	tAltmT	0	1	0	Verde		tRebT	0,997	0,003	0	Rosso
Altavista	tAltD	0	1	0	Verde	Santorin	tSanD	0,06	0,938	0,001	Verde
	tAltT	0,001	0,999	0	Verde		tSanT	0	1	0	Verde
Amburgo	tAmbD	0	0,999	0	Verde	Sobred	tSobD	0	1	0	Verde
	tAmbT	0,002	0,998	0	Verde		tSobT	0,933	0,064	0,002	Rosso
Angelico	tAngD	0	1	0	Verde	Sofolk	tSofD	0,001	0,999	0	Verde
	tAngT	0	1	0	Verde		tSofT	0,132	0,866	0,001	Verde
Arkeos	tArkD	0	0,999	0	Verde	Sperimendale 1660	tSpeD	0	1	0	Verde
	tArkT	0,826	0,172	0,003	Rosso		tSpeT	0,981	0,012	0,006	Rosso
Asuncion	tAsuD	0	0,999	0	Verde	Standal	tStad	0	1	0	Verde
	tAsuT	0,002	0,998	0	Verde		tStat	0,695	0,06	0,245	Rosso
Ayrton	tAyrD	0	0,999	0	Verde	Teorema	tTeoD	0	0,999	0	Verde
	tAyrT	0,024	0,975	0	Verde		tTeoT	0,008	0,992	0	Verde

Bagou	tBagD	0	0,999	0	Verde	VST 790	tVSTD	0	1	0	Verde
	tBagT	0	1	0	Verde		tVSTT	0,016	0,984	0	Verde

Tutte le combinazioni di frumento tenero (t) e duro (d) inoculate con isolati del patogeno provenienti da frumento tenero (T) e duro (D) hanno mostrato differenze statisticamente significative in tutti i gruppi messi a confronto con T di Student per $p=0,05$ sia analizzando le percentuali di superficie fogliare con necrosi (Tabella 23) che con picnidi (Tabella 24).

Tab 23. Mixed Anova sulla % di superficie fogliare con necrosi fra varietà di frumento duro (d) e tenero (t) inoculate con isolati di *Z. tritici* provenienti da frumento duro (D) e tenero (T).

Patogeno isolato da T-D / varietà di frumento t-d	Patogeno isolato da T-D / varietà di frumento t-d	Probabilità (T)
D-d	D-t	<0,0001
D-d	T-d	<0,0001
D-d	T-t	<0,0001
D-t	T-d	<0,0001
D-t	T-t	<0,0001
T-d	T-t	0,0016

Differenze statisticamente significative sono evidenziate da $p \leq 0,05$ (T di Student)

Tab 24. Mixed Anova sulla % di superficie fogliare con picnidi fra varietà di frumento duro (d) e tenero (t) inoculate con isolati di *Z. tritici* provenienti da frumento duro (D) e tenero (T).

Patogeno isolato da T-D / varietà di frumento t-d	Patogeno isolato da T-D / varietà di frumento t-d	Probabilità (p)
D-d	D-t	<0,0001
D-d	T-d	<0,0001
D-d	T-t	<0,0001
D-t	T-d	0,0444
D-t	T-t	<0,0001
T-d	T-t	<0,0001

Differenze statisticamente significative sono evidenziate da $p \leq 0,05$ (T di Student)

3.2) Prova in campo

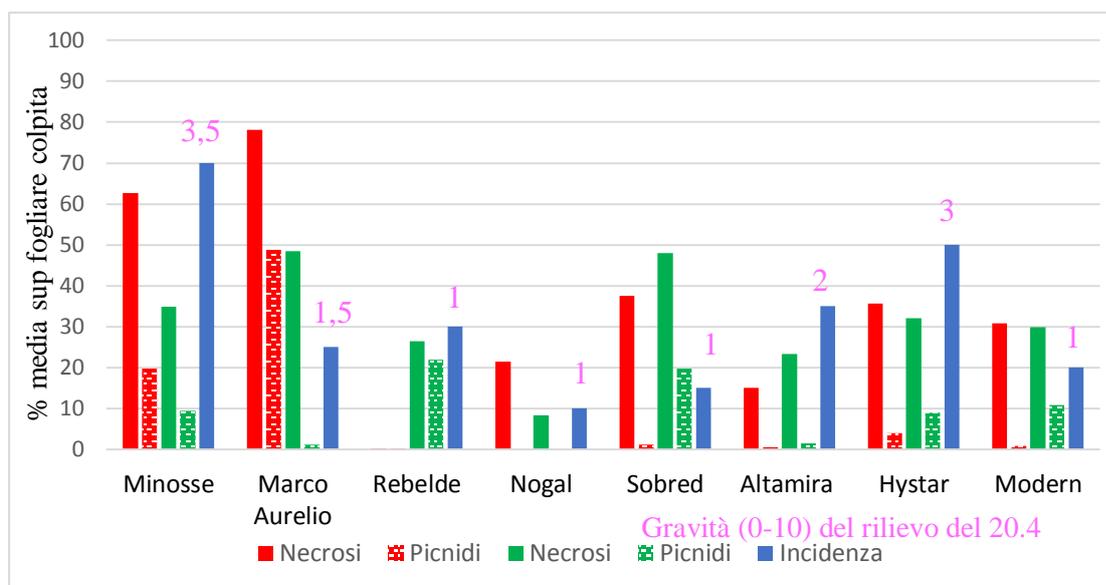
Al primo rilievo le varietà che hanno avuto la gravità più alta sono state Minosse, Hystar e Marco Aurelio, seguite da Rebelde, Nogal, Sobred e Modern ma nessuna di queste è risultata statisticamente differente. L'incidenza più alta si è verificata nelle varietà Minosse e Hystar che si sono differenziate anche a livello statistico. Al secondo rilievo Minosse e Marco Aurelio si sono confermate come le varietà con la gravità maggiore seguite da Hystar, Altamira, Rebelde, Modern, Nogal e Sobred. Tra queste, quella che si è differenziata anche statisticamente è stata Minosse. L'incidenza è stata in tutti i casi maggiore del 70% senza mostrare differenze a livello statistico (Tabella 25).

Tab. 25 Valutazione dell'incidenza e della gravità di *Z. tritici* sulle varietà di frumento duro e tenero presenti in campo. Valori medi di incidenza (%) e gravità (0-10) caratterizzati dalla stessa lettera non sono statisticamente differenti per $p=0,05$ (post-hoc test di Duncan).

Data rilievo		20 aprile		23 maggio	
Tesi	Varietà	Incidenza media (%)	Gravità media	Incidenza media (%)	Gravità media
1	Minosse	70 (e)	3,5 (c)	100 (b)	9 (c)
2	Marco Aurelio	25 (bc)	1,5 (ab)	90 (ab)	5 (b)
3	Rebelde	30 (bc)	1 (a)	90 (ab)	3 (ab)
4	Nogal	10 (a)	1 (a)	70 (a)	2 (a)
5	Sobred	15 (a)	1 (a)	80 (ab)	2 (a)
6	Altamira	35 (c)	2 (abc)	100 (b)	3 (ab)
7	Hystar	50 (d)	3 (bc)	90 (ab)	4 (ab)
8	Modern	20 (ab)	1 (a)	90 (ab)	3 (ab)

Dati riservati non divulgabili

I dati ottenuti in serra sono stati confrontati con quelli rilevati in campo il 20 aprile (Figura 18). È stato scelto il primo rilievo perché al momento del secondo il patogeno aveva raggiunto una incidenza alta e uniforme, rendendo difficile e poco attendibile il confronto. Sia in campo che in serra, Nogal ha dato bassa percentuale di sintomi, incidenza e gravità. Tra i frumenti duri, Minosse è stato quello che ha presentato i valori più alti di tutti i parametri valutati e si è differenziato statisticamente come incidenza nella parcella. Marco Aurelio ha presentato alta sensibilità in serra ma non in campo (Figura 18).



Dati riservati non divulgabili

Fig 18. Confronto tra % di sintomi ottenuti nelle prove in serra e valutazione dell'incidenza (%) e gravità (valore 0-10) riscontrate in campo.

4) Discussioni

I risultati hanno mostrato come le varietà di frumento duro siano più sensibili a tutti gli isolati di *Z. tritici* rispetto alle varietà di frumento tenero (Figura 14D). La specializzazione degli isolati del fungo può essere di vario tipo, sito specifica (Ahamed *et al.*, 1995, Brading *et al.*, 2002), fra varietà e isolato (Chartain *et al.*, 2004, Medini and Hamza, 2008) o nei confronti del frumento tenero e duro (Eyal *et al.*, 1973; Kema *et al.* 1996 a, b; Medini and Hamza, 2008). I dati potrebbero supportare l'ipotesi della specificità degli isolati del patogeno nei confronti del frumento tenero e duro. Questa specificità è stata più marcata nelle varietà di frumento duro infatti, fatta eccezione per Solstizio, quando esse sono state inoculate con isolati provenienti da frumento duro hanno manifestato % di necrosi e picnidi molto alte, mentre quando sono state inoculate con isolati provenienti da frumento tenero la percentuale di necrosi è stata inferiore e i picnidi non hanno mai superato il 15% (Figura 14D). Nelle varietà di frumento tenero la specificità è stata meno evidente e la sensibilità delle varietà al patogeno è stata più bassa nei confronti di tutti gli isolati provati (Figura 14 A-B-C). Questa ipotesi è supportata anche dalla DCA che ha mostrato come l'interazione fra una varietà di frumento duro con un isolato proveniente da frumento duro è stata la più forte, sia quando è stata valutata la % di necrosi che di picnidi ed è stata subito seguita dall'interazione fra una varietà di frumento tenero con un isolato proveniente da frumento tenero (Figura 15 A-B). La

Fuzzy-clustering associata a una PCA, ha inserito nel *cluster* delle interazioni molto sensibili le varietà di frumento duro con gli isolati provenienti da frumento duro sia quando sono state valutate le % di necrosi che di picnidi (Figura 16-17 varietà cerchiata) mentre la mixed Anova ha mostrato differenze statisticamente significative in tutte le combinazioni specie frumento/patogeno messe a confronto (Tabella 23-24). Questi risultati sono preliminari infatti per supportare l'ipotesi della specificità del patogeno a frumento tenero e duro sono necessarie altre indagini con un numero più elevato di isolati di *Z. tritici*. Altri studi attribuiscono in un incrocio fra isolati di *Z. tritici* specializzati, l'abilità della progenie di infettare il frumento duro al gene di avirulenza di *Stb6* (*AvrStb6*) (Ware 2006). Ulteriori indagini, potrebbero chiarire anche nel nostro caso il ruolo di *AvrStb6* nel processo infettivo.

CONCLUSIONI

In questa tesi sono state approfondite le principali strategie per il contenimento di *Z. tritici* che prevedono l'impiego di fungicidi e l'utilizzo di varietà tolleranti.

Nel primo capitolo è stata investigata la sensibilità di isolati italiani del patogeno provenienti da tre tipologie di campi (commerciale, sperimentale, e un campo sensibile di riferimento) alle principali famiglie di fungicidi impiegate nella difesa che sono QoI, DMI e SDHI.

I risultati della sensibilità degli isolati ai QoI mostrano come i valori di DE₅₀ dell'azoxystrobin, degli isolati provenienti dal campo di riferimento per la sensibilità si differenziano statisticamente dai campi sperimentali, inoltre utilizzando la metodologia descritta nel secondo capitolo è emersa una maggiore presenza e frequenza della G143A nei campi sperimentali rispetto a quelli commerciali. Questo evidenzia l'insorgere della resistenza alle strobilurine in Italia, ma dove popolazioni fungine non subiscono o subiscono meno la pressione dei trattamenti si dimostra la presenza di una maggiore sensibilità.

La selezione imposta dall'uso dei fungicidi può localmente manifestarsi con un incremento di cali di efficacia. La scarsa pressione del patogeno sul territorio italiano potrebbe spiegare la contenuta diffusione di cali di efficacia legati all'adozione dei QoI, mentre in Europa la costante presenza del patogeno in ogni stagione ha consentito un'ampia diffusione dei fenomeni di resistenza. Da ciò deriva l'importanza di una adeguata strategia anti resistenza nei campi commerciali seguendo le indicazioni proposte dal FRAC <http://www.frac.info/working-group/qol-fungicides/general-use-recommendations>.

In Europa i DMI hanno un ruolo importante nel controllo della septoriosi ma l'accumulo di mutazioni a livello del gene *CYP51* ha portato a un leggero adattamento delle popolazioni a questa famiglia di prodotti (Chassot *et al.*, 2008, Lucas *et al.*, 2015). I valori di DE₅₀ riportati in questo studio sono simili a quelli delle popolazioni europee e potrebbero riflettere un leggero adattamento degli isolati monoconidici saggiati. Ad avvalorare questa ipotesi è anche l'elevato numero di sostituzioni amminoacidiche riscontrate alcune responsabili di cali di efficacia dei prodotti in esame (I381V nei confronti del tebuconazolo). Nonostante la ridotta sensibilità *in vitro* per alcuni dei

triazoli saggiati (in particolare per il tebuconazolo e prothioconazolo), questi prodotti svolgono ancora un buon controllo in campo nei confronti della septoriosi.

Diversa è la situazione per gli SDHI che essendo prodotti di recente introduzione, in Europa presentano una scarsa presenza di mutazioni e vengono definiti dal FRAC come prodotti che hanno ancora una buona efficacia in campo www.frac.info/docs/default-source/sdhi-wg/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2017-sdhi-meeting-in-december-and-telecon-march-and-june-2018-with-recommendations-for-2018.pdf?sfvrsn=d4ad4b9a_2. In questo studio la sensibilità degli isolati non si è discostata dalla *baseline* proposta da Dooley *et al.*, (2016). Le mutazioni ritrovate negli isolati interessano solo la subunità C della Sdh e non sembrano inficiare la sensibilità a questa famiglia di prodotti. Gli isolati italiani di questa tesi hanno quindi manifestato una elevata sensibilità a tutti gli SDHI saggiati.

Nel secondo capitolo viene proposto per la prima volta un rapido sensibile e accurato protocollo messo a punto in ddPCR in grado di misurare la frequenza allelica della sostituzione G143A responsabile della resistenza alle strobilurine in *Z. tritici*. Sebbene al momento sia un metodo costoso, potrebbe rappresentare una valida alternativa alla qPCR grazie alla sua alta sensibilità, accuratezza e alla possibilità di evitare la costruzione di una curva standard essenziale per la qPCR. Considerando che l'Italia è classificata dal FRAC come un paese con moderato livello di resistenza alle strobilurine (<http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2017-qoi-meeting-updated-in-may-2018-recommendations-for-2018.pdf>), la disponibilità di un protocollo in grado di individuare la mutazione anche a basse percentuali potrebbe aiutare la difesa in campo permettendo l'applicazione delle migliori strategie anti-resistenza. Protocolli simili potrebbero essere sviluppati nei confronti di altre mutazioni causanti resistenza ai fungicidi, sia in *Z. tritici* che in altri patogeni delle piante.

Nel terzo capitolo è stata saggiata la virulenza degli isolati italiani di *Z. tritici* al frumento tenero e duro e la sensibilità di molteplici varietà al patogeno.

Il metodo utilizzato per la valutazione della sensibilità del frumento a *Z. tritici* ha permesso di saggiare molte varietà contemporaneamente con una inoculazione artificiale standardizzata, assicurando le ideali condizioni di sviluppo della malattia.

Confrontando i dati ottenuti dalle prove in serra con quelli delle varietà coltivate in campo sembra esserci corrispondenza fra i risultati anche se non è possibile effettuare un reale confronto a causa delle diverse scale di valutazione della malattia adottate.

I saggi hanno evidenziato la presenza di una specializzazione del patogeno nei confronti del frumento tenero e duro ma ulteriori prove, incrementando il numero di isolati, sono necessarie per confermare il fenomeno e ulteriori test potrebbero chiarire l'eventuale ruolo di *AvrStb6* nel processo infettivo.

Considerando l'assenza di studi scientifici specifici riguardanti il patogeno in Italia le informazioni apportate da questa tesi quali: la conoscenza della sensibilità di popolazioni italiane di *Z. tritici* ai fungicidi, la presenza di specificità degli isolati del patogeno alle due specie di frumento, le sensibilità delle varietà italiane alla septoriosi, possono contribuire sostanzialmente alla gestione pratica di *Z. tritici* in pieno campo.

Bibliografia

- Ahmed HU, Mundt CC and Coakley SM (1995). Host-pathogen relationship of geographically diverse isolates of *Septoria tritici* and wheat cultivars. *Plant Pathol.* 44: 838-847.
- Agrios NG (2004). *Plant Pathology* Fifth edition Elsevier Academic press pp:453.
- Allioui A, Siah A, Brinis L, Reignault P and Halama P (2016). Identifications of QoI fungicide resistant genotypes of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Algeria. *Phytopathol. Mediterr.* 55:89-97.
- Alvisi G, Cristiani C, Ponti D, Betti C and Ferrari A (2014). Grano duro: lotta alla septoriosi, quale strategia di difesa usare. *L'informatore Agrario* 9:20-24.
- Alvisi G, Ponti D, Spagna M, Varotti M, Cristiani C, Antoniaci L and Bugiani R (2018). Strategie di intervento nella difesa dal complesso della septoriosi nel frumento duro. *Atti delle giornate fitopatologiche* 2:611-621.
- Amand O, Calay F, Coquillart L, Legat L, Bodson B, Moreau JM and Maraite H (2003). First detection of resistance to QoI fungicides in *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in Belgium. *Comm App Biol Sci* 68:519-531.
- Anonymous 1986 (1986). Use of Fungicides and Insecticides on Cereals. MAFF Booklet 2257. Alwick UK: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Arraiano LS, Balaam N, Fenwick PM, Chapman C, Feuerhelm D, Howell P, Smith SJ, Widdowson JP and Brown JKM (2009). Contributions of disease resistance and escape to the control of *septoria tritici* blotch of wheat. *Plant Pathol.* 58: 910-922.
- Arraiano LS and Brown JKM (2006). Identification of isolate-specific and partial resistance to *septoria tritici* blotch in 238 European wheat cultivar and breeding lines, *Plant Pathol.* 55:54-61.
- Autori vari (2018). *Manuale dell'agronomo* VI edizione. Reda edizioni per l'agricoltura pp367.
- Banno S, Fukumori F, Ichiishi A, Okada K, Uekusa H, Kimura M and Fujimura M. Genotyping of Benzimidazole-Resistant and Dicarboximide-Resistant Mutations in *Botrytis cinerea* Using real-Time PolymeraseChain Reaction Assay (2008). *Americ Phytopathol Soc* 98: 397-404.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M and Parr-Dobrzanski B (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* 58:649–662.
- Bausche MJ, Mallik I, Yellareddygar SKR and Gudmestad NC. (2018). Spatial and temporal distribution of mutation conferring QOI and SDHI resistance in *alternaria solani* across the United States. *Plant dis.* 102: 349-358.
- Bhathal JS, Loughman R and Speijers J (2003). Yield reduction in wheat in relation to leaf disease from yellow (tan) spot and *septoria nodorum* blotch. *Eur J Plant Pathol* 109:435–443.
- Bhattacharya S (2017). Deadly new wheat disease threatens Europe's crops. *Nature* 542:145-146

Bio-Rad Droplets digital™ PCR Applications guide (2014).
https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf

Blandino M, Mancini MC, Peila P, Pilati A and Reyneri A (2010). Confronto tra strategie di applicazione fungicida per la prevenzione della septoriosi e della fusariosi della spiga del frumento duro coltivato in nord Italia, Atti delle Giornate Fitopatologiche 2: 389-390.

Blaya, J., Lloret, E., Santissima-Trinidad, A. B., Ros, M., and Pascual, J. A. (2016). Molecular methods (digital PCR and real-time PCR) for the quantification of low copy DNA of *Phytophthora nicotianae* in environmental samples. *Pest Manag. Sci.* 72:747-753.

Brading PA, Verstappen ECP, Kema GHJ and Brown JKM (2002). A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici blotch pathogen. *Phytopathol.* 92:439-445.

Briggle, LW (1980). Origin and botany of wheat, In E, E, Häfliger, ed, Wheat documenta cibageigy, pp 6-13, Basle, Switzerland.

Brunner PC, Stefanato FL and McDonald BA (2006). Evolution of the *CYP51* gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Mol Plant Pathol* 9:305–316.

Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P and Saintenac C (2015). Genetic of resistance to Zymoseptoria tritici and applications to wheat breeding. *Fungal genetics and Biology* 79:33-41.

Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Joudrier P, Gautier MP, Cattolico L, Becket M, Aubourg S, Weissenbach J, Caboche M, Bemard M, Leroy P and Chalhou B (2005). Molecular basis of Evolutionary events that shaped the hardness Locus in Diploid and Polyploid wheat species (Triticum and Aegilops). *The plant cell* 17: 1033-1045.

Chartain L, Brading PA, Makepeace JC and Brown JKM (2004). Source of resistance to Septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathol* 53:454-460.

Chassot C, Hugelshofer U, Sietotzki H and Gisi U (2008). Sensitivity of CYP51 Genotypes to DMI Fungicides in *Mycosphaerella graminicola* in : Modern fungicide and antifungal compounds V ed by Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, and Lyr H, BCPC, Alton, UK pp129-136.

Chen W, Wellings C, Chen X, Kang Z and Liu T (2014). Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis* f sp. *tritici*. *Mol Plant Pathol* 15:433-446.

Cools HJ, Bayron C, Atkins S, Lucas JA e Fraaije BA (2012). Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Manag Sci* 68:1034-1040.

Cools HJ and Fraaije BA (2012). Resistance to azole fungicides in European populations of *Mycosphaerella graminicola*: mechanisms and management, in *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp. 64–77.

Cools H J and Fraaije BA (2013). Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella Graminicola* and implications for future control. *Pest Manag Sci* 69:150–155.

- Cools HJ, Mullins JGL, Fraaije BA, Parker JE, Kelly DE, Lucas JA and Kelly SL (2011), Impact of recently emerged Sterol 14 alpha-demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity. *Appl Environ Microbiol* 77:3830–3837.
- Cools HJ, Parker JE, Kelly DE, Lucas JA, Fraaije BA and Kelly SL (2010). Heterologous expression of mutated eburicol 14 α -demethylase(CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. *Appl Environ Microbiol* 76:2866–2872.
- Cook RJ, Hims MJ and Vaughan TB (1999). Effects of fungicide spray timing on winter wheat disease control. *Plant Pathol* 48: 33-50.
- Creissen HE, Glynn E, Spink JH and Kildea S (2018). The effect of fungicide applied pre-stem extension on septoria tritici blotch and yield of winter wheat in Ireland. *Crop prot.*104:7-10.
- Curtis BC (2002). Wheat in the world in Bread wheat improvement and production ed by Curtis BC, Rajaram S, Macphersn MG ISBN 92-5-104809-6.
- Dooley H, Shaw MW, Mehenni-Ciz J, Spink J and Kildea S (2016). Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI-insensitive field isolates carrying the *SdhC*- H152R and *SdhD*-R47W substitutions. *Pest Manag Sci* 72:2203-2207.
- Drabešová J, Ryšánek P, Brunner P, McDonald B A, and Croll, D (2013). Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and quinone outside inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic. *Eur. J. Plant Pathol.* 135:211-224.
- Dufour MC, Fontaine S, Montarry J and Corio-Costet MF (2011). Assesment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erisiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag Sci* 67:60-69.
- Eyal Z (1981) Integrated control of Septoria disease on wheat. *Plant Disease* 65:763-768.
- Eyal Z (1999). The septoria tritici and stagonospora nodorum blotch disease of wheat. *Eur J Plant Pathol* 105:629-641.
- Eyal Z, Amiri Z and Wahl I (1973). Physiologic specialization of Septoria tritici. *Phytophatol* 63:1087-1091.
- Eyal Z, Scharen AL, Huffman MD and Prescott JM (1985). Global Insight into virulence frequencies of *Mycosphaerella graminicola*. The American Phytophatological Society 75: 1456-1462.
- Eyal Z, Scharen AL, Prescott JM and Ginkel MV (1987). The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management, Mexico City, Mexico: CIMMYT.
- Estep LK, Zala M, Anderson NP, Sackett KE, Flowers MD, McDonald BA and Mundt CC, (2013). First report of Resistance to Qoi Fungicides in North American Populations of *Zymoseptoria tritici*, Casula Agent of Septoria Tritici Blotch of Wheat, *Plant disease* 97:1511.

Fakhfakh MM, Rezgui S, M'hedhbi K, Yahyaoui AH, Nasraoui B. (2009) Effect of semiotherapy, fungicide-herbicide mixture foliar treatment, and cropping density on septoria leaf blotch and durum wheat production. *Tunis J Plant Prot* 4:41-55.

FAOSTAT (2019). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> ultimo accesso 30.1.19

Ferjaoui S, Sabei A, Aouadi N and Hazma S (2010). Monogenic Inheritance of resistance to Septoria Tritici Bloch in Durum Wheat 'Agili'. *International Journal of Plant Breeding* 5: 17-20.

Feldman M (1995). Wheats in: Smartt J, Simmonds NW, eds, Evolution of crop plants, Harlow, UK: Longman Scientific and Technical, 185-192.

Felsenstein FG (1999). Mehltauerreger in Getreide können sich schnell anpassen. *Ernährungsdienst* 54:4.

Fletcher JS and Wolfe MS (1981). Insensitivity of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* to triadimefon, triadimenol and other fungicides. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests & Diseases 633 – 640.

Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev. Phytopathol* 9:275-296-

Fones H and Gurr S (2015). The impact of Septoria tritici Bloch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* 79: 3-7.

Fraaije BA, Bayron C, Atkins S, Cools HJ, Lucas JA and Fraaije MW (2012). Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. *Molecular plant pathol*13: 263-275.

Fraaije BA, Butter JA, Coehlo JM, Jones DR and Hollomon DW (2002). Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol.* 51:45–54.

Fraaije BA, Cools JH, Fountaine J, Lovell DJ, Motteram J, West JS and Lucas JA (2005). Role of ascospores in Further spread of Qoi-Resistant Cytochrome *b* alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. *The American Phytopathological society* 8:933-941.

Fraaije BA, Cools HJ, Kim S-H, Motteram J, Clark WS and Lucas JA (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Mol. Plant. Pathol.* 8:245–254.

Fraaije BA, Lucas JA, Clark WS and Burnett FJ (2003). QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK, In: proceedings of the BCPC International Congress, 10–12 November 2003, The British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, UK. *Crop Sci. Technol* 2: 689–694.

FRAC <http://www.frac.info/what-s-new/2018/04/13/minutes-and-recommendations-of-the-sdhi-working-group-are-now-available> ultimo accesso 23.9.18

Friskop A and Liou Z (2016). Fungal Leaf Spot disease of wheat: Tan spot, Septoria /Stagonospora nodorum blotch and Septoria tritici blotch. *Plant disease management* NDSU extension service pp1249.

- Gerdes L, Iwobi A, Busch U and Pecoraro S (2016). Optimization of digital droplet polymerase reaction for quantification of genetically modified organism. *Biomolecular Detection and Quantification* 7:9-20.
- Gisi U, Pavic L, Stanger C, Hugelshofer U and Sierotzki H (2005). Dynamics of *Mycosphaerella graminicola* Populations in Response to selection by different Fungicides. Modern fungicide and antifungal compounds IV ed by Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, and Lyr H, BCPC, Alton, UK pp 89-101.
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibalid A and Gisi U (2006). Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens, *Pest Manag Sci.* 62: 465-472.
- Hamza S, Medini M, Sassi T, Ben Salah, A, Cherif M, Harrabi M. (1999). Pathogenic characterization of *Septoria tritici* variants and polymerase chain reaction assay for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. In: Van Ginkel M., McNab A., Krupinsky J. (eds) A compilation of global research, pp. 26-31. Proceedings of the Fifth International Workshop on Septoria/Stagonospora Diseases of Cereals, CIMMYT, Mexico 1999.
- Heick TM, Justesen AF and Jorgensen LN (2017). Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and Qoi fungicide in the Nordic-Baltic region – a status *Eur J Plant Pathol.* 149: 669-682.
- Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J, Kubista M, Muller RD, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT and Bustin SA (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 59:892-902.
- Huf A, Rehfus A, Lorenz KH, Bryson R, Voegelé RT and Stammler G (2018). Proposal for a new nomenclature for CYP51 haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe. *Plant Pathol* DOI: 10.1111/ppa.12891.
- ISTAT (2018). http://agri.istat.it/sag_is_pdwout/jsp/NewDownload.jsp ultimo accesso 29.10.18
- Jørgensen LN, Hovmøller M S, Hansen J G, Lassen P, Clark B, Bayles R, et al. (2014). IPM Strategies and Their Dilemmas Including an Introduction to www.eurowheat.org. *Journal of Integrative Agriculture* Volume 13 Issue 2: 265-281.
- Karaoglanidis GS, Ionnidis PM and Thanossouloupoulos CC (2000). Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol demethylation inhibiting fungicides. *Plant Pathol.* 49:567 – 572.
- Kema GHJ, Yu DZ, Rijkenberg FHJ, Shaw MW and Baayen RP (1996a). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86:777-786.
- Kema GHJ, Sayound R, Annone JG and Van Silfhout CH (1996b). Genetic variation for virulence and resistance in wheat *Mycosphaerella graminicola* pathosystem 2, Analysis of interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* 86:213-220.
- Kema GHJ, Verstappen ECP and Waalwijk C (2000). Avirulence in the wheat *Septoria tritici* leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* is controlled by a single locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1375-1379.

- Keon J, Antoniw J, Carzaniga R, Deller S, Ward JL, Baker, Beale MH, Hammond-Kosack K and Rudd JJ (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathol* 86: 777-786.
- Kettles JG and Kanyuka K, (2016). Dissecting the molecular interaction between wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci* 7: article 508.
- Köppel R, Bucher T, Bär D, Velsen FV and Ganeshan A (2018). Validation of 13 duplex droplet digital PCR systems for quantitative GMO analysis of most prevalent GMO traits. *Eur Food Res Technol* 244:313-321.
- Koch H, Jeschke A and Becks L (2016). Use of ddPCR in experimental evolution studies. *Methods Ecol Evol* 7:340-351.
- Krenz JE, Sackett KE and Mundt CC, (2008). Specificity of incomplete resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathol* 98:555-561.
- Leath S, Scharen AL, Lund RE and Dietz-Holmes ME (1993). Factors associated with global occurrences of *Septoria nodorum* blotch and *Septoria tritici* blotch of wheat. *Plant Dis.* 77:1266-1270.
- Leroux P, Albertini C, Gautier A, Gredt M and Walker AS (2007). Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 63:688-698.
- Leroux P and Walker AS (2011). Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest manag Sci* 67: 44-59.
- Leonard WH and Martin JH (1963). *Cereal crops*, New York, NY, USA, MacMillan Publishing.
- Lucas JA, Hawkins NJ and Fraaije BA (2015). The evolution of fungicide resistance. In: Sariaslani S, Gadd GM, eds. *Adv Applied Microbiol* 90:29-92.
- Luo CX, Hu M, Luo CX, Hu MJ, Jin X, Bryson PK and Schnabel G (2010). Evidence for the unlikely development of the QoI fungicide resistance-related G143A mutation in the Cyt b gene of *Monilinia fructicola*. *Pest Manag Sci* 66:1308–1315.
- Ma Z, Proffer TJ, Jacobs JL and Sundin GW (2006). Overexpression of the 14-Demethylase Target Gene (CYP51) Mediates Fungicide Resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Enviornmen Microbiol* 72:2581-2585.
- Malandrakis AA, Apostolidou ZA, Louka D, Markoglou A and Flouri F (2018). Biological and molecular characterization of field isolates of *Alternaria alternata* with single or double resistance to respiratory complex II and III inhibitors. *Eur. J. Plant. Pathol.* 152:199-211.
- Matsuoka Y (2011). Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant Cell Physiol* 52(5):750-764.
- McCartney C, Mercer PC, Cooke LR and Fraaije BA (2007). Effect of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in northern Ireland. *Crop prot* 26: 272-1280.

- Medini M and Hamza S (2008). Pathotype and molecular characterization of *Mycosphaerella graminicola* isolates collected from Tunisia, Algeria and Canada. *J of plant pathol* 90:65-73.
- Miessner S, Mann W and Stammler G (2011). *Guignardia bidwellii*, the causal agent of black rot on grapevine has a low risk for QoI resistance. *J. Plant Dis. Prot* 118:51-53.
- Miessner S, and Stammler G (2010). *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. *J. Plant Dis. Prot.* 117:162-167.
- Mundt CC (2014). Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests, *Infections, Genetics and evolutions. Infect genet evolution* 27: 446-455.
- Nikou D, Malandrakis A, Konstantakaki M, Vontas J, Markoglou A, and Ziogas B (2009). Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylase-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. *Pest Biochem Physiol* 95:18-27.
- Omrane S, Audéon C, Ignace A, Duplaix C, Aouini L, Kema G, Walker AS and Fillinger S (2017). Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *American Society for Microbiology.* 2:e00393–17.
- Pascale M, Botticello A, Pancaldi D, Perrone G and Visconti A (2002). Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental field in different Italian regions. *Petria* 12:123-129.
- Pasquini M and Delogu G (2003). Malattie dei cereali a paglia manuale per la diagnosi delle principali patologie e per il riconoscimento dei relativi agenti patogeni. Istituto sperimentale per la cerealicoltura pp22.
- Pasquini M, Iori A, Sereni I, Casini F, L'Aurora A, Matere A, Nocente F, Gazza L, Siniscalco A, Codianni P, Matteu L, Preiti G, Raimondo I, Randazzo B, Liciardello S, Mameli L, Bersani E, Padovan S, Viola P and Notario T (2006) Poche malattie fungine quest'anno sui frumenti. *L'informatore Agrario* 38:64-70.
- Pasquini M, Iori A, Nocente F, Sereni L, Cacciatori P, Cristofori C, Caprara F, Codianni P, Licciardello S, Martelli M, Notario T, Petrini A, Podda E, Randazzo B, and Viola P. (2015). Sensibilità dei frumenti alle principali malattie fungine. *L'informatore agrario* 39: 42-46.
- Paternò A, Verginelli D, Bonini P, Misto M, Quarchioni C, Dainese E, Peddis S, Fusco C, Vanciguerra D and Marchesi U (2018). In-House validation and comparison of two Wheat (*Triticum aestivum*) Taxon-Specific Real-time PCR Methods for GMO Quantification Supported by Droplet Digital PCR. *Food Anal Methods* 11:1281-1290.
- Percival J (1921). The wheat plant, A monograph, New York, NY, USA, E:P: Dutton & Company.
- Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S and Emslie KR (2012). Evaluation of droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Anal chem* 84:1003-1011.
- Ponomarenko A, Goodwin SB and Kema GHJ (2011). Septoria tritici blotch (STB) on wheat *Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2011-0407-01.

- Ponti D, Alvisi G, Spagna M, Varotti M, Cristiani C, Antoniaci L e Bugiani R (2018), Complesso della septoriosi su grano duro, come contenerla. *L'Informatore Agrario* 16:77-80.
- Prodi A, Purahong W, Tonti S, Salomoni D, Nipoti P, Covarelli L and Pisi A (2011). Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in Northern-Central Italy, *J, Plant Pathol* 27:354–356.
- Rehfus A, Strobel D, Bryson R and Stammler G (2018). Mutations in *sdh* genes in field isolates of *Zymoseptoria tritici* and impact on the sensitivity to various succinate dehydrogenase inhibitors. *Plant Pathol* 67:175-180.
- Ronis A, Jørgensen LN, Semaškienė R, Gaurilčikienė I and Ramanuskienė J (2014). Sensitivity of *Mychosphaerella graminicola* isolates to demethylation-inhibiting (DMI) fungicides. *Zemdirbyste-Agriculture* 101:177-184.
- Russell PE (2005). A century of fungicide evolution. *J Agricul Sci* 143:11-25.
- Sánchez-Vallet A, McDonald MC, Solomon PS, McDonald BA (2015). Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biol* 79: 29-32.
- Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, Cowen S, Scott DJ and Foy CA (2011). Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification. *Anal chem* 83:6474-6484.
- Sanderson FR, Scharen AL and Scott PR, (1985). Source and importance of primary infection and identities of associated propagules, Vol12 Bozeman MT, USDA-ARS Publ.
- Scalliet G, Bowler j, Luksch T, Kirchhofer-Allan L, Steinhauer D, ward K, niklaus M, Verras A, Csukai M, Daina A and Fonnè-Pfister R (2012). Mutagenesis and Functional Studies with Succinate dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plos One* 7: 1-20
- Schnabel G and Jones AL (2001). The 14 alpha-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathol* 91:102-110.
- Shaw MW (1999). Populations dynamics of Septoria in the crop ecosystem. In:Lucas JA, Bowyer P and Anderson HM (eds) *Septoria on cereals: A study of Pathosistems* pp82-95 CABI Publishing Oxon UK.
- Shewry PR (2009) Darwin review: wheat. *Journal of Experimental Botany* 60: 1537–1553.
- Siah A, Deweer C, Morand E, Reignault PH and Halama P (2010). Azoxystrobin resistance of French *Mychosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protec* 29:737-743.
- Siah A, Elbekali AY, Ramdani A, Torriani SFF and Brunner PC (2014). Qoi Resistance and Mitochondrial Genetic Structure of *Zymoseptoria tritici* in Marocco *Plant disease* 98: 1138-1144.
- Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S and Gisi U (2000). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cyto- chrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field iso- lates. *Pest Manag Sci* 56:833–841.

- Sierotzki H and Scalliet G (2013). A review of current knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. *The American Phytopathological Society* 103:880-887.
- Skinner W, Bailey A, Renwick A, Keon J, Gurr S and Hargreaves J (1998). A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Curr Genet.* 34:393-398.
- Spolti P, Ponte E M del, Dong, Y H, Cummings JA, Bergstrom GC and del Ponte E M (2014). Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Disease* 98:607-613.
- Stammler G and Semar M, (2011). Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMIs across Europe and impact on field performance. *Bull.OEPP/EPPO Bull.* 41:149-155.
- Stammler G, Carstensen M, Koch A, Semar M, Strobel D and Schlehuber S (2008). Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy. *Crop Protection* 27:1448-1456.
- Stammler G, Glättli A, Koch A and Schlehuber S (2011). Mutations in the Target Protein Conferring Resistance to SDHI Fungicides in : Modern fungicide and antifungal compounds V ed by Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, and Lyr H, BCPC, Alton, UK pp195-198.
- Stammler G, Taher K, Koch A, Haber J, Liebmann B, Bougila A, Yahyaoui A and Nasraoui B (2012). Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates from Tunisia to epoxiconazole and pyraclostrobin. *Crop protection* 34: 32-36.
- Stergiopoulos I, Van Nesterloooy JGM, Kema GHJ and A De Waard M (2003). Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 59:1333-1343.
- Stevanato P and Biscarini F (2016). Digital PCR as New Approach to SNP Genotyping in Sugar Beet. *Sugar Tech* 18:429-432.
- Stewart TM, Perry AJ and Evans MJ (2014). Resistance of *Zymoseptoria tritici* to azoxystrobin and epoxiconazole in the lower North Island of New Zealand. *Plant Prot* 67: 304-313.
- Stukenbrock EH, Jørgensen FG, Zala M, Hansen TT, McDonald BA and Schierup MH (2010). Whole genome and chromosome evolution associated with host adaptation and speciation of wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plos Genetics* Volume 6 Issue 12.
- Taher K, Graf S, Fakhfakh MM, Salah HBH, Yahyaoui A, Rezgui S, Nasraoui B and Stammler G. (2014). Sensitivity of *Zymoseptoria tritici* isolates from Tunisia to Pyraclostrobin, Fluxapyroxad, Epoxiconazole, Metconazole, Prochloraz and Tebuconazole. *J. Phytopathol* 162: 442-448.

- Tonti S, Alvisi G, Pisi A, Nipoti P and Prodi A (2019). DNA Quantification to Assess *Zymoseptoria tritici* on a Susceptible Cultivar of Durum Wheat to Establish the Best Timing for Fungicide Application in an Italian Environment. DOI: 10.1556/0806.
- Torriani SFF, Brunner PC, McDonald BA and Sierotzki H (2009). QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 65:155-162
- Torriani SFF, James PEM, Mills C, Pain N, Sierotzki H and Courbot M (2015). *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal genet biol* 79: 8-12.
- Tripodi G (2010). Introduzione alla botanica sistematica. Prima edizione EdiSES pp153-156.
- Turan C and Nanni IM (2016). First report to QoI Resistance in *Venturia inaequalis* Causing Apple Scab in Apple Orchards in Turkey. *Plant disease* 100:1016
- Ulrich JT and Mathre DE (1972). Mode of action of oxathiin systemic fungicides, V, Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* 110:628-632.
- Walker AS, Gredt M and Leroux P (2010). Evolution of Resistance to Fungicides in Populations of *Mycosphaerella graminicola*: Emergence of New Phenotypes Highly Resistant to DMIs. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI*, ed. by Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russell PE and Lyr H, BCPC, Alton, Hants, UK, pp 223–229.
- Wang M, Yang J, Gai Z, Huo S, Zhu J, Li J, Wang R, Xing S, Shi G, Shi F and Zhang L (2018). Comparison between digital PCR and real- time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *Int J Food Microbiol* 266:251-256.
- Ware SB (2006). Aspects of sexual Reproduction in *Mycosphaerella* Species on Wheat and Barley: Genetic Studies on Specificity, Mapping, and Fungicide Resistance, PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands pp101-122.
- Yamashita M and Fraaija B (2018). Non- target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Manag Sci* 74:672-681.
- Zheng D, Olaya G and Köller W (2000). Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Curr Genet* 38:148–155.
- Zulak KG, Cox BA, Tucker MA, Oliver RP and Lopez-Ruiz FJ (2018). Improve Detection and Monitoring of fungicide resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* With High- Throughput Genotype Quantification by Digital PCR. *Front Microbiol* 9: 706.

RINGRAZIAMENTI

Il raggiungimento di questo traguardo rappresenta per me una tappa molto importante. In questi tre anni ho avuto modo di crescere molto, viaggiare e mettermi alla prova in molte occasioni.

Desidero ringraziare la Dott.ssa Marina Collina per essere stata il mio tutor in questa avventura e per l'aiuto fornito nella stesura della tesi.

Ringrazio il Dott. Stefano Torriani per la sua collaborazione, per l'ospitalità e la disponibilità che ha mostrato sia a Stein sia in Italia al mio rientro.

Ringrazio il Dott. Antonio Prodi per essere stato il mio correlatore e avermi fornito supporto nelle prove in serra.

Ringrazio Katia Gazzetti per la sua collaborazione, la sua amicizia e per avermi supportato nei momenti di sconforto.

Ringrazio i mie colleghi Agnese Ghetti, Selene Burgio e Michela Taccioli, Sandra Rosati e Lorenzo Santarcangelo, Massimiliano Menghini, Irene Maja Nanni per l'aiuto che mi hanno fornito, per le risate e le chiacchiere spensierate fatte in ufficio.

Ringrazio la mia famiglia per il sostegno morale e per l'incoraggiamento che mi hanno dato in questo percorso.

Infine, ma non per questo meno importante, vorrei ringraziare Matteo Sambri per essere sempre presente, per aver sopportato i miei momenti di nervosismo e per avermi consolato in quelli di sconforto.