



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI AGRARIA

## Il monitoraggio di individui resistenti agli agrofarmaci



*Annamaria Vercesi*  
*Di.Pro.Ve, Facoltà di Agraria*  
*Università degli Studi di Milano*



## Resistenza

1: the naturally occurring, inheritable adjustment in the ability of individuals in a population to survive a plant protection product treatment that would normally give effective control (EPPO, PP 1/213)

2: decreased sensitivity of an isolate of a particular pathogen species against a particular inhibitor (Sierotzki and Gisi , 2007)

La resistenza di cui al punto 1 è associata al prevalere di individui dotati delle caratteristiche di cui al punto 2 nella popolazione del patogeno





## Il monitoraggio di individui resistenti agli agrofarmaci

---

due scopi (EPPO):

*1. prima della messa in commercio*, definizione della 'baseline' che consiste in un profilo della sensibilità del fungo bersaglio nei confronti della s.a., messo a punto utilizzando metodi biologici e/o molecolari per valutare la risposta di individui or popolazioni precedentemente mai esposti alla molecola in oggetto (necessaria per la registrazione)

*2. dopo la messa in commercio*, per verificare l'efficacia delle misure adottate per scongiurare la selezione e la diffusione di individui resistenti e la ragione di perdite di efficacia in campo lamentate dai coltivatori





## Il monitoraggio di individui resistenti agli agrofarmaci

---

definizione della 'baseline' di fondamentale importanza per:

- 1.valutare la distribuzione della sensibilità nella popolazione dell'organismo bersaglio
- 2.individuare mediante monitoraggi successivi eventuali scostamenti dalla baseline stessa

assenza di baseline per moltissime s.a.

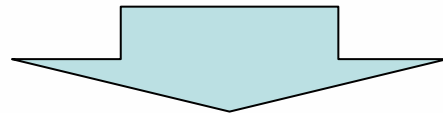




## Il monitoraggio di individui resistenti agli agrofarmaci

Sensitivity monitoring *i.e.* the *continuing observation of field performance and/or evaluation of the sensitivity of target organisms* is imperative to the management of resistance...

The monitoring should be a *continuous process*, conducted in representative commercial crops with different cultural conditions and in areas of intensive use of the product. A sufficient number of populations should be sampled in order to determine the distribution of practical resistance (EPPO, PP 1/213 (2))



svincolare monitoraggio dalla 'practical resistance'?





### Ampiezza del monitoraggio

Aspetto molto controverso

*baseline*: aree nelle quali si intende utilizzare la s.a. ed è maggiormente presente l'organismo bersaglio

*monitoraggio successivo*: aree caratterizzate da diverse condizioni colturali nelle quali la s.a. viene usata intensamente

n.b.: meglio fare riferimento alla classe di appartenenza alla s.a., o meglio ancora al meccanismo d'azione

quanti siti nei quali effettuare i prelievi



## Modalità di raccolta campioni

scopo: individuare la variabilità della popolazione

opportunità di definire la modalità con la quale i campioni vanno raccolti in ogni sito di prelievo e di quanti piante/organi infetti deve consistere il campione

% PROBABILITY OF DETECTING AT LEAST 1 RESISTANT ISOLATE IN THE SAMPLE SIZE GIVEN

True Frequency Of Resistance In The Population					
	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2
Sample Size					
5			23	41	67
10	1	10	40	65	89
15			54	79	97
20	2	18	64	88	99
25	3	22	72	93	
50	5	39	92	99.5	
75	7	53	98		
100	10	63	99.5		
150	14	78			
200	18	87			
500	40	99.4			
750	53				
1000	64				
1500	78				
2000	87				

Un numero eccessivo di campioni può essere inutile ai fini del monitoraggio

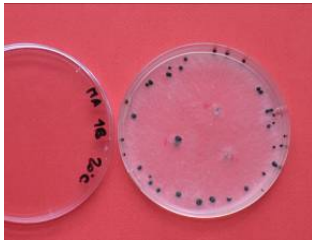




# Il monitoraggio di individui resistenti agli agrofarmaci

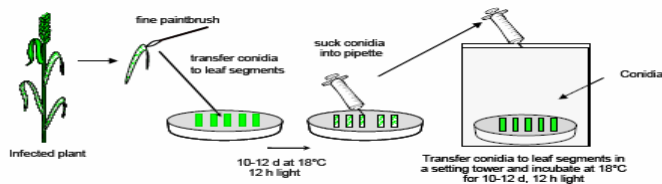
## Metodi di monitoraggio

*In vitro*: germinazione delle spore; crescita del micelio



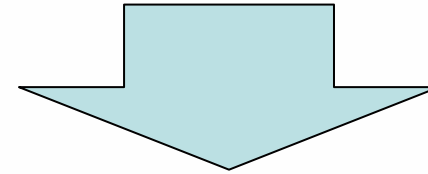
*Es. Botrytis cinerea*

*In vivo*: parassiti obbligati

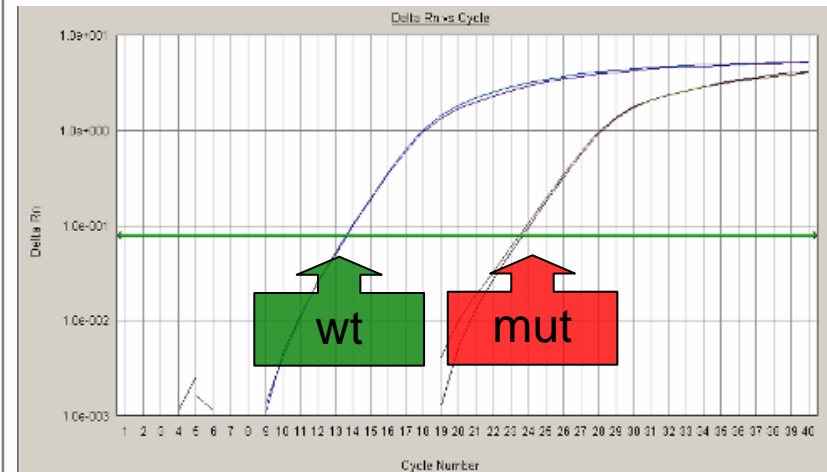


*Es. Erysiphe graminis*

Quantificazione della mutazione associata alla resistenza mediante PCR



Solo per resistenze di tipo qualitativo







## Il monitoraggio di individui resistenti agli agrofarmaci

*Saggi biologici* effettuati su

1. *isolati monosporiali*: laboriosi, specie se riguardano parassiti obbligati, basati su almeno 20 isolati per luogo di campionamento

2. *miscele di spore/miceli*: più semplici, ma meno accurati, incapaci di fornire la proporzione di individui resistenti nell'ambito della popolazione indagata che non di rado è sovrastimata, da cui la necessità di effettuare una serie di ripetizioni

opportunità di definire la modalità con la quale effettuare i saggi





## Il monitoraggio di individui resistenti agli agrofarmaci

*Saggi molecolari* effettuati:

1. su DNA direttamente estratto o da sporulazione del patogeno o da tessuti infetti
2. su un numero elevato di campioni individuando 1 ceppo mutato: 10.000 sensibili

MA E' NECESSARIO CONOSCERE:

1. il meccanismo d'azione
2. la proteina bersaglio
3. la mutazione che conferisce resistenza senza compromettere la fitness

opportunità di definire la modalità con la quale effettuare i saggi





## Metodo di codifica dei risultati

identificato per ogni possibile effetto che la s.a. può avere sull'individuo bersaglio

## Metodo di elaborazione dei risultati

1.  $EC_{50}$ ,  $EC_{90}$  e/o MIC
2. % di individui in grado di svilupparsi a dosi superiori a quella ritenuta discriminante
3. frequenza del gene mutato nella popolazione saggiata

