

MONITORAGGIO DEI MECCANISMI DI RESISTENZA A NEONICOTINOIDI E PIRETROIDI NELL'AFIDE VERDE DEL PESCO IN EMILIA ROMAGNA (2012-13)

M. PANINI¹, D. DRADI², G. MARANI³, A. BUTTURINI⁴, M. ANACLERIO¹,
V. PUGGIONI¹, E. MAZZONI¹

¹ Istituto di Entomologia e Patologia vegetale – Università Cattolica del Sacro Cuore
Via Emilia parmense, 84, 29122 Piacenza

² Astra Innovazione – Via Tebano, 45, 48018 Faenza (RA)

³ Agrisol – Via Antiche Terme, 7, 48012 Bagnacavallo (RA)

⁴ Servizio Fitosanitario Regione Emilia Romagna – Via Di Saliceto, 81, 40128 Bologna
emanuele.mazzoni@unicatt.it

RIASSUNTO

Gli insetticidi neonicotinoidi sono un componente essenziale delle strategie di difesa contro *Myzus persicae*, una specie chiave per i pescheti italiani e per molte colture erbacee. Il lavoro evidenzia la situazione attuale della diffusione in Emilia-Romagna delle principali mutazioni “target site” responsabili della resistenza a neonicotinoidi, piretroidi e dimetilcarbammati. La resistenza target-site ai neonicotinoidi è molto diffusa negli afidi raccolti nei pescheti, ma è stata trovata anche in afidi raccolti da colture erbacee evidenziando la possibilità che gli afidi resistenti, migrando sugli ospiti secondari, possono influenzare le strategie di difesa fitosanitaria. Le mutazioni L1014F (*kdr*) e M918T (*s-kdr*) nella sequenza del canale del sodio sono presenti nella quasi totalità delle popolazioni. La presenza di acetilcolinesterasi insensibile ai dimetilcarbammati è stata individuata in meno del 25% dei casi analizzati. Questi dati descrivono una situazione preoccupante che deve essere controllata per evitare trattamenti inefficaci e per fornire informazioni utili alla definizione di opportune strategie antiresistenza.

Parole chiave: *Myzus persicae*, resistenza *target-site*, R81T, *kdr*, *s-kdr*, MACE, PASA-PCR

SUMMARY

MONITORING THE RESISTANCE MECHANISMS TO NEONICOTINOIDS AND PYRETHROIDS IN THE GREEN PEACH APHID IN EMILIA ROMAGNA (2012-13)

Neonicotinoid insecticides are an important component of control strategies against *Myzus persicae*, a key pest in Italian peach orchards and in many horticultural crops. This paper points out the current status of the main target-site mutations associated to neonicotinoid, pyrethroid and dimethylcarbamate insecticide resistance in Emilia-Romagna. Target-site resistance to neonicotinoids is very common in aphids from peach orchards, but it is also present in samples collected from herbaceous crops, underlying that resistant aphids, moving to secondary hosts, can affect any neonicotinoid-based management strategies. L1014F (*kdr*) and M918T (*s-kdr*) mutations in the voltage sodium channel are present in almost all of the samples collected. Acetylcholinesterase insensitivity to dimethylcarbamates was found in less than 25% of analyzed cases. Our data describe a worrying situation that must be monitored, in order to avoid ineffective insecticide applications and to provide correct information to support coordinated control strategies regarding resistance management.

Keywords: *Myzus persicae*, target-site resistance, R81T, *kdr*, *s-kdr*, MACE, PASA-PCR

INTRODUZIONE

Negli anni recenti la difesa del pesco contro l'afide verde *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) ha fatto grande affidamento sugli insetticidi della classe dei

neonicotinoidi (modalità d'azione IRAC 4A – agonisti del recettore nicotinic dell'acetilcolina - nAChR). Fin dalla loro introduzione questi insetticidi hanno rappresentato una valida alternativa ai vecchi prodotti, dimostrando di essere un utile supporto alle strategie di lotta integrata e contribuendo contemporaneamente anche alla gestione della resistenza, le cui problematiche hanno subito un'evoluzione nel corso degli anni (Elbert *et al.*, 1996; Cravedi & Mazzoni, 2004; Jeschke & Nauen, 2008). I primi rapporti di resistenza agli insetticidi hanno riguardato esteri fosforici e carbammati (Cravedi *et al.*, 1991; Mazzoni & Cravedi, 2002), per poi passare ai piretroidi, nonostante un loro uso molto limitato in agricoltura integrata (Criniti *et al.*, 2008). Dal 2010 hanno iniziato a emergere difficoltà di controllo anche in alcune popolazioni trattate con i neonicotinoidi e nel 2011 è stata confermata, anche in Italia, la presenza di una mutazione del recettore nicotinic (R81T) in grado di conferire una specifica resistenza (resistenza “target-site”) a questa classe di insetticidi (Bass *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2012). A partire dalla primavera del 2012, in seguito ai numerosi casi di mancata efficacia dei trattamenti contro *M. persicae* registrati nel corso della precedente stagione, il Servizio Fitosanitario della Regione Emilia Romagna e l'Istituto di Entomologia e Patologia vegetale dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, in collaborazione con i tecnici di varie cooperative, hanno avviato un programma di monitoraggio dei principali meccanismi di resistenza diffusi nelle popolazioni emiliano romagnole dell'afide.

Lo scopo del lavoro è quindi quello di raccogliere informazioni sulla diffusione sul territorio della regione Emilia-Romagna delle mutazioni “target-site” legate alla resistenza a neonicotinoidi, piretroidi e dimetilcarbammati.

MATERIALI E METODI

Campionamenti

Le popolazioni di *M. persicae* studiate sono state raccolte dalla primavera all'autunno 2012 (n=45) e 2013 (n=17). Nel 2012 gli individui sono stati raccolti da colonie di virginogenie, prelevando in modo casuale esemplari adulti che sono stati conservati in acetone a -20 °C fino al momento dell'analisi; nel 2013 la raccolta è stata estesa anche alle uova e alle fondatrici. La maggior parte degli afidi è stata raccolta da pesco, ma, quando disponibili sono stati campionati anche esemplari da colture erbacee quali melanzana (n=2) e peperone (n=1).

Nel corso dei due anni di ricerca sono stati sottoposti ad analisi quasi 800 individui: 422 nel 2012 e 376 nel 2013. Nel 2012 la raccolta degli afidi è stata effettuata prevalentemente in aziende o in frutteti ove si erano verificate situazioni di scarsa efficacia degli interventi insetticidi. Nel 2013 la raccolta dei campioni è stata estesa anche alle popolazioni svernanti, prelevando le fondatrici da germogli di pesco raccolti alla fine dell'inverno, almeno in parte, dagli appezzamenti in cui nell'anno precedente si erano riscontrati i problemi maggiori.

La ripartizione per provincia, ospite e anno di raccolta delle popolazioni studiate è riportata nella tabella seguente (Tabella 1).

Tabella 1. Ripartizione per provincia, ospite e anno delle popolazioni di *M. persicae* analizzate

Provincia	Ospite	2012	2013
Bologna	Pesco	8	3
Forlì Cesena	Pesco	16	10
	Melanzana	2	
	Peperone	1	1
Ravenna	Pesco	17	3
Rimini	Pesco	1	

Analisi molecolari

Il DNA è stato estratto da singoli esemplari con una tecnica di “salting-out” descritta da Guillemaud *et al.* (2003) e modificata da Panini *et al.* (2013). Ogni afide è stato omogenizzato in un QIAGEN TissueLyser in 300 µL di TNES buffer pH 7,5 (50 mM Tris, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0,5% SDS) con l'aggiunta di proteinasi K (100 µg mL⁻¹). L'omogenato è stato scaldato per 1 h a 55 °C e le proteine precipitate con 85 µL di NaCl 5 M e centrifugate a 16000 g per 5'. Il DNA è stato poi isolato dal surnatante con precipitazione in etanolo. Per ogni popolazione è stato estratto il DNA di 5-10 individui. La presenza delle mutazioni puntiformi è stata evidenziata per mezzo di una PCR allele specifica. Questa tecnica utilizza contemporaneamente 4 differenti primers: 2 esterni, che amplificano il tratto di DNA contenente la mutazione di interesse, e 2 interni che consentono di amplificare in modo specifico solo l'allele resistente o sensibile. I frammenti prodotti consentono di distinguere i genotipi omozigoti dagli eterozigoti (Liu *et al.*, 1997). Le sequenze dei primers e le condizioni di amplificazione utilizzate sono quelle riportate in Panini *et al.* (2013). Parte dei campioni raccolti nel 2013 sono stati analizzati mediante pirosequenziamento.

Le mutazioni cercate erano quelle legate alla resistenza ai neonicotinoidi (mutazione R81T nella sequenza del recettore nicotinic), ai piretroidi (mutazioni *kdr* e *s-kdr*: L1014F e M918T nella sequenza del canale del sodio) e ai dimetilcarbammati (mutazione S431F nella sequenza dell'acetilcolinesterasi)

RISULTATI E DISCUSSIONE

La mutazione R81T, che nel 2012 era presente nel 70% circa degli individui analizzati, nel 2013 è stata trovata nel 42,6% degli esemplari. La differenza maggiore è stata a carico degli individui omozigoti resistenti (39% nel 2012 e 15,7% nel 2013), mentre la percentuale degli eterozigoti si è mantenuta costante (Figura 1). La mutazione è stata individuata in popolazioni raccolte in provincia di Bologna, Ravenna, Forlì-Cesena e Rimini. Non sono disponibili dati dalla provincia di Ferrara.

Contrariamente a quanto noto dalla letteratura (Slater *et al.*, 2012; Anonymous, 2012), per la prima volta è stata dimostrata la presenza della mutazione legata alla resistenza ai neonicotinoidi in esemplari raccolti da ospiti erbacei, precisamente in una popolazione proveniente da melanzana e una da peperone. In entrambi i casi, la mutazione R81T era presente in tutti gli individui analizzati, con un'elevata percentuale di individui omozigoti: 100% nei campioni da melanzana (n = 6) e 80% in quelli da peperone (n=5) (Panini *et al.*, 2013). Nel 2013, in un'altra popolazione raccolta in provincia di Forlì, sempre da peperone, le percentuali di omozigoti resistenti o di eterozigoti erano entrambe del 25% (n= 12).

La ricerca delle mutazioni legate alla resistenza ai piretroidi ha evidenziato una pressoché totale presenza delle due principali mutazioni target-site L1014F (knock-down resistance : *kdr*) e M918T (super-*kdr*: *s-kdr*).

La mutazione L1014F (*kdr*) è stata trovata nel 98,8% degli individui analizzati nel 2012 e nel 97,4% di quelli analizzati nel 2013. Nonostante una lieve riduzione della presenza del *kdr*, i dati mostrano un considerevole incremento del numero di individui omozigoti resistenti (Figura 2).

La mutazione M918T (*s-kdr*) è presente in circa il 97% dei casi nel 2012, per poi scendere a circa l'83% nel 2013. Parallelamente a questa riduzione è stato osservato un incremento nella percentuale di individui “wild-type”, mentre la percentuale di eterozigoti è rimasta costante (Figura 3).

Nel 2013 è stata eseguita anche la ricerca della mutazione S431F nel gene dell'acetilcolinesterasi legata alla resistenza a pirimicarb. L'analisi è stata eseguita su 48 esemplari. Il 25% degli afidi analizzati è risultato portatore della mutazione (10% in omozigosi e 15% in eterozigosi).

Figura 1. Genotipizzazione degli individui di *M. persicae* analizzati nel 2012 e 2013 per la mutazione R81T del recettore nicotinico, responsabile della resistenza ai neonicotinoidi

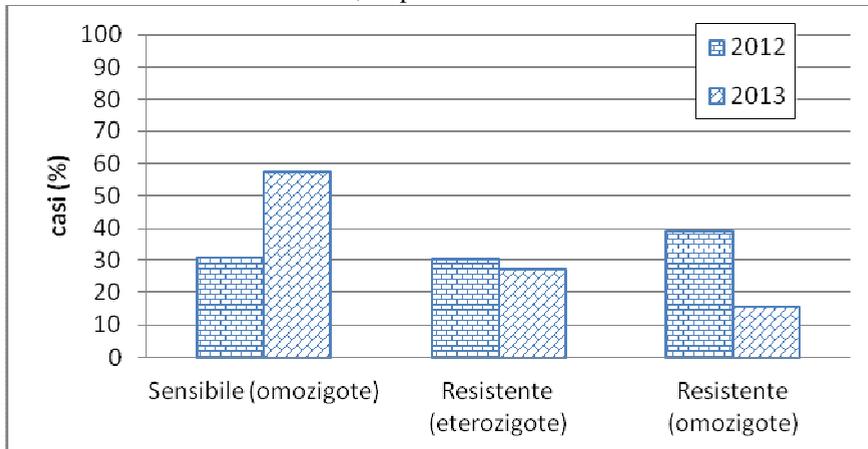
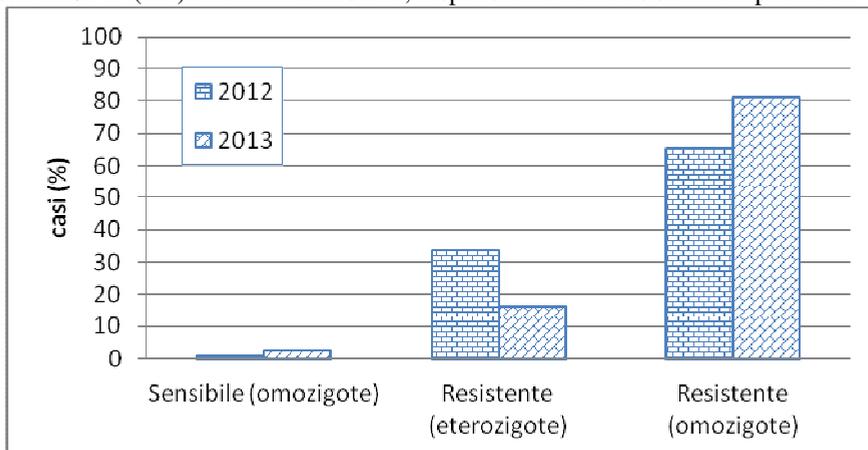


Figura 2. Genotipizzazione degli individui di *M. persicae* analizzati nel 2012 e 2013 per la mutazione L1014F (*kdr*) del canale del sodio, responsabile della resistenza ai piretroidi

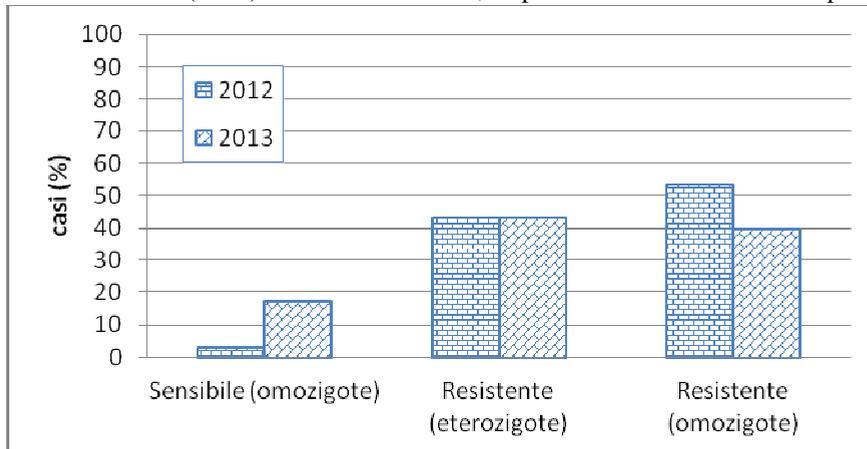


CONCLUSIONI

I risultati delle analisi molecolari evidenziano una situazione assolutamente compromessa per quanto riguarda la sensibilità ai piretroidi delle popolazioni di *M. persicae* distribuite in Emilia-Romagna. Le mutazioni *kdr* e *s-kdr* sono presenti nella quasi totalità dei casi e conferiscono livelli di resistenza molto elevati nei confronti di una classe di insetticidi che ha un'importanza non trascurabile, soprattutto per la difesa di varie colture erbacee/orticole che possono essere ospiti secondari particolarmente appetibili per questo afide. La resistenza ai

neonicotinoidi ha mostrato una leggera regressione a scapito dei genotipi omozigoti, mentre la percentuale di eterozigoti si è mantenuta costante. Infine, l'aspetto più preoccupante è la conferma che la mutazione R81T non si limita solamente alle popolazioni presenti su pesco, ma può coinvolgere anche varie colture erbacee per le quali i neonicotinoidi rimangono una delle possibili soluzioni (Panini *et al.*, 2013).

Figura 3. Genotipizzazione degli individui di *M. persicae* analizzati nel 2012 e 2013 per la mutazione M918T (*s-ldr*) del canale del sodio, responsabile della resistenza ai piretroidi



La resistenza ai dimetilcarbammati, diversamente da quanto avvenuto per i piretroidi, non ha invece mostrato un incremento della sua importanza nel corso degli ultimi anni: dati che risalgono al 2008 mostravano infatti la stessa percentuale di presenza della mutazione responsabile (Criniti *et al.*, 2008).

L'indagine conferma l'importanza di determinare in modo accurato i tipi di meccanismi di resistenza presenti nelle popolazioni di *M. persicae* per evitare trattamenti inefficaci e fornire informazioni utili allo sviluppo di opportune strategie di difesa. A tal riguardo, è importante prendere in considerazione prodotti aventi diverse modalità d'azione che sono già disponibili sul mercato e hanno mostrato una certa efficacia nei confronti di popolazioni sopravvissute ai trattamenti con neonicotinoidi e piretroidi. Tuttavia è estremamente importante il loro inserimento in strategie integrate antiresistenza per non far perdere rapidamente l'efficacia che al momento hanno dimostrato e per ridurre contemporaneamente la pressione di selezione oggi esercitata dai neonicotinoidi.

Ringraziamenti

La ricerca è stata parzialmente finanziata dal Servizio Fitosanitario della Regione Emilia-Romagna. Il coinvolgimento di Michela Panini è nell'ambito delle attività della Scuola di Dottorato "Agrisystem" dell'Università Cattolica del Sacro Cuore.

LAVORI CITATI

- Anonymous, 2012. Update on green peach aphid resistance to neonicotinoids. *IRAC Newsletter Issue 29*, Disponibile a: <http://www.irac-online.org/content/uploads/econnection29.pdf> (03/18, 2013)
- Bass C., Puinean A.M., Andrews M., Culter P., Daniels M., Elias J., Paul V.L., Crossthwaite A.J., Denholm I., Field L.M., Foster S.P., Lind R., Williamson M.S., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience*, 12, 51
- Cravedi P., Mazzoni E., Serra R., 1991. Bioassays of some insecticides on the green peach aphid (*Myzus persicae* (Sulzer)) in northern Italy: a preliminary survey. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, 23, 113-121
- Cravedi P., Mazzoni E., 2004. Insecticide resistance management of the green peach aphid in Italian peach orchards. *Bulletin OILB/SROP*, 27, 75-78
- Crittini A., Mazzoni E., Cassanelli S., Cravedi P., Tondelli A., Bizzaro D., Manicardi G.C., 2008. Biochemical and molecular diagnosis of insecticide resistance conferred by esterase, MACE, *kdr* and super-*kdr* based mechanisms in Italian strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide biochemistry and physiology*, 90, 168-174
- Elbert A., Nauen R., Cahill M., Devonshire A.L., Scarr A.W., Sone S., Steffens R., 1996. Resistance management with chloronicotinyl insecticides using imidacloprid as an example. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer (English ed.)*, 49, 5-54
- Guillemaud T., Brun A., Anthony N., Sauge M.H., Boll R., Delorme R., Fournier D., Lapchin L., VanlerbergheMasutti F., 2003. Incidence of insecticide resistance alleles in sexually-reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) from southern France. *Bulletin of entomological research*, 93, 289-297
- Jeschke P., Nauen R., 2008. Neonicotinoids: from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science*, 64, 1084-1098
- Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A., Sommer S.S., 1997. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome research*, 7, 389-398
- Mazzoni E., Panini M., Anaclerio M., 2012. Resistenza agli insetticidi neonicotinoidi in popolazioni emiliano-romagnole dell'afide verde del pesco. In "Atti delle Giornate Fitopatologiche", Milano Marittima (RA) 13-16 marzo 2012, 155-160
- Mazzoni E., Cravedi P., 2002. Analysis of insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards. *Pest management science*, 58, 975-980
- Panini M., Dradi D., Marani G., Butturini A., Mazzoni E., 2013. Detecting the presence of target-site resistance to neonicotinoids and pyrethroids in Italian populations of *Myzus persicae*. *Pest management science*, DOI: 10.1002/ps.3630
- Slater R., Paul V.L., Andrews M., Garbay M., Camblin P., 2012. Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. *Pest management science*, 68, 634-638