

RISPOSTA DELLA TIGNOLETTA DELLA VITE AGLI INSETTICIDI IN LABORATORIO E PIENO CAMPO IN EMILIA-ROMAGNA

S. CASSANELLI¹, G. PRADOLESI², G. CASALI², L. GARCIA², M.R. PAGNI²,
A. BUTTURINI³

¹ Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia –
Via G. Amendola, 2, 41122 Reggio Emilia

² Centro di Saggio Coop. Terremerse - Via S. Alberto, 325, 48123 Ravenna

³ Servizio Fitosanitario Regione Emilia Romagna - Via di Saliceto, 81, 40128 Bologna
stefano.cassanelli@unimore.it

RIASSUNTO

Con l'obiettivo di seguire l'evoluzione temporale della risposta a principi attivi utilizzati per la lotta integrata al fitofago della vite *Lobesia botrana* sono stati svolti test di laboratorio e di campo su tre popolazioni sentinella del fitofago, raccolte in aziende con difficoltà di controllo fra il 2011 e il 2014. I biosaggi hanno rivelato un quadro di persistente resistenza a metoxyfenozide e indoxacarb, nonostante l'allentamento della pressione selettiva dovuta alla loro progressiva sostituzione nelle strategie di difesa con nuovi principi attivi. Fra questi, è stata riscontrata una ridotta suscettibilità a chlorantraniliprole ed emamectina tra il 2013 e il 2014. La rapidità con la quale si è reso evidente il fenotipo tollerante e i risultati di saggi biochimici condotti su esemplari sopravvissuti a DL90 dei quattro principi attivi, suggeriscono che la genesi di questo fenomeno sia da imputare alla selezione successiva di esemplari provvisti di elevati livelli di attività detossificante MFO e GST a partire da quelli già resistenti al metoxyfenozide e indoxacarb. Biosaggi e prove di campo indicano inoltre come l'alternanza con spinosad e/o *Bacillus thuringiensis* possa limitare il rischio d'insorgenza di resistenza al chlorantraniliprole ed emamectina.

Parole chiave: *Lobesia botrana*, monitoraggio resistenza, chlorantraniliprole, emamectina benzoato, metoxyfenozide, indoxacarb

SUMMARY

PESTICIDE SUSCEPTIBILITY OF EUROPEAN GRAPEVINE MOTH IN LABORATORY AND FIELD TRIALS IN EMILIA ROMAGNA REGION

Laboratory and field tests were carried out to follow, over the time, the susceptibility to pesticides commonly used for *Lobesia botrana* in three populations with control difficulties between 2011 and 2014. The bioassay results revealed a persistent metoxyfenozide and indoxcarb resistance (less than 30% in mortality after challenging with DL90) which lasted throughout the monitoring period, although these molecules have been recently replaced by new alternatives. However, among these ones, a reduced susceptibility to chlorantraniliprole and emamectin benzoate emerged independently in two *Lobesia* populations. The rapid onset of this unsatisfactory response and results from biochemical assays on specimens which survived to DL90 exposures, suggested that the resistant phenotype rose from a progressive selection of specimens resistant to metoxyfenozide and indoxacarb and provided with high levels of MFO and GST detoxifying activities. Bioassays and field trials pointed out that the alternate use of spinosad and *Bacillus thuringiensis* might be an effective strategy to avoid or delay the development of emamectin and chlorantraniliprole resistance.

Keywords: *Lobesia botrana*, monitoring pesticide resistance, chlorantraniliprole, emamectin benzoate, metoxyfenozide, indoxacarb

INTRODUZIONE

Lobesia botrana (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) è l'avversità della vite più importante in Emilia-Romagna. Storicamente la lotta integrata al fitofago ha visto la progressiva sostituzione di metoxyfenozide e indoxacarb con nuove molecole come emamectina e chlorantraniliprole (Boselli *et al.* 2000; Boselli e Scannavini, 2001; Scannavini *et al.* 2005). L'aggiornamento del quadro normativo europeo degli agrofarmaci ha inoltre spinto al maggior utilizzo di prodotti a basso impatto ambientale come spinosad e *Bacillus thuringiensis* il cui impiego, a causa dei maggiori costi rispetto ai prodotti di sintesi, era di norma confinato alla lotta biologica. Negli ultimi anni sono stati inoltre segnalati al Servizio Fitosanitario Regionale aziende del ravennate con trattamenti inefficaci a base indoxacarb e metoxyfenozide che hanno portato al conseguente aumento della pressione selettiva verso i prodotti alternativi come emamectina e chlorantraniliprole.

Il presente contributo riporta i risultati di un'attività pluriennale di monitoraggio, condotta in aziende sentinella e con difficoltà di controllo, della risposta agli agrofarmaci dei fitofagi maggiormente a rischio di sviluppare resistenza. L'attività pluriennale è stata finanziata nel Programma di Sviluppo Rurale 2007-2011 (Progetto CRPV-BIOINTEGRA, Azione 1.3, Misura 214). La finalità è stata quella di individuare e anticipare le dinamiche di sviluppo di fenomeni di tolleranza/resistenza alle diverse sostanze attive e di reversione alla condizione di suscettibilità, eventi che potrebbero verificarsi in Emilia-Romagna anche nell'immediato futuro come conseguenza della variazione della pressione selettiva esercitata sulle popolazioni d'insetti a seguito del loro utilizzo nella difesa delle colture. Tali conoscenze costituiscono uno strumento fondamentale per definire e applicare adeguate ed efficaci strategie di prevenzione e gestione del fenomeno della resistenza.

MATERIALI E METODI

Per valutare la suscettibilità di *L. botrana* alle sostanze attive di vecchia e più recente introduzione sono stati eseguiti prove di campo e biosaggi di laboratorio. Inoltre è stata valutata nelle popolazioni in studio l'attività enzimatica coinvolta nella detossificazione delle sostanze attive.

Prove di campo

Le prove di campo sono state condotte nel 2014 in un vigneto (sigla FE1) cv. Merlot in località Filo d'Argenta (FE) e in un vigneto (sigla RA3) cv Trebbiano Romagnolo a Conselice (RA). I trattamenti sono stati eseguiti sulla seconda generazione larvale di *L. botrana* seguendo un protocollo sperimentale a blocchi randomizzati con quattro repliche e parcelle di quattro e cinque piante rispettivamente per FE1 e RA3. Le applicazioni sono state realizzate con nebulizzatore spalleggiato utilizzando un volume di irrorazione di circa 1000 L/ha (FE1) e 800 L/ha (RA3). I formulati in prova e i tempi di applicazione sono mostrati in tabella 1.

Tabella 1. Prodotti insetticidi e schema sperimentale delle applicazioni

Sostanza attiva	Formulato commerciale	Dose formulato	Epoca di applicazione	Data di applicazione
Indoxacarb	Steward WG	150 g/ha	Inizio ovideposizione	16/6
Metoxyfenozide	Gladiator SC	400 mL/ha	Inizio ovideposizione	16/6
Chlorantraniliprole	Coragen SC	180 mL/ha	Inizio ovideposizione	16/6
Emamectina benzoato	Affirm WG	1500 g/ha	Testa nera	25/6
Clorpirifos etile	Dursban 75 WG	700 g/ha	Testa nera	25/6

Il rilievo per valutare l'efficacia delle diverse tesi è stato svolto 3 o 4 settimane dopo il trattamento su 50 grappoli per ripetizione valutando il numero di grappoli e acini danneggiati dalle larve. I dati ottenuti dal rilievo per parcella sono stati sottoposti all'analisi della varianza (Anova) seguita dal test Duncan's new multiple range test (MRT) ($p < 0,05$) per la separazione delle medie. I risultati sono riportati come efficacia sul numero di grappoli e di acini.

Biosaggi di laboratorio

I biosaggi sono stati svolti su quattro diverse popolazioni: RA3 e FE1, provenienti dagli appezzamenti nei quali sono state realizzate le prove di campo, RA2 e PG1, quest'ultima popolazione considerata suscettibile in quanto mantenuta in laboratorio senza alcun contatto con i prodotti fitosanitari. Località e annualità di prelievo, così come il principio attivo testato, sono indicate in tabella 2.

Tabella 2. Popolazioni e sostanze attive testate in laboratorio dal 2011 al 2014

Sostanza attiva	FE1 Filo di Argenta				RA3 Conselice			
	2011	2012	2013	2014	2011	2012	2013	2014
Indoxacarb	X	X		X	X	X		X
Metoxyfenozide	X	X		X	X	X		X
Spinosad					X	X		
Emamectina benzoato	X	X	X	X	X	X	X	X
Chlorantraniliprole	X	X	X	X	X	X	X	X

I biosaggi con indoxacarb (Steward 30 WG), metoxyfenozide (Prodigy SC) e spinosad (Laser SC) sono stati eseguiti incorporando nella dieta artificiale (Stonefly Heliiothis) i formulati commerciali alla DL90 derivata dalle curve dose-risposta di Charmillot *et al.* 2004 relativa alle larve neonate L1, predisponendo in parallelo un testimone trattato con sola acqua. Le 48 larve neonate (24 per 2 ripetizioni) sono state collocate singolarmente in pozzetti da biosaggio entomologico (BIO-ASSAY TRAY BIO-BA-128) contenenti la dieta trattata ed è stata registrata la mortalità delle larve dopo 14 giorni di incubazione a 22,2°C, 60 ± 10% RH e 16:8 L/D. I risultati ottenuti sono espressi come percentuale di mortalità corretta (formula di Henderson-Tilton). Per l'esecuzione dei biosaggi con emamectina (Affirm) e chlorantraniliprole (Coragen 20 SC) è stato necessario definire la curva dose risposta. Il protocollo applicato (IRAC N° 017) prevede l'esposizione delle larve nate da meno di 24 ore a dosi crescenti di formulato commerciale incorporate in dieta artificiale. Contemporaneamente è stato predisposto un testimone trattato con sola acqua. Analogamente ai biosaggi precedentemente descritti le larve sono state poste singolarmente in pozzetti da biosaggio e incubate a 22,2°C, 65% RH e 16:8 L/D. La prova è stata effettuata testando circa 32 insetti per ciascuna dose e per il testimone non trattato. La mortalità è stata rilevata dopo 96 ore e i risultati ottenuti espressi come percentuale di mortalità corretta (formula di Henderson-Tilton). I valori ottenuti sono stati elaborati utilizzando l'analisi Probit (POLO) e determinate le DL50 e DL90. I valori della DL90 utilizzate per le 5 sostanze attive sono riportati in tabella 3.

Tabella 3. Dosi discriminanti DL90 per principio attivo utilizzate nei biosaggi

Sostanza attiva	Formulato commerciale	DL (ppm)
Metoxyfenozide	Prodigy SC	0,150
Indoxacarb	Steward 30 WG	0,400
Spinosad	Laser SC	1,500
Chlorantraniliprole	Coragen 20 SC	0,450
Emamectina benzoato	Affirm	0,015

Saggi enzimatici

I saggi enzimatici sono stati articolati in tre prove tese a valutare le attività enzimatiche detossificanti glutatione-S-trasferasi (GST), carbossilesterasi (EST) e monoossigenasi (MFO) utilizzando come substrati il 1-cloro-2,4-dinitrobenzene, l' α -naftilacetato e la 7-ethoxycumarina rispettivamente. Le analisi sono state eseguite su larve di 10-14 giorni di età derivanti dagli individui delle popolazioni FE1 e RA2 raccolte campo e della popolazione di riferimento suscettibile PG1. Analogamente sono stati valutati i livelli delle tre attività enzimatiche nei sopravvissuti al trattamento con metoxyfenozide, indoxacarb, emamectina e chlorantraniliprole alla dose discriminante DL90. Il protocollo adottato è quello proposto da Bouvier *et al.* (2002) e Rodríguez *et al.* (2011) inizialmente messo a punto per la *Cydia pomonella* e in seguito validato per *L. botrana*. Le attività enzimatiche misurate a 30°C in assorbanza (GST ed EST) e in fluorimetria (MFO) sono state normalizzate sul contenuto proteico degli estratti (GST ed EST) tramite analisi Bradford o sul peso della larva (MFO). Le analisi MFO sono state condotte in vivo, quelle GST e EST in vitro, su estratti proteici, utilizzando non meno di trenta larve per ceppo nel caso dell'analisi sulla popolazione generale e su un numero variabile di esemplari sopravvissuti ai biosaggi. La distribuzione delle attività enzimatiche riscontrate nelle popolazioni di campo, è stata valutata con opportuni test statistici, per rilevare la presenza di una frazione significativa d'individui dotati di un quadro detossificante divergente rispetto a quello riscontrato nella popolazione di riferimento sensibile (Reyes e Sauphanor, 2008).

RISULTATI

Prove di campo

I dati raccolti del 2014 mostrano un'attività ridotta e insufficiente dei vari principi attivi per entrambe le popolazioni FE1 e RA3, pur in presenza di livelli d'infestazione ben al di sotto del normale. In particolare per la popolazione FE1 le potenzialità di controllo appaiono mediamente compromesse con un'efficacia sul numero di acini per tutti i prodotti testati, pari o inferiore al 42% (tabella 4). Per la popolazione RA3, come per FE1, i principi attivi dotati di una minore performance sono clorpirifos-etile e indoxacarb, mentre metoxyfenozide, chlorantraniliprole ed emamectina conservano un'efficacia apprezzabile, anche se inferiore alle attese, sul numero di acini, rispettivamente del 78%, 73% e 75% (tabella 5). Occorre tuttavia sottolineare che si parla di situazioni aziendali di difficile gestione, con forme di allevamento che rendono difficile la buona bagnatura dei grappoli.

Tabella 4. Prove di campo rilievo 2014 su 50 grappoli parcella per la popolazione FE1

Sostanza attiva	% grappoli colpiti		N° acini colpiti	
	Media	Efficacia %	Media	Efficacia %
Testimone n. t.	68,0 a*	-	3,35 a	-
Indoxacarb	52,0 a	23,5	2,80 a	16,4
Metoxyfenozide	49,0 a	27,9	1,94 a	42,1
Chlorantraniliprole	53,0 a	22,1	2,22 a	33,7
Emamectina benzoato	63,0 a	7,4	2,52 a	24,8
Clorpirifos etile	57,0 a	16,2	3,27 a	2,4

* I valori seguiti dalla stessa lettera non differiscono significativamente ($p < 0,05$, Duncan's New MRT)

Tabella 5. Prove di campo rilievo su 50 grappoli parcella per la popolazione RA3

Sostanza attiva	% Grappoli colpiti		N° Acini colpiti	
	Media	Efficacia %	Media	Efficacia %
Testimone	32,0 a*	-	1,09 a	-
Indoxacarb	25,0 ab	21,9	0,73 ab	33,0
Metoxyfenozide	13,0 b	59,4	0,24 b	78,0
Chlorantraniliprole	12,0 b	62,5	0,29 b	73,4
Emamectina benzoato	12,0 b	62,5	0,27 b	75,2
Clorpirifos etile	24,0 ab	25,0	1,15 a	-5,50

* Vedi tabella 4

Biosaggi di laboratorio

Precedenti biosaggi condotti nei primi anni del progetto di monitoraggio della resistenza avevano evidenziato una forte riduzione d'efficacia a principi attivi, quali indoxacarb e metoxyfenozide, che fino a quel momento costituivano l'asse portante della difesa contro il fitofago e nel contempo, una sostanziale tenuta delle molecole di più recente introduzione, come emamectina e chlorantraniliprole. Anche nelle popolazioni FE1 e RA3, oggetto di questo lavoro, i risultati emersi nel 2011 dai biosaggi di laboratorio (dati non mostrati) indicavano per indoxacarb un'equivalente e significativa riduzione della mortalità (15,8% e 1,9% rispettivamente). La risposta a metoxyfenozide invece era maggiormente compromessa in RA3 (mortalità equivalente al controllo non trattato) che in FE1 (68,7%). Lo spinosad risultava pienamente efficace in RA3, unica popolazione testata per questo principio attivo per quell'annualità del progetto.

Un dato preoccupante era però emerso nei biosaggi del 2011 nelle aziende FE1 e RA3 in controtendenza rispetto agli altri casi esaminati ovvero un iniziale cedimento anche di chlorantraniliprole e di emamectina. Per fugare il dubbio che si trattasse di una sottostima della mortalità dovuta all'utilizzo di valori di DL90 inadeguati alle popolazioni italiane, sono state realizzate per queste due molecole nuove curve dose-risposta di riferimento sulla popolazione suscettibile PG1. I valori ottenuti sono riportati in tabella 6.

Tabella 6. Curve dose-risposta nella popolazione suscettibile PG1 di chlorantraniliprole e emamectina benzoato

Parametri analisi probit						
Sostanza attiva	N°larve	Pendenza	DL ₅₀ (IC95%)	DL ₉₀ (IC95%)	χ^2	g
Chlorantraniliprole	384	2,557 ± 0,458	0,088 (0,022-0,140)	0,279 (0,173-1,465)	22,374	0,476
Emamectina benz.	405	1,637 ± 0,168	0,005 (0,002-0,010)	0,031 (0,015-0,200)	115,19	0,263

Sulla scorta dei dati ottenuti sono state individuate le nuove DL90 da utilizzare nel monitoraggio delle annualità successive (tabella 3).

Gli esiti dei biosaggi eseguiti applicando le DL90 di indoxacarb, metoxyfenozide, chlorantraniliprole e emamectina sulle popolazioni FE1 e RA3 raccolte in campo nel periodo compreso tra il 2012 ed il 2014, sono riportati rispettivamente nelle figure 1 e 2. I risultati indicano che per quelle aziende le performance di indoxacarb e metoxyfenozide continuano ad essere deludenti mentre la risposta al chlorantraniliprole e all'emamectina è diminuita rispetto alle attese, sia nel 2013 che nel 2014 in FE1, mentre per RA3 il peggioramento è comparso solo nel 2014. La sostanza attiva spinosad nell'unico biosaggio condotto nel 2012, è efficace

nei biosaggi condotti sulla popolazione RA3, che nel contempo è risultata essere resistente sia a indoxacarb che a metoxyfenozide.

Figura 1. Mortalità ottenuta nel biosaggio di laboratorio per la popolazione FE1

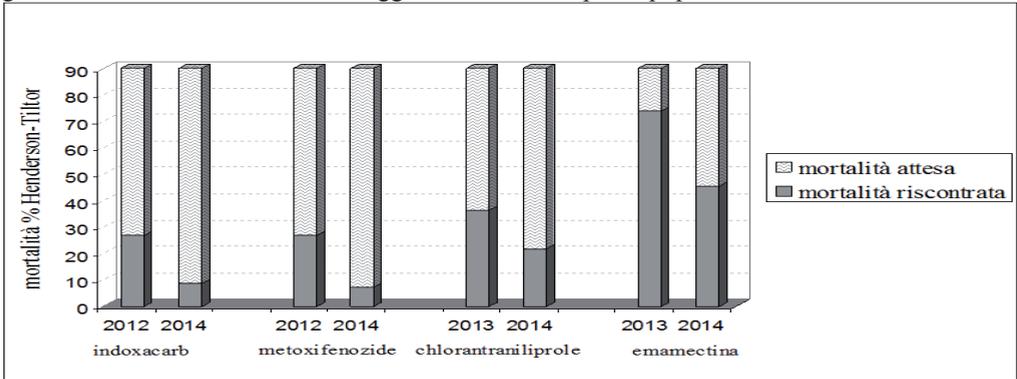
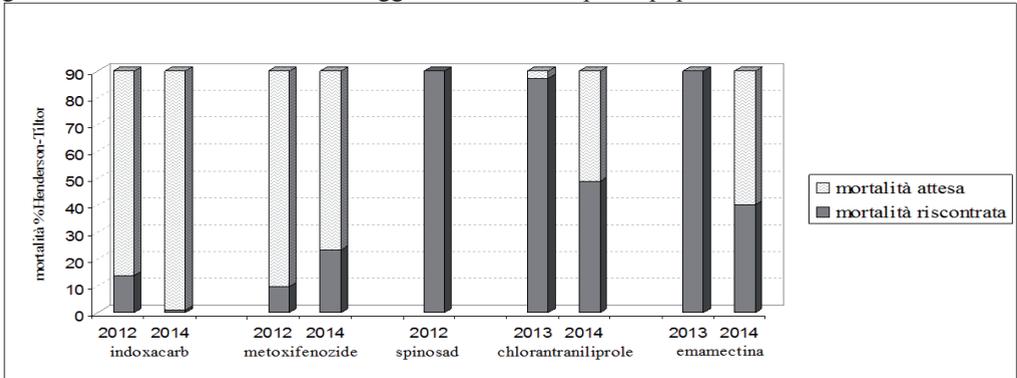


Figura 2. Mortalità ottenuta nel biosaggio di laboratorio per la popolazione RA3



Saggi enzimatici

Il profilo delle attività detossificanti gli insetticidi nella popolazione proveniente dal campo e non selezionata in laboratorio evidenzia un livello delle GST 3,5 volte più elevato nella popolazione FE1 rispetto a quella suscettibile di riferimento PG1 (tabella 7). In RA3 non sono invece evidenti variazioni biologicamente significative delle attività detossificanti, incremento o riduzione di almeno due volte rispetto alla popolazione suscettibile PG1.

La risposta detossificante è stata valutata anche negli esemplari sopravvissuti al biosaggio dopo l'applicazione dei singoli principi attivi alla dose discriminante DL90 (tabella 7). Il profilo enzimatico è in questo caso solo parzialmente sovrapposto fra le due popolazioni. Fatta eccezione per l'emamectina, gli individui sopravvissuti al biosaggio, sono infatti dotati di maggiore attività MFO rispetto a quelli del controllo PG1. Tale aumento può associarsi un incremento delle GST o delle EST a seconda del principio attivo considerato. Il massimo incremento si registra per le GST dopo il trattamento con il chlorantraniliprole nella popolazione FE1 o per le MFO in RA3 a seguito dell'esposizione all'indoxacarb (> 4 volte rispetto alla popolazione suscettibile). Il minimo incremento biologicamente significativo (2,2 volte) è a carico delle GST o delle MFO negli esemplari FE1 sopravvissuti alle DL90 di indoxacarb o chlorantraniliprole (tabella 7). L'esposizione alla DL90 per l'emamectina induce generalmente una leggera repressione dei sistemi detossificanti saggiati.

Tabella 7. Attività enzimatiche detossificanti nella popolazione FE1 e PG1 (suscettibile)

Popolazione	MFO		GST		EST	
	n	media (CI95%)	R	n	media (CI95%)	R
LbPG1	28	16,62 a (13,27-19,96)	1,0	20	254,37 a (235,62-273,13)	1,0
LbFE1	40	22,75 a (13,90-18,44) 22,5% (9/40)	1,4	38	899,69 b (798,15-902,93) 100% (38/38)	3,5
LbFE1 Chlorantr. 0,450 ppm	11	36,31 b (28,88-43,74) (7/11)	2,2	10	1074,14 c (1022,3-1125,9) 100% (10/10)	4,2
LbFE1 Emamect. 0,015 ppm	12	12,10 c (4,78 - 9,27) 8,3% (1/12)	0,7	10	338,73 a (285,77-391,68) 40% (4/10)	1,3
LbFE1 Metoxy. 0,150 ppm	19	52,80 d (46,99-58,60) 100% (19/19)	3,2	18	726,79 d (680,12-773,46) 100% (18/18)	2,8
LbFE1 Indoxac. 0,400 ppm	8	54,37 d (46,84-61,90) 100% (8/8)	3,3	8	548,94 d (496,55-601,32) 100% (8/8)	2,2
LbRA3	32	32,45 b (23,68-41,22) 50% (16/32)	1,9	32	434,72 b (373,19-496,25) 71,80% (23/32)	1,7
LbRA3 Chlorantr. 0,450 ppm	7	53,46 c (47,03-59,90) 100% (7/7)	3,1	6	683,84 b (602,37-765,31) 100% (6/6)	2,7
LbRA3 Emamect. 0,015 ppm	14	14,45 a (8,92 - 19,97) 7,14% (1/14)	0,9	12	188,38 a (147,73-229,02) 8,33% (1/12)	0,7
LbRA3 Metoxy. 0,150 ppm	16	43,20 b (31,87-54,52) 81,2% (14/16)	2,6	9	362,61 b (299,25-425,96) 44,44% (7/9)	1,4
LbRA3 Indoxac. 0,400 ppm	18	68,69 d (58,93-78,43) 100% (18/18)	4,1	16	384,61 b (308,37-440,85) 50,00% (8/16)	1,5
	16	210,72 b (191,88-229,54) 100% (9/9)	2,3			

n = numero di larve analizzate

R = rapporto fra l'attività enzimatica della popolazione in esame e quella di riferimento (LbPG1)

% = percentuale di larve con attività enzimatica superiore al 90% degli esemplari LbPG1

(n/N) = numero n di larve con attività enzimatica oltre il livello che comprende il 90% degli esemplari LbPG1 sul totale N di larve analizzate

Attività enzimatiche sono espresse come: MFO pmol 7-OH min⁻¹ mg⁻¹ larva; GST nmol GS-DNB min⁻¹ mg⁻¹ prot; EST nmol 1-naftolo min⁻¹ mg⁻¹ prot

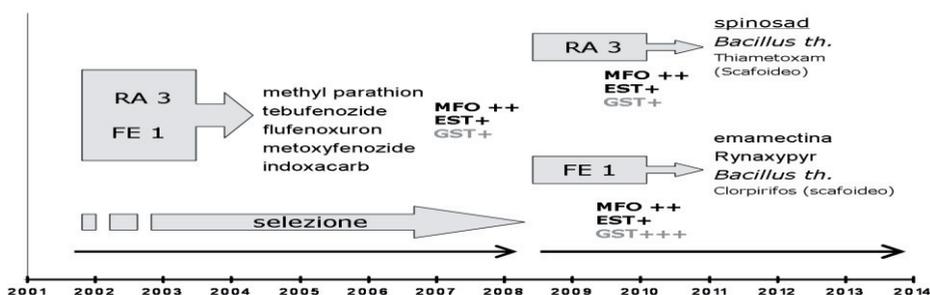
Attività medie seguite dalla stessa lettera non sono statisticamente significative (Tukey's test, p>0,05)

DISCUSSIONE

I risultati dei biosaggi del 2012 hanno confermato la ridotta suscettibilità riscontrata già dagli anni precedenti a indoxacarb e a metoxyfenozide sia nelle esperienze di laboratorio che nelle evidenze della pratica aziendale. Tale riduzione è stata accertata anche nei biosaggi del 2014, e quindi si è mantenuta nonostante la progressiva sostituzione di queste sostanze attive con le nuove molecole dotate di meccanismi d'azione alternativi (figura 1 e 2), confermando la mancata reversione alla condizione di suscettibilità, anche in apparente assenza di pressione selettiva. Ciò suggerisce un ridotto costo di fitness del fenotipo resistente e/o la recente associazione con meccanismi di tolleranza ai nuovi prodotti, come emamectina e chlorantraniliprole.

Il profilo delle attività detossificanti gli insetticidi negli esemplari non sottoposti a selezione, diversifica le popolazioni FE1 e RA3 campionate nel 2014. La ragione di tali differenze può essere in parte imputabile alla variabilità intraspecifica, ma anche alla diversa pressione selettiva esercitata su FE1 e RA3 a partire dal 2008, con la diversificazione delle strategie di difesa adottate a livello aziendale, basate inizialmente sul prevalente impiego di indoxacarb e metoxyfenozide (figura 3).

Figura 3. Storico delle strategie di difesa adottate aziendali per il controllo di RA3 e FE1 e relativo quadro delle attività enzimatiche detossificanti in corso di selezione



Per discernere il contributo della variabilità intraspecifica e quella legata alla diversa pressione selettiva, sono stati esaminati i livelli di attività enzimatica GST, MFO e EST negli esemplari sopravvissuti alla dose discriminante DL90 per i quattro principi attivi. Comune denominatore degli individui resistenti a indoxacarb, metoxyfenozide e chlorantraniliprole sono elevati livelli di MFO in FE1 e RA3 che pur essendo variabili in funzione del principio attivo sono comunque distinti da quelli della popolazione suscettibile. Il dato non sorprende essendo le monoossigenasi, tra le famiglie multi geniche che codificano i sistemi detossificanti gli insetticidi, quella dotata di migliore versatilità, codificando per una pletora di enzimi con affinità per molteplici principi attivi.

Il fatto che la tolleranza al chlorantraniliprole ed emamectina si sia instaurata rapidamente su un quadro preesistente e persistente di resistenza al metoxyfenozide e indoxacarb, supporta l'ipotesi che alcuni esemplari inizialmente selezionati per la ridotta suscettibilità ai due principi attivi, fossero già provvisti di varianti monossigenasiche in grado di detossificare con una certa efficienza, l'emamectina e il chlorantraniliprole, pur non essendone mai stati esposti. In effetti, le prove di campo sembrano confermare un maggior grado di compromissione dell'efficacia dei prodotti testati nella popolazione FE1 rispetto a RA3. Questo potrebbe essere il frutto della maggiore pressione selettiva esercitata nell'attuale strategia di difesa da parte dell'emamectina e chlorantraniliprole (Rynaxypyr) sulla popolazione FE1 (figura 3). Il

controllo della popolazione RA3 include invece l'utilizzo dello spinosad, principio attivo che i biosaggi avevano confermato meglio contrastare anche nel 2012, la resistenza a metoxyfenozide e indoxacarb, quadro di partenza comune alle popolazioni FE1 e RA3. Tuttavia il riscontro di elevati livelli di MFO e carbossilesterasi dopo selezione con indoxacarb o di MFO e GST nel caso del chlorantraniliprole, suggerisce la sovrapposizione di meccanismi di resistenza/tolleranza di più recente selezione, probabilmente frutto della progressiva sostituzione dei due prodotti nelle strategie di difesa. Sia la popolazione FE1 che RA3 mostrano anche un'elevata resistenza in campo a clorpirifos-etile. La pressione selettiva in questo caso è dettata dalla necessità di contenimento dello scafoideo in coincidenza con la presenza in campo della seconda generazione di *L. botrana*.

Nel caso di emamectina, il quadro di sottoespressione delle tre principali attività detossificanti è spiegabile considerando il basso grado di vitalità riscontrato nei sopravvissuti alla selezione, rispetto agli esemplari selezionati con i rimanenti principi attivi. Il profilo enzimatico in questi esemplari potrebbe quindi riflettere una condizione di sofferenza metabolica dovuta a meccanismi di tolleranza solo parzialmente in grado di contrastare gli effetti tossici della DL90. Alternativamente il fenotipo tollerante potrebbe avere un evidente costo di fitness, almeno in condizioni di allevamento di laboratorio.

A parità di principio attivo testato i marcatori biochimici associati alla resistenza/tolleranza appaiono solo in parte comuni alle due popolazioni selezionate, probabilmente a causa delle attuali divergenti strategie di difesa. Inoltre il diverso incremento delle attività detossificanti in FE1 e RA3 una volta esposte alle DL90 del medesimo principio attivo fa ipotizzare un certo grado di eterogeneità all'interno delle due popolazioni in termini di frequenza d'individui resistenti e livello di resistenza/tolleranza dei singoli esemplari. Questo dato può essere atteso, poiché la resistenza metabolica è un carattere quantitativo, cioè controllato da innumerevoli varianti geniche che, condizionando in maniera composita il fenotipo resistente, tendono a convergere sul background genetico dei singoli esemplari col progredire della selezione.

In quest'ottica le prove di campo sembrano dimostrare che FE1 si trova a uno stadio più avanzato di selezione di resistenza/tolleranza a emamectina e a chlorantraniliprole. Tale fenomeno appare più contenuto in RA3, grazie all'uso alternativo e combinato, nelle attuali strategie di difesa, del *B. thuringiensis* e soprattutto dello spinosad. I dati biosaggio già nel 2011, mostravano infatti come questo principio attivo era comunque efficace nel contrastare gli esemplari resistenti a metoxyfenozide e indoxacarb dai quali hanno probabilmente preso origine le odierne popolazioni con ridotta suscettibilità al chlorantraniliprole ed emamectina.

CONCLUSIONI

Lo studio dell'evoluzione temporale della suscettibilità a diversi principi attivi in popolazioni di tignoletta con difficoltà di controllo in campo ha evidenziato:

- la persistenza della resistenza a indoxacarb e a metoxyfenozide, nonostante l'allentamento della pressione selettiva. Questo rappresenta un fattore limitante alla loro re-introduzione nelle attuali strategie di difesa;
- le potenzialità di sviluppo, in questo contesto, di una ridotta suscettibilità al chlorantraniliprole ed emamectina, quando i due principi attivi costituiscono la componente portante del programma di controllo fitosanitario;
- che la probabile genesi dell'attuale quadro di resistenza sia dovuta alla preselezione, in un primo momento, di un ridotto numero di esemplari dotati di monoossigenasi in grado di detossificare oltre a metoxyfenozide e indoxacarb, anche i principi attivi di nuova generazione. Lo spostamento delle strategie di difesa verso questi nuovi prodotti ha

comportato un ulteriore processo di selezione positiva e la sovrapposizione di nuovi meccanismi di resistenza (GST);

- spinosad si è dimostrato ancora efficace e rappresenta un'alternativa valida, insieme ai formulati a base di *B. thuringiensis* ed alla confusione sessuale, per contrastare la resistenza ad indoxacarb e metoxyfenozide e prevenire la eventuale riduzione di suscettibilità a chlorantraniliprole ed emamectina.

LAVORI CITATI

Boselli M., Scannavini M., Bellettini L., 2000. Attività di alcuni prodotti fitosanitari nei confronti della seconda generazione della Lobesia botrana Schiff. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1, 457-462.

Boselli M., Scannavini M., 2001. Lotta alla tignoletta della vite in Emilia-Romagna. *L'Informatore Agrario* 57: 97-100.

Bouvier J.C., Boivin T., Beslay D., Sauphanor B., 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 51: 55-66.

Charmillot P. J., Pasquier D., Verneau S., 2004. Efficacité larvicide de différents insecticides incorporés au milieu artificiel d'élevage sur les vers de la grappe. 2. Tests sur cochylis *Eupoecilia ambiguella* et comparaison avec les tests sur eudémis *Lobesia botrana*. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 36: 191-196.

Reyes M., Sauphanor B., 2008. Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization. *Pest Manag Sci.* 64: 945-53.

Rodríguez M.A., Marques T., Bosch D., Avilla J., 2011. Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochem. Physiol.* 100: 151-159.

Scannavini M., Almerighi A., Boselli M., Fagioli L., 2005. Lotta alla seconda generazione della tignoletta della vite. *L'Informatore Agrario* 61: 57-60.

!
!
!