ATTIVITÀ RESIDUALE DI TRIFLUMURON SU STADI GIOVANILI DI *HALYOMORPHA HALYS*

E. PASQUALINI, L. DEPALO, A. MASETTI
DISTAL, Università di Bologna, Viale Fanin, 42 - 40127 - Bologna (BO), Italia
edison.pasqualini@unibo.it

RIASSUNTO

L'attività e la persistenza d'azione di triflumuron (Alsystin® 48 SC) sono state valutate con prove di laboratorio su stadi giovanili di *Halyomorpha halys*. Le indagini sono state condotte su piante di pesco sulle quali sono state trasferite stadi preimaginali di cimice, seguendo un articolato dispositivo sperimentale. I risultati hanno mostrato una mortalità, intervenuta nel passaggio fra un'età e le successive, di circa l'80% per individui esposti a residuo fresco per un periodo massimo 21 giorni. Una risposta analoga è stata osservata per individui esposti a residui invecchiati fino a 3 settimane. Il lavoro mette pertanto in risalto una notevole mortalità totale sugli stadi giovanili, una continuità degli effetti per almeno 21 giorni che non si riduce con l'invecchiamento per almeno 3 settimane. Triflumuron è, inoltre, un insetticida non neurotossico, piuttosto selettivo e efficace anche contro i principali lepidotteri dei fruttiferi.
Parole chiave: cimice asiatica, inibitori sintesi chitina, Alsystin

SUMMARY

RESIDUAL ACTIVITY OF TRIFLUMURON ON *HALYOMORPHA HALYS* NYMPHS

Halyomorpha halys (Rhynchota: Pentatomidae), the Brown Marmorated Stink Bug (BMSB), is a high-concern invasive species causing severe damages to orchards in many countries outside its native Asian range. Control options matching both effectiveness and sustainability are currently lacking. In this study the residual activity of triflumuron, an insecticide belonging to chitin synthesis inhibitors, was tested on 3rd instar nymphs of BMSB. Insects were exposed to insecticide residues aged for 0, 7, 14 and 21 days on potted peach plants. Mortality was scored after 7, 14 and 21 days of contact. In comparison with water-treated control triflumuron caused significantly higher mortality on BMSB nymphs. The percentages of mortality increased with the contact time and reached approximately 80% at 21 days of exposure for all aging intervals. The effects of triflumuron on BMSB nymphal instar might be exploited for integrated management programs because of the better ecotoxicological profile of chitin synthesis inhibitors in comparison with most neurotoxic insecticides used so far against BMSB.
Keywords: Brown Marmorated Stink Bug, chitin synthetic inhibitors, Alsystin

INTRODUZIONE

La cimice marmorata asiatica *Halyomorpha halys* (Stål) (Rhynchota: Pentatomidae) da alcuni anni causa grossi e crescenti danni su numerose colture in molte regioni italiane, in particolare al Nord. Tutti i metodi di contrasto finora sperimentati, inclusi gli insetticidi di sintesi chimica, sono stati spesso insufficienti a contenerne i danni entro limiti accettabili.

L'ampio spettro d'azione delle sostanze attive finora utilizzate (soprattutto piretroidi, fosforganici e neonicotinoidi) e l'elevata frequenza dei trattamenti (fino a 9-10 specifici e oltre per stagione) non sono ovviamente compatibili con programmi di difesa integrata (Rice et al., 2014; Pasqualini et al., 2016a; Pasqualini et al., 2017; Kuhar e Kamminga, 2017) e in ogni caso da soli non risolvono il problema poiché i danni raggiungono, e superano spesso, il 50% dell'intera produzione frutticola. Numerose sono i lavori pubblicati che mettono in evidenza la relativa efficacia e la scarsa persistenza d'azione delle sostanze attive utilizzate nella lotta alla

cimice asiatica. È proprio questa limitata azione residuale a determinare l'aumento della frequenza di applicazione.

Questa sperimentazione prende spunto da un lavoro condotto negli Stati Uniti (Kamminga et al*.,* 2012), che riportava interessanti effetti degli inibitori della sintesi della chitina o CSI_s acronimo dall'inglese *Chitin Synthesis Inhibitors* (gruppo appartenente agli *Insect Growth Regulators* IGR o, secondo la nomenclatura più recente di Pener e Dhadialla 2012: *Insect Growth Disruptors*, (IGD) sugli stadi giovanili della cimice.

Il principale obiettivo dello studio, i cui risultati preliminari sono stati in parte già presentati (Pasqualini et al., 2016, Masetti et al., 2018), è la valutazione dell'attività e della persistenza d'azione di triflumuron su stadi preimaginali di cimice. Questa sostanza attiva è sostanzialmente l'unica del gruppo CSI ancora disponibile in Italia.

MATERIALI E METODI

Insetti

Tutti gli individui di *H. halys* impiegati nelle sperimentazioni sono stati ottenuti da un allevamento mantenuto dall'aprile 2015 presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna e più volte rinsanguato con l'introduzione di individui raccolti in campo. Le cimici sono state allevate alle seguenti condizioni: temperatura costante di 25 ± 1° C, umidità relativa del 60 ± 10% e fotoperiodo L:B = 14:10.

Sia adulti che stadi giovanili sono stati alimentati con una dieta a base di fagiolini, carote e semi di soia, saltuariamente integrati con frutti freschi di actinidia, mele e pere.

Biosaggi

Per le prove sono state utilizzate piantine di pesco GF677 (*P. persica* x *P. amygdalus*) di circa 25 cm di altezza. Una soluzione di Alsystin® 48 SC (triflumuron 39,34% = 480 g L^{-1}) alla massima concentrazione raccomandata per le pomacee in campo (25 mL hL^{-1}) è stata applicata tramite spruzzatore manuale a pressione sulle piante fino al gocciolamento.

Le piante assegnate ai gruppi di controllo sono state trattate allo stesso modo impiegando acqua deionizzata. Tutte le piante sono state fatte asciugare all'aperto per almeno 1 h dopodiché sono state traferite in una serra alle seguenti condizioni: T_{max} 30° C, T_{min} 15° C fotoperiodo L:B = 16:8 e luminosità minima artificiale di 70.000 lux. A 0, 7, 14 e 21 giorni dal trattamento sono state allestite le unità sperimentali. In ciascuna di queste, una pianta di pesco era collocata all'interno di un cilindro di plexiglass (h 27 cm; diametro 9 cm) su cui erano presenti due fori chiusi con tulle per la circolazione dell'aria. In ogni cilindro sono state inserite 10 ninfe di *H. halys* di 1° età, corrispondenti al terso stadio giovanile dell'insetto. Per i tempi di invecchiamento di 0, 7, 14 e 21 giorni dal trattamento sono state approntate 6 repliche con peschi trattati con triflumuron e altre 6 di controllo con acqua deionizzata.

Per tutto il periodo di esposizione ai residui, gli insetti sono stati alimentati *ad libitum* con carote, e fagiolini non trattati che erano sostituiti con cadenza bisettimanale.

I fagiolini sono stati appesi alle piantine di pesco in modo da costringere le cimici al contatto con gli organi vegetali trattati per alimentarsi. Gli insetti sono stati esposti ai residui per 21 giorni mantenendoli alle stesse condizioni descritte per l'allevamento. La mortalità è stata valutata a 0, 7, 14 e 21 giorni dal trattamento (figura 1).

Figura. 1. Pianificazione prova di mortalità e persistenza

TRATTAMENTO	0	H.	7 gg	14 gg	21 gg			
CON	7 gg		H.	7 gg	14 gg	21		
TRIFLUMURON	14 g			H.	7 gg	14	21	
(25 mL/hL)	21 gg				H.	7 gg	14	21

= tempo di invecchiamento dei residui su piantine di pesco tenute in serra

= allestimento delle unità sperimentali e posizionamento insetti sulle piantine

= = controlli di mortalità a 7, 14 e 21 giorni dall'allestimento delle unità sperimentali, e equivalenti al tempo di esposizione degli insetti ai residui

Analisi dei dati

Per il confronto delle mortalità delle cimici esposte a triflumuron con le mortalità riscontrate nei gruppi di controllo, i quattro periodi di invecchiamento dei residui sono stati analizzati separatamente utilizzando equazioni di stima generalizzate (GEE) con struttura binomiale dell'errore e funzione di collegamento probit. Il fattore fisso era il trattamento (triflumuron vs controllo) e i tre intervalli di esposizione (7, 14, e 21 giorni) sono stati considerati come misure ripetute; infine, è stata considerata anche l'interazione esposizione. In caso di significatività dell'interazione, la differenza fra triflumuron e controllo è stata analizzata in ciascun periodo di esposizione con un modello generalizzato lineare (GLM) con struttura binomiale dell'errore e funzione di collegamento probit.

Per l'analisi della persistenza dell'attività insetticida, la mortalità rilevate in ciascun tempo di invecchiamento sono state corrette con la formula di Schneider - Orelli considerando come naturale la mortalità media nelle repliche di controllo relative allo stesso periodo di esposizione. Le mortalità corrette sono poi state analizzate tramite analisi della varianza a misure ripetute (RM-Anova) considerando il tempo di invecchiamento come fattore fisso e l'intervallo di esposizione come misura ripetuta.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il software SPSS 23 (IBM) fissando il livello di significatività allo 0,05.

RISULTATI

In generale, per tutti i tempi di invecchiamento è stata osservata una mortalità più elevata delle ninfe di *H. halys* trattate con triflumuron rispetto a quelle del gruppo di controllo (tabella 1). L'interazione tra tempi di invecchiamento e intervalli di esposizione, significativa a 7, 14 e 21 giorni di invecchiamento, è dovuta al fatto che la mortalità aumenta nel tempo più lentamente nei controlli rispetto ai trattati. Dopo un'esposizione di 21 giorni ai residui la mortalità è sempre significativamente più elevata nelle ninfe venute in contatto con triflumuron rispetto alle cimici del controllo. Con l'eccezione dell'invecchiamento di 14 giorni, anche a 2 settimane di esposizione si osserva lo stesso andamento.

Ancorché in linea con quanto osservato comunemente nelle condizioni di allevamento, la mortalità media delle ninfe di *H. halys* collocate sulle piante trattate con acqua deionizzata è talvolta risultata piuttosto rilevante e variabile tra un tempo di invecchiamento e l'altro. Per questa ragione, allo scopo di confrontare la persistenza dell'azione insetticida nei vari tempi di invecchiamento è stata applicata la formula di Schneider-Orelli, che tiene conto della mortalità

media nei gruppi di controllo. Questo consente una comparazione diretta delle mortalità rilevate ai diversi tempi di invecchiamento.

Tabella 1. Percentuali di mortalità rilevate su ninfe di *H. halys* esposte per un massimo di 21 giorni a residui di triflumuron invecchiati in condizioni di serra per 0, 7, 14 e 21 giorni

0 GIORNI DI INVECCHIAMENTO DEI RESIDUI				
Trattamento	Periodo di esposizione	Mortalità media (%)	Errore Standard	Intervallo di confidenza al 95%
Triflumuron	7	37,7*	12,8	15,6-62,8
Controllo		5	3,1	1,3-14,6
Triflumuron	14	65*	8,4	47,6-79,7
Controllo		11,7	4,4	5,2-22,5
Triflumuron	21	80*	7,1	63,35-90,1
Controllo		20	6,2	10-34,3
7 GIORNI DI INVECCHIAMENTO DEI RESIDUI				
Trattamento	Periodo di esposizione	Mortalità media (%)	Errore Standard	Intervallo di confidenza al 95%
Triflumuron	7	45,2	3,7	38,1-52,4
Controllo		27,1	8,5	13,3-45,7
Triflumuron	14	80,6*	4,2	71,4-87,8
Controllo		37,3	6,3	25,8-50
Triflumuron	21	93,4*	2	88,7-96,5
Controllo		47,5	6,1	35,8-59,3
14 GIORNI DI INVECCHIAMENTO DEI RESIDUI				
Trattamento	Periodo di esposizione	Mortalità media (%)	Errore Standard	Intervallo di confidenza al 95%
Triflumuron	7	26,7	8,7	12,7-45,9
Controllo		16,7	4,6	9,2-27,3
Triflumuron	14	51,7	13	27,5-75,2
Controllo		23,3	4,7	15,2-33,4
Triflumuron	21	71,7*	7,2	56,1-83,9
Controllo		30	4,1	22,4-38,6
21 GIORNI DI INVECCHIAMENTO DEI RESIDUI				
Trattamento	Periodo di esposizione	Mortalità media (%)	Errore Standard	Intervallo di confidenza al 95%
Triflumuron	7	31,1	6,6	19,5-45,1
Controllo		16,1	3,7	10-24,3
Triflumuron	14	68,9*	8,9	49,9-83,8
Controllo		35,5	5,5	25,4-46,7
Triflumuron	21	88,5*	4,3	77,8-94,9
Controllo		46,8	6,6	34,2-59,7

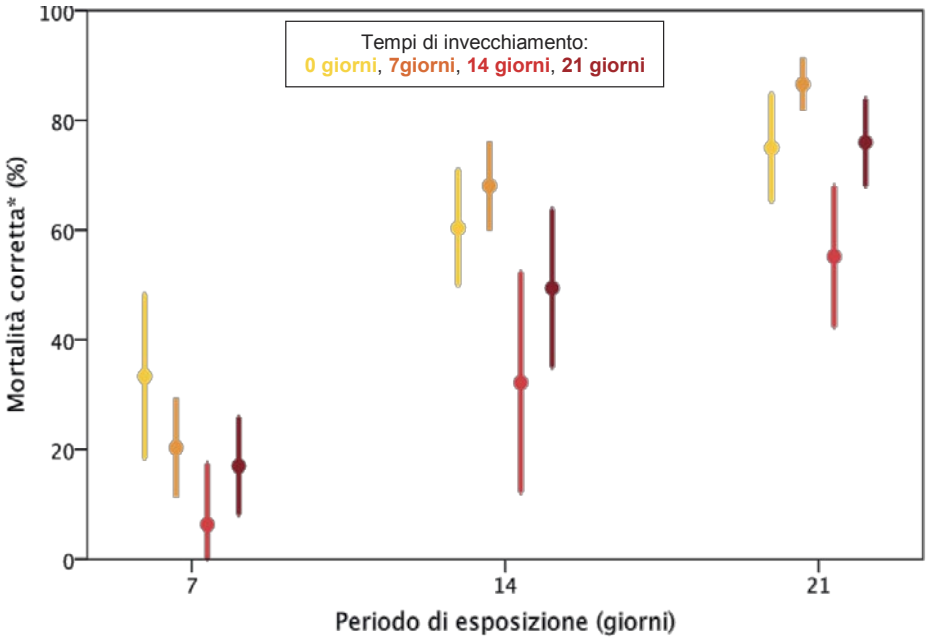
* indicano differenze statisticamente significative rispetto alle ninfe del controllo (GEE o GLM $p<0,05$)

La mortalità corretta non è influenzata dai tempi di invecchiamento (tabella 2). In altre parole, su piantine di pesco conservate in serra, i residui di triflumuron mantengono un'attività insetticida nei confronti delle ninfe della cimice asiatica fino a 21 giorni dal trattamento. La mortalità è, invece, dipendente dal periodo di esposizione degli insetti ai residui e il test HSD di Tukey ha evidenziato differenze significative tra il periodo di esposizione più breve (7 giorni) e gli altri due. Al contrario non sono risultate significative le differenze tra 14 e 21 giorni di esposizione (figura 2)

Tabella 2. Effetto dei diversi fattori considerati nell'Anova a misure ripetute applicata alle mortalità corrette per la valutazione dell'attività di triflumuron in dipendenza dei tempi di invecchiamento dei residui e del periodo di esposizione

Fattore	g.l.	F	p
Tempo di invecchiamento	3	1,3	0,29
Periodo di esposizione	2	95,6	<0,01
Tempo invecchiamento* Periodo esposizione	6	1,3	0,27

Figura 2. Mortalità media corretta delle ninfe di *H. halys* esposte ai residui di triflumuron. L'Anova a misure ripetute non ha rilevato differenze tra i diversi tempi di invecchiamento dei residui, mentre la mortalità rilevata dopo 7 giorni di esposizione delle ninfe ai residui è significativamente inferiore a quella rilevata 14 e 21 giorni



CONCLUSIONI

Come atteso la mortalità delle ninfe aumenta all'allungarsi del periodo di esposizione ai residui. Dopo 21 giorni di esposizione a triflumuron è stata, infatti, osservata una mortalità significativamente più elevata delle ninfe di *H. halys* rispetto a quelle dei gruppi di controllo per tutti i tempi di invecchiamento. Come dimostrato dalle numerose ninfe che sono riuscite a completare una o due mute, ma non a raggiungere lo stato adulto, l'assunzione di quantità letali della sostanza attiva è progressiva. Con ogni probabilità, l'avvelenamento è avvenuto prevalentemente per contatto tra tarsi e superficie delle piantine poiché le cimici sono carpofaghe e non si nutrono sulle parti vegetative dei peschi.

L'invecchiamento dei residui non riduce la mortalità delle ninfe, pertanto nelle condizioni di invecchiamento adottate in serra, l'efficacia del prodotto resta inalterata fino a 21 giorni dopo il trattamento. La persistenza degli inibitori della sintesi della chitina è nota e trova riscontro nelle analisi chimiche dei residui di questa classe di sostanze attive (Pener e Dhadialla, 2012).

Numerosi insetticidi, appratenti a diverse classi, hanno mostrato notevole attività sugli stadi giovanili della cimice asiatica. Ciononostante, gli inibitori della biosintesi della chitina sono più selettivi rispetto a piretroidi, esteri fosforici e neonicotinoidi; nel contesto di un approccio integrato al controllo delle cimice asiatica potrebbero, quindi, rivestire un notevole interesse.

LAVORI CITATI

Kamminga K., Kuhar T., Wimer A., Herbert D.A., 2012. Effects of the insect growth regulators novaluron and diflubenzuron on the brown marmorated stink bug. Online. *Plant Health Prog.* DOI: 10.1094/PHP-2012-1212-01-RS

Kuhar T.P.. Kamminga K., 2017. Review of the chemical control research on *Halyomorpha halys* in the USA. *J. Pest Sci*., 90, 1021-1031

Masetti A., Depalo L., Marchetti E., Pasqualini E., 2018. Activity of residues of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on *Halyomorpha halys* (Stål) nymphs.- Poster presentato al Congresso ECE 2018, *XI European Congress of Entomology* - Naples, Italy - 2-6 July 2018

Pasqualini E., Burgio G., Preti M., Depalo L., Masetti A., 2017. Emergenza cimice asiatica: approccio integrato per la difesa. *Frutticoltura*, 3, 24-27

Pasqualini E., Scannavini M., Preti M., Depalo L., Masetti A., 2016. Attività di diversi insetticidi contro *Halyomorpha halys*. *L'Informatore Agrario*, 20, 2-5

Pasqualini E., Depalo L., Scannavini M., Preti M., Masetti A., 2016a. Short-term activity of some insecticides on *Halyomorpha halys*: Open field trials in Italy in 2015. Atti del Congresso ICE 2016 *XXV International Congress of Entomology* September 25-30, Orlando, Florida

Pener M.P. , Dhadialla T.S., 2012. An overview of Insect Growth Disruptors; Applied aspects. In "Advanced in insects physiology". Ed T. S. Dhadialla, Academic Press, vol 43, 1-119

Rice K.B., Bergh C.J., Bergmann E.J., Biddinger D.J., Dieckhoff C., Dively G.P., Fraser H., Gariepy T.D., Hamilton G.C., Haye T., Herbert D.A., Hoelmer K.A., Hooks C.R.R., Jones A., Krawczyk G., Kuhar T.P., Martinson H., Mitchell W.S., Nielsen A.L., Pfeiffer D.G., Raupp M.J., Rodriguez-Saona C.R., Shearer P.W., Shrewsbury P.M., Venugopal P.D., Whalen J., Wiman N.G., Leskey T.C., Tooker J.F., 2014. Biology, ecology and management of brown marmorated stink bug (*Halyomorpha halys*). *J. Integr. Pest Manag.*, 5,3, 1-13