

MONITORAGGIO DELLA RESISTENZA DI *CYDIA POMONELLA* AGLI INSETTICIDI IN EMILIA-ROMAGNA: TEST DI LABORATORIO E PROVE DI CAMPO

A. BUTTURINI ⁽¹⁾, L. CAROLI ⁽²⁾, M. BOSELLI ⁽¹⁾, L. FAGIOLI ⁽³⁾

⁽¹⁾ Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna, Via di Saliceto 81, 40128 Bologna, abutturini@regione.emilia-romagna.it mboselli@regione.emilia-romagna.it

⁽²⁾ Agronomica RS Terremerse, Via S. Alberto 325, 48100 Ravenna lcaroli@terremerse.it

⁽³⁾ Area Servizi e Sviluppo CA Ravenna, Via Mazzini 49, 48100 Ravenna lucafagioli@alice.it

RIASSUNTO

La sensibilità di *Cydia pomonella* agli insetticidi è stata valutata con biosaggi su larve diapausanti raccolte in 13 frutteti fortemente infestati. In laboratorio fosfororganici e regolatori della crescita (RCI) hanno mostrato una sensibile riduzione di efficacia. Prove di campo in due frutteti di origine delle larve hanno confermato la presenza di resistenza pratica a diflubenzuron, methoxyfenozide e chlorpyrifos. La validità dei biosaggi come strumento idoneo al monitoraggio della resistenza pratica ai RCI è evidenziata dalla buona correlazione tra risultati di laboratorio e di campo. La correlazione per thiacloprid e spinosad è promettente, ma dovrà essere validata anche su popolazioni resistenti. I biosaggi con chlorpyrifos e azinphos-methyl non possono invece ritenersi indicativi di resistenza pratica poiché i risultati ottenuti non appaiono correlati con i dati di efficacia in campo.

Parole chiave: *Cydia pomonella*, resistenza agli insetticidi, insetticidi regolatori della crescita, fosfororganici, spinosad, thiacloprid

SUMMARY

Diapausing larvae of *Cydia pomonella* from 13 heavily infested orchards of Emilia-Romagna were tested for resistance by topical application of discriminating concentrations. Wild moths showed a significant lower susceptibility to organophosphates (12 populations out of 13 analysed), insect growth regulators (8 out of 13), but also to thiacloprid (4 out of 9) and spinosad (6 out of 8) than a laboratory susceptible colony. The efficacy of insecticides against the first generation of the pest was checked with two field trials. Practical resistance to diflubenzuron and methoxyfenozide (-6 and 11% efficacy, respectively) was observed in one orchard and to chlorpyrifos (0% efficacy) in the second one. Flufenoxuron, azinphos-methyl, thiacloprid and spinosad were always highly effective. Laboratory response to IGRs consisted with field efficacy both in the case of the resistant and of the susceptible population. On the other hand, laboratory response to OPs was very low in both populations, regardless of the field susceptibility. These results may limit the validity of topical tests on diapausing larvae for monitoring resistance to organophosphates.

Keywords: *Cydia pomonella*, insecticide resistance, insect growth regulators, organophosphates, spinosad, thiacloprid,

INTRODUZIONE

Cydia pomonella è un fitofago diffuso in tutte le zone di coltivazione delle pomacee e causa gravi perdite di produzione se non vengono adottati efficaci metodi di lotta. La difesa chimica, nonostante l'ampia disponibilità di sostanze attive, può diventare problematica a causa della capacità dell'insetto di sviluppare resistenza agli insetticidi. In Europa tale fenomeno si è presentato a partire dagli inizi degli anni novanta in popolazioni di carpocapsa italiane, francesi, svizzere, spagnole e portoghesi e coinvolge sostanze attive appartenenti alle famiglie

chimiche dei regolatori della crescita (RCI), degli esteri fosforici e dei piretroidi (Riedl e Zelgher, 1994; Sauphanor *et al.*, 1994, Sauphanor *et al.*, 1998a; Charmillot *et al.*, 2003). Anche in numerose aziende dell'Emilia Romagna, a partire dalla fine degli anni novanta, sono state segnalate riduzioni di efficacia dei RCI e dei fosforici nei confronti di *C. pomonella* (Autori vari, 2001). Biosaggi condotti nel 1999 e 2000 per valutare la suscettibilità delle popolazioni dell'insetto a diflubenzuron ed azinphos-methyl, hanno evidenziato la presenza di popolazioni resistenti in laboratorio a tali sostanze attive (Ioriatti *et al.*, 2003).

Nel presente lavoro si riportano i risultati di biosaggi e prove di campo condotti nel 2003 e nel 2004 allo scopo di confermare la presenza e l'evoluzione della resistenza sul territorio. Le prove di laboratorio sono state eseguite su larve svernanti raccolte in 13 aziende situate nelle province di Reggio Emilia, Bologna, Ravenna e Forlì, tutte caratterizzate dalla presenza, negli ultimi anni, di elevati danni alla raccolta. La valutazione della suscettibilità di *C. pomonella* ha riguardato le sostanze attive diflubenzuron, tebufenozide, spinosad, thiacloprid, chlorpyrifos, azinphos-methyl e methoxyfenozide. Nel 2004, in due aziende, le cui popolazioni presentavano una marcata riduzione di sensibilità agli insetticidi nei biosaggi di laboratorio, sono state condotte prove di campo allo scopo di verificare l'attività delle stesse famiglie chimiche nei confronti della prima generazione dell'insetto.

MATERIALI E METODI

Prove di laboratorio

Le larve diapausanti di carpocapsa sono state catturate con l'impiego di fasce trappola di cartone ondulato e mantenute per tre mesi a 6° C per soddisfare il loro fabbisogno di freddo. Le larve di una colonia di laboratorio suscettibile agli insetticidi sono state indotte artificialmente alla diapausa e refrigerate assieme alle larve raccolte in campo. Al termine dei tre mesi, sul dorso di ciascuna larva è stato applicato 1 µl di soluzione di sostanza attiva tecnica disciolta in solvente. La procedura per l'esecuzione dei test ed i dosaggi discriminanti per ciascuna sostanza attiva (tabella 1) hanno seguito le indicazioni di Pasquier e Charmillot (2004). Dopo il trattamento le larve sono state mantenute in camera climatica in condizioni favorevoli alla ripresa del loro sviluppo (25°C, fotoperiodo 16:8h L:B, 80% umidità relativa) fino allo sfarfallamento degli adulti. Quando possibile, sono state utilizzate per ciascuna tesi 32 larve (16 femmine e 16 maschi) e per ogni popolazione è stato trattato uno stesso numero di larve con il solo solvente. Al termine di due mesi è stata rilevata la mortalità di larve e pupe. Dopo aver corretto i dati con la mortalità riscontrata nel testimone (Abbott, 1925), è stata valutata la significatività delle differenze tra le popolazioni con test non parametrici (chi quadrato, test esatto di Fisher).

Tabella 1 – Test di laboratorio: prodotti tecnici e dosaggi discriminanti

Sostanza attiva	Dose discriminante (ppm)	Solvente	Anno	
			2003	2004
Azinphos-methyl	400	acetone	*	*
Chlorpyrifos	1200	acetone	*	*
Diflubenzuron	10000	tetraidrofurano	*	-
Tebufenozide	300	acetone	*	*
Thiacloprid	500	acetone	*	*
Spinosad	6000	diclorometano	*	*
Methoxyfenozide	100	acetone	-	*

Prove di campo

Le prove sono state svolte nel 2004 in due frutteti della provincia di Ravenna, nei quali sono stati rilevati fortissimi danni alla raccolta nell'anno precedente, nonostante i numerosi trattamenti insetticidi eseguiti. Le principali caratteristiche degli appezzamenti oggetto della sperimentazione sono riassunte nella tabella 2.

Tabella 2 – Caratteristiche degli appezzamenti utilizzati per le prove

Località	Sigla	Coltura	Varietà	Sesto d'impianto	Forma di allevamento	Anni
S. Bernardino di Lugo	RA 7	Melo	Golden Delicious	4 x 3 m	palmetta irregolare	20
Cassanigo di Cotignola	RA 3	Melo	Hi – Early	3,5 x 2 m	spalliera	20

Il disegno sperimentale adottato è stato quello del blocco randomizzato, con parcelle (unità sperimentali) di quattro piante, ripetute quattro volte nella azienda RA 7 e cinque volte nell'azienda RA 3.

Tabella 3 – Prodotti impiegati ed epoca di applicazione

Sostanza attiva	Formulato	S.a. (% o g/l)	Dose g o ml/hl	Date trattamenti (Azienda RA 7)	Date trattamenti (Azienda RA 3)
Diflubenzuron	Dimilin	5%	400 g	5/5 - 19/5 - 4/6	4/5 - 18/5 - 3/6
Flufenoxuron	Cascade	4,7%	150 ml	5/5 - 19/5 - 4/6	4/5 - 18/5 - 3/6
Methoxyfenozide	Prodigy	22,1%	40 ml	5/5 - 19/5 - 4/6	4/5 - 18/5 - 3/6
Azinphos-methyl	Azin PB	25%	250 gr	19/5 - 26/5 - 4/6	18/5 - 25/5 - 3/6
Spinosad	Laser	480 g/l	30 ml	19/5 - 26/5 - 4/6	18/5 - 25/5 - 3/6
Thiacloprid	Calypso	480 g/l	25 ml	19/5 - 26/5 - 4/6	18/5 - 25/5 - 3/6
Chlorpyrifos	Dursban 75 WG	75%	70 g	19/5 - 26/5 - 4/6	18/5 - 25/5 - 3/6

Per l'esecuzione dei trattamenti è stata utilizzata una motocarriola semovente, modello Albertazzi, e adottato un volume di distribuzione pari a 1200 l/ha (RA7) e 1500 l/ha (RA3). Per decidere le date dell'inizio dei trattamenti sono stati monitorati i voli dell'insetto con trappole a feromoni e l'inizio dell'ovideposizione e della nascita larvale mediante alcuni campionamenti visivi. Un ulteriore supporto alla decisione del momento d'intervento è stato fornito dal modello previsionale fenologico MRV-carpocapsa della Regione Emilia-Romagna.

Per i RCI il primo trattamento è stato posizionato all'inizio dell'ovideposizione, mentre per i prodotti a prevalente azione larvicida si è intervenuti alle prime nascite larvali. Le tesi a confronto e le relative epoche di applicazione dei prodotti sono riportate nella tabella 3.

Il rilievo del danno è stato effettuato alla fine della nascita larvale della prima generazione, controllando 100 frutti per ripetizione (400 per tesi).

RISULTATI

Prove di laboratorio

In ambedue gli anni di prova i test hanno evidenziato un'elevata variabilità nella sensibilità agli insetticidi delle popolazioni esaminate (tabella 4).

Tabella 4 – Test di applicazione topica su larve svernanti. Efficacia delle sostanze attive e significatività delle differenze fra le popolazioni ($P \leq 0,05$, test del χ^2 , test esatto di Fisher)

	azinphos-m		chlorpyrifos		diflubenzuron		tebufenozide		methoxyfenozide		thiacloprid		spinosad	
	N° larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° larve	% Abbott
2003														
GMG ¹	31	67 a	32	81 a	32	80 a	32	55 b	-	-	32	68 ab	32	100 a
RE1 ²	33	77 a	-	-	-	-	27	53 bc	-	-	26	70 ab	-	-
RA3 ²	32	36 b	32	0 b	32	81 a	32	58 ab	-	-	32	81 a	32	96 ab
RA5 ²	27	33 b	32	0 b	-	-	31	83 a	-	-	-	-	-	-
BO14 ²	32	27 b	31	0 b	32	77 a	32	60 ab	-	-	32	88 a	33	82 bc
RA8 ²	30	0 c	31	7 b	32	0 b	32	27 cde	-	-	33	35 c	32	67 c
FO1 ²	33	0 c	32	10 b	31	5 b	32	23 def	-	-	33	26 c	32	78 bc
RA9 ²	32	0 c	32	0 b	32	0 b	32	12 efg	-	-	11♂ 9♀	♂ 90 a ♀ 7 c	32	79 bc
RA6 ²	32	0 c	30	0 b	-	-	13♂ 18♀	♂ 46 bcd ♀ 0 g	-	-	17♂ 16♀	♂ 88 a ♀ 51 bc	28	71 c
RA7 ²	32	0 c	32	0 b	32	10 b	31	8 fg	-	-	32	81 a	33	83 bc
2004	N° Larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° Larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° larve	% Abbott	N° Larve	% Abbott	N° larve	% Abbott
GMG ¹	32	89 a	32	71 a	-	-	32	86 a	32	93 a	32	96 a	32	93 a
RA13 ³	31	57 b	30	34 b	-	-	32	76 ab	-	-	-	-	-	-
RA12 ²	-	-	15	20 bc	-	-	32	53 b	-	-	-	-	-	-
RA11 ²	19	16 c	32	13 bc	-	-	32	41 b	-	-	-	-	-	-
RA10 ²	32	21 c	32	3 c	-	-	32	0 c	32	34 b	32	54 b	16♂ 16♀	♂ 100 a ♀ 67 b

¹ Popolazione sensibile di laboratorio; ² Azienda a difesa chimica; ³ Azienda ad agricoltura biologica

Le popolazioni del 2003 possono essere distinte in 3 gruppi: il primo gruppo, GMG e RE1, è molto sensibile a fosfororganici, RCI, thiacloprid e spinosad. Le due popolazioni provengono rispettivamente dall'allevamento originato da individui reperiti in frutteti abbandonati e da un'azienda con danni alla raccolta imputabili ad una gestione non ottimale della difesa. Il secondo gruppo, costituito dalle popolazioni RA3, RA5 e BO14, risulta essere poco sensibile ad azinphos-methyl e chlorpyrifos, ma suscettibile ai RCI e a thiacloprid e spinosad. In tali aziende, per quanto è stato possibile conoscere, le strategie di difesa sono normalmente basate sull'impiego di esteri fosforici. Le popolazioni del terzo gruppo, ovvero RA8, FO1, RA9, RA6 e RA7, presentano i valori più bassi di suscettibilità sia ai fosfororganici che ai RCI. La riduzione di sensibilità interessa in parte anche i nuovi larvicidi. In questo gruppo di aziende la difesa contro carpocapsa è stata effettuata negli ultimi anni sia con RCI che con fosfororganici.

I risultati ottenuti nei biosaggi del 2004 indicano la maggiore sensibilità delle popolazioni GMG e RA13 alle sostanze attive in prova, sebbene in RA13 l'efficacia di azinphos methyl e clorpyrifos differisca in maniera significativa da GMG. Le popolazioni RA10, RA11 e RA12 risultano essere poco suscettibili a fosfororganici e regolatori della crescita. Inoltre in RA10 la suscettibilità a thiacloprid e spinosad è ridotta, anche se per quest'ultima sostanza attiva la diminuzione di efficacia interessa solamente le femmine.

Prove di campo

Nel rilievo eseguito il 24 giugno nell'azienda RA7 (tabella 5), si registra un attacco sul testimone molto grave con quasi il 30% di frutti colpiti. In tale situazione si evidenzia in modo chiaro un caso di resistenza pratica a diflubenzuron e metoxifenoziide. Un simile risultato per diflubenzuron era stato rilevato già in passato in un'analogia prova sperimentale condotta in provincia di Ferrara (Boselli e Vergnani, 2001).

Tabella 5 – Risultati del rilievo del 24 giugno (Az. RA7) e del 28 giugno (Az. RA3)

Tesi	Azienda RA7		Azienda RA3	
	% frutti colpiti	% efficacia (Abbott)	% frutti colpiti	% efficacia (Abbott)
Testimone	28,7 B*	---	5,8 B*	
Dimilin	30,5 B	- 6	0,8 A	86
Prodigy	25,5 B	11	0,0 A	100
Cascade	7,5 A	74	0,2 A	96
Dursban 75 WG	10,5 A	63	7,0 B	0
Azin PB	6,5 A	77	1,8 A	69
Laser	9,2 A	68	1,0 A	83
Calypso	5,2 A	82	0,2 A	96

* Test di separazione delle medie SNK. Le medie contrassegnate con la stessa lettera non differiscono tra loro per $P \leq 0,05$

Per quanto riguarda il flufenoxuron, l'analisi statistica evidenzia per quanto riguarda l'efficacia, una differenza significativa rispetto al diflubenzuron. Un'alta sensibilità a flufenoxuron da parte di popolazioni resistenti di *Carpocapsa* ad altri RCI è stata già descritta in Francia e spiegata con l'elevata attività larvicida di questo prodotto che probabilmente ha un meccanismo di azione o di assorbimento diverso dagli altri regolatori (Sauphanor *et al.*, 1998b). Tutti gli altri prodotti larvicidi hanno evidenziato una buona efficacia, anche in relazione al fortissimo attacco rilevato sul testimone.

Nell'altra azienda oggetto della sperimentazione (RA3), l'infestazione contrariamente alle attese è stata più bassa del previsto. Nel testimone non trattato si è registrato un attacco di poco inferiore al 6% (tabella 5), in ogni caso sufficiente a fornire utili indicazioni. A differenza dell'azienda precedente in questo caso i RCI manifestano un'elevatissima efficacia mentre, al contrario, nella tesi trattata con chlorpirifos si registrano danni superiori al testimone. Risultati migliori sono invece forniti da azinphos-metile, mentre spinosad e thiacloprid confermano ancora una volta la loro ottima efficacia nei confronti delle larve di *carpocapsa*.

Confronto biosaggi di laboratorio e prove di campo

L'impostazione dell'attività di ricerca ha permesso di confrontare i risultati dei biosaggi di laboratorio con quelli delle prove di campo (figure 1 e 2) delle popolazioni RA3 e RA7. I due tipi di dati sono infatti espressi in termini omogenei di mortalità corretta (Abbott, 1925); in campo sono state utilizzate le stesse sostanze attive testate in laboratorio a cui sono stati aggiunti methoxyfenozide e flufenoxuron. Le prove di campo sono state effettuate sulla generazione di carpocapsa successiva alla generazione svernante sottoposta ai trattamenti in laboratorio. Nella popolazione RA7 alla ridotta sensibilità dei RCI diflubenzuron e tebufenozide ottenuta nei biosaggi, corrisponde un altrettanto scarsa efficacia in campo dei formulati contenenti diflubenzuron e methoxyfenozide. Per contro, flufenoxuron, nella applicazione di campo, rimane tra i prodotti più efficaci grazie alle sue caratteristiche già discusse in precedenza. Ambedue i fosfororganici azinphos-methyl e chlorpyrifos presentano risultati discordanti: elevata efficacia in campo e attività nulla in laboratorio. Infine thiacloprid e spinosad sono risultati egualmente efficaci sia in campo che in laboratorio.

Per quanto riguarda la popolazione RA3 ad una buona sensibilità a diflubenzuron e tebufenozide riscontrata nei biosaggi, corrisponde un'altrettanto elevata efficacia in campo dei formulati contenenti diflubenzuron, methoxyfenozide e flufenoxuron. Chlorpyrifos presenta un'attività nulla in entrambi i tipi di prove, mentre per azinphos-methyl una discreta efficacia nella prova di campo non concorda con la ridotta attività rilevata nei biosaggi. Infine, anche su questa popolazione, thiacloprid e spinosad sono risultati egualmente efficaci sia in laboratorio che in campo.

Figura 1 - Azienda RA 7. Confronto fra l'efficacia degli insetticidi nella prova di campo e nei biosaggi di laboratorio: tutti i dati sono espressi come mortalità corretta (Abbott). Se non sono presenti valori di efficacia, il biosaggio o la prova di campo non sono stati eseguiti

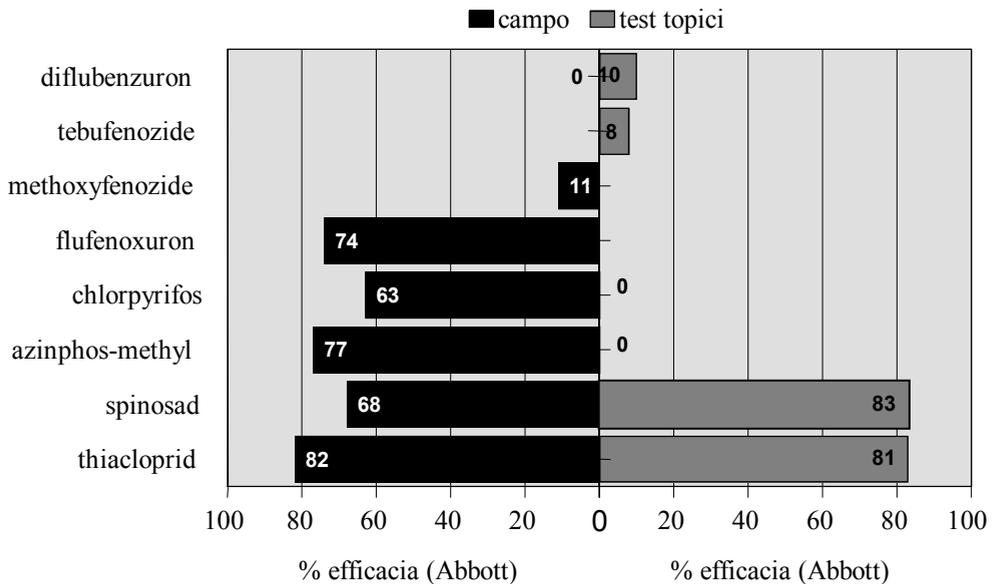
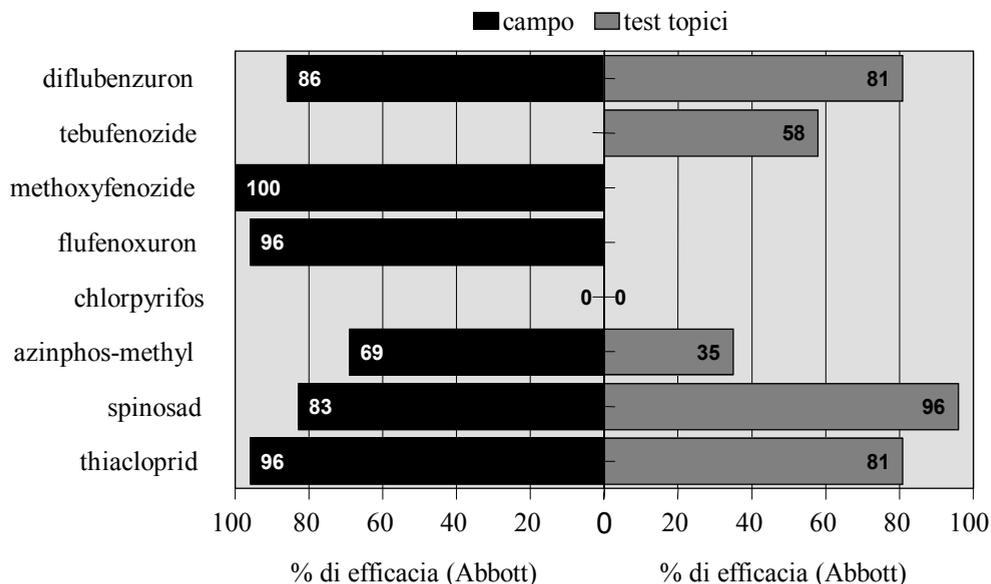


Figura 2 - Azienda RA 3. Confronto fra l'efficacia degli insetticidi nella prova di campo e nei biosaggi di laboratorio: tutti i dati sono espressi come mortalità corretta (Abbott). Se non sono presenti valori di efficacia, il biosaggio o la prova di campo non sono stati eseguiti



CONCLUSIONI

I risultati dei test di applicazione topica su larve svernanti condotte su 13 popolazioni di *Cydia pomonella* provenienti da aziende caratterizzate da elevati danni alla raccolta, evidenziano una più o meno marcata riduzione di sensibilità a RCI e fosfororganici rispetto a quanto osservato sulla popolazione sensibile di riferimento. Per alcune popolazioni la riduzione di sensibilità in laboratorio interessa anche thiacloprid e spinosad. Le prove parcellari condotte parallelamente ai biosaggi hanno permesso di raffrontare le indicazioni dei test con l'efficacia dei prodotti in campo e valutare quindi la "resistenza pratica" intesa come riduzione dell'efficacia in campo dovuto a un cambiamento di sensibilità. Infatti nonostante la resistenza ad una sostanza attiva possa spesso essere dimostrata in laboratorio, ciò non significa necessariamente che l'efficacia in campo sia ridotta (OEPP/EPP, 2004). Le prove parcellari hanno confermato la presenza di resistenza pratica a diflubenzuron, methoxyfenozide e chlorpyrifos. Dall'attività svolta emerge quindi che per i RCI esiste una forte correlazione tra i risultati dei biosaggi e l'efficacia in campo, sia su popolazioni sensibili che su quelle resistenti. Il test di applicazione topica su larve svernanti risulta pertanto validato dal presente studio come mezzo di monitoraggio della resistenza pratica; si precisa che a tale considerazione sfugge flufenoxuron per il quale non è disponibile il test; il prodotto ha comunque dimostrato una buona efficacia in campo su popolazioni resistenti agli altri RCI. Anche la correlazione tra i risultati di laboratorio e campo per thiacloprid e spinosad risulta soddisfacente ma la validazione, per essere definitiva, dovrà essere effettuata anche su popolazioni resistenti. Infine, nei casi esaminati, la scarsa sensibilità a chlorpyrifos e azinphos-methyl risultante dai biosaggi non è indicativa della resistenza pratica in quanto l'efficacia valutata in campo, in alcuni casi, risulta essere soddisfacente.

LAVORI CITATI

- Abbott W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 256-267.
- AA. VV., 2001. Focus Carpocapsa. *Informatore fitopatologico*, 6, 33-49.
- Boselli M., Vergnani S., 2001. Attività di alcuni insetticidi nei confronti della prima generazione di *Cydia pomonella* L.. *Informatore fitopatologico*, 6, 40-46.
- Charmillot P.-J. et al., 2003. Résistance du carpocapse *Cydia pomonella* aux insecticides. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 35(6), 363-368.
- Ioriatti C., Bouvier J.C., Butturini A., Cornale R., Tiso R., 2003. Carpocapsa: la situazione della resistenza ad azinphos methyl e diflubenzuron in Trentino ed Emilia Romagna. *Informatore fitopatologico*, 1, 53-59.
- OEPP/ EPPO, 2004. Efficacy evaluation of plant protection products - Resistance Risk Analysis PP 1/213 (2). *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, Paris, France, 1, 76-93.
- Pasquier D., Charmillot P.J., 2004. Effectiveness of twelve insecticides applied topically to diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* L.. *Pest-Management-Science.*, 60(3), 305-308.
- Riedl H., Zelgher R., 1994. Erste Ergebnisse der Untersuchungen zur resistenz des Apfelwicklers gegenüber Diflubenzuron. *Obstbau-Weinbau*, 31, 107-109.
- Sauphanor B., Bouvier J.C., Avilla J., Charmillot P.J., Ioriatti C., Matias C., Waldner W., 1998 a. Coping with insecticide resistance in fruit production: the example of codling moth resistance in Europe. In: *Vth European Congress of Entomology, Budejovice (Tchéquie)*, August 23-29, 1998 (Brunnhofner V. and Soldan T. coord.) Inst. Entomol. Acad. Sc. Czech Republic and Univ. South Bohemia, Jeronymova, 619-620.
- Sauphanor B., Brosse V., Monier C., Bouvier J.C., 1998 b. Differential ovicidal and larvicidal resistance to benzoylureas in the codling moth *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* 88, 247 – 253.