

SCREENING MOLECOLARE RELATIVO ALLA DIFFUSIONE DI MUTAZIONI MACE, *KDR* E SUPER-*KDR* IN POPOLAZIONI ITALIANE DELL'AFIDE VERDE DEL PESCO (*MYZUS PERSICAE*)

A. CRINITI⁽¹⁾, S. CASSANELLI⁽¹⁾, E. MAZZONI⁽²⁾, D. BIZZARO⁽³⁾, G.C. MANICARDI⁽¹⁾

⁽¹⁾Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia, manicardi.giancarlo@unimore.it

⁽²⁾Istituto di Entomologia e Patologia vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia emanuele.mazzoni@unicatt.it

⁽³⁾Istituto di Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia d.bizarro@univpm.it

RIASSUNTO

L'afide verde del pesco (*Myzus persicae*) per l'importanza agronomica e le conoscenze di base già acquisite in relazione alla resistenza sviluppata nei confronti di diversi principi attivi, si candida a insetto modello per una moderna difesa delle colture guidata dall'esperienza di diagnostica sviluppata in laboratorio. In questo lavoro abbiamo svolto uno screening molecolare mediante RFLP-PCR che ci ha permesso di identificare, in una sola reazione di amplificazione a partire da DNA genomico, la contemporanea presenza delle mutazioni responsabili del fenotipo MACE e del fenotipo *kdr*. I ceppi *kdr* positivi sono stati sottoposti a sequenziamento diretto allo scopo di identificare la presenza di eventuali mutazioni super-*kdr*. Queste tecniche molecolari ci hanno permesso di condurre uno screening rapido e relativamente poco costoso in grado di fornire una visione globale della presenza e della diffusione di queste mutazioni nelle popolazioni italiane di *M. persicae* allo scopo di indirizzare gli operatori del settore verso l'utilizzo dell'insetticida più appropriato.

Parole chiave: resistenza agli insetticidi, screening, MACE, *kdr*, *Myzus persicae*

SUMMARY

MOLECULAR SCREENING REGARDING MACE, *kdr* AND super-*kdr* MUTATIONS IN ITALIAN POPULATIONS OF THE PEACH POTATO APHID (*MYZUS PERSICAE* SULZER)

The peach potato aphid (*Myzus persicae*), considering both its outstanding position as pest crops and the scientific background regarding the insecticide resistance mechanisms, represents an important tool for pest management programs guided by laboratory expertise. In this connection we have carried out a molecular screening by RFLP-PCR which allowed us to identify, starting from genomic DNA, the presence at the same time of the mutation in the AChE gene conferring resistance to carbamates and the *kdr* phenotype which is at the basis of pyrethroids resistance. Moreover the *kdr* positive strains have been analysed for the presence of super-*kdr* mutation by mean of direct sequencing. Data regarding the presence and the distribution in Italian orchards of these mutations, which have been never investigated in Italian population of *M. persicae*, could help farmers in the selection of pest management strategies.

Keywords: pesticide resistance, screening, MACE, *kdr*, *Myzus persicae*

INTRODUZIONE

La resistenza agli agrofarmaci è il maggiore ostacolo al controllo degli organismi dannosi per l'agricoltura. Si tratta di un problema di rilevanza mondiale che, tra gli artropodi, interessa in particolare insetti ed acari. La comparsa di popolazioni resistenti comporta un aumento

della frequenza dei trattamenti e delle dosi applicate dell'antiparassitario. Il problema è aggravato dalle difficoltà e dai costi che lo sviluppo di nuovi insetticidi comporta. Solo una profonda conoscenza dei meccanismi che sono alla base della comparsa di organismi resistenti può consentire di mettere in atto strategie in grado di ostacolare l'insorgere di questi fenomeni mantenendo più a lungo nel tempo l'efficacia dei prodotti ed eventualmente fornendo indicazioni utili per lo sviluppo di nuove molecole insetticide.

L'afide verde del pesco (*Myzus persicae* Sulzer) è una specie cosmopolita e polifaga in grado di danneggiare numerosissime specie vegetali di rilevante importanza economica tra cui il pesco, la barbabietola, la patata, il tabacco, ecc.

I danni causati sono dovuti sia alla sottrazione di linfa e all'inoculo di saliva che alla trasmissione di oltre un centinaio di virus fitopatogeni. L'uso su larga scala di insetticidi ha determinato la rapida comparsa di popolazioni resistenti ai prodotti chimici più comunemente impiegati.

I primi casi di insensibilità ai trattamenti in questa specie sono stati riscontrati in Gran Bretagna negli anni '70 sia in colture di serra (Needham e Sawicki, 1971) che in colture erbacee di pieno campo come la barbabietola e, successivamente segnalati, in tutta Europa, Italia compresa (Mazzoni e Cravedi, 2002).

In *M. persicae* sono noti 4 meccanismi principali di resistenza agli antiparassitari:

1) amplificazione dei geni che codificano per le carbossilesterasi E4/FE4 e che consentono il sequestro e la detossificazione di insetticidi fosfororganici, carbammati e piretroidi (Needham e Sawicki, 1971, Devonshire and Moores, 1982, Field e Foster 2002, Bizzaro *et al.*, 2005).

2) mutazioni puntiformi dei geni per i canali del sodio (*kdr*) che determinano la resistenza a DDT e piretroidi (fenotipo *kdr*) (Martinez-Torres *et al.*, 1997; Anstead *et al.*, 2005);

3) acetilcolinesterasi insensibile ai dimetilcarbammati (fenotipo MACE) (Moores *et al.*, 1994; Nabeshima *et al.*, 2003);

4) recettori GABA mutati (*rdl*, dal gene "Resistance to dieldrin" che risulta mutato) che permettono di resistere ad insetticidi ciclodienici (Anthony *et al.*, 1998). Tali prodotti non sono utilizzati in Italia, tuttavia questo meccanismo di resistenza può coinvolgere altri insetticidi che agiscono sullo stesso sito bersaglio come ad esempio i fenilpirazoli.

Recentemente è stato messo a punto un metodo di screening molecolare, rapido e relativamente poco costoso, che permettere la contemporanea identificazione della mutazione S431F nel gene AChE-2 (fenotipo MACE) e della mutazione responsabile del fenotipo *kdr* (Cassanelli *et al.*, 2005).

Applicando questa tecnica a varie popolazioni dell'afide verde, si sono volute integrare le informazioni ottenute con metodiche biologiche e biochimiche, (Mazzoni e Cravedi, 2002; Bizzarro *et al.*, 2005) per completare il quadro della distribuzione delle principali forme di resistenza agli insetticidi in Italia.

MATERIALI E METODI

Presso l'Istituto di Entomologia e Patologia vegetale dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza è stata allestita una collezione di 59 popolazioni di *M. persicae* attraverso campionamento di campo in diverse regioni Italiane. Le colonie sono state allevate in laboratorio su piantule di pisello, alla temperatura di 21°C e con fotoperiodo 16:8 (luce:buio). Per l'estrazione del DNA necessario alla identificazione delle mutazioni si è messo a punto un protocollo di estrazione basato sulla resina Chelex. L'individuazione a livello molecolare della mutazione AChE-2 (S431F) responsabile della resistenza agli insetticidi dimetilcarbammati, ha richiesto la progettazione di una coppia di primers specifici, effettuata mediante

multiallineamento delle sequenze di cDNA riportate in GenBank (Nabeshima *et al.*, 2003). Per verificare la presenza delle mutazioni del canale del sodio (*kdr* e *super-kdr*) conferente insensibilità ai piretroidi si è proceduto al clonaggio *ex-novo* del frammento di DNA corrispondenti al dominio IIS5-6 della proteina (Cassanelli *et al.*, 2005).

Lo screening delle mutazioni S431F e *kdr* è stato allestito tramite RFLP-PCR, che permette la contemporanea amplificazione tramite PCR delle regioni dei geni AChE e del canale del sodio potenzialmente interessate delle due mutazioni, la successiva digestione dei prodotti di amplificazione, in singola reazione, con gli enzimi di restrizione BssSI e SspI e infine la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione in gel di agarosio-nusieve.

Dal momento che tutti i dati bibliografici disponibili (Anstead *et al.*, 2005) indicano che la mutazione *super-kdr* è sempre associata alla contemporanea presenza della mutazione *kdr*, solo i ceppi *kdr+* sono stati sottoposti a sequenziamento diretto per la ricerca della mutazione *super-kdr*, la quale non è identificabile mediante la tecnica RFLP-PCR.

RISULTATI

I risultati ottenuti nel corso di questa indagine sono rappresentati nelle tabelle 1 e 2. L'analisi dei dati permette di evidenziare che il 56,7% delle popolazioni analizzate è risultato *kdr* positivo e che il 26,5% di questi ceppi presenta anche la mutazione *super-kdr*, che non era mai stata segnalata in popolazioni italiane. La mutazione a carico del gene AChE-2, responsabile della resistenza ai dimetilcarbammati è presente nel 29,3% dei ceppi analizzati. Da segnalare ancora che nel 18,3% delle popolazioni sono contemporaneamente presenti le mutazioni responsabili dei fenotipi *kdr* e MACE e in 3 casi (pari al 5% delle popolazioni totali) queste mutazioni sono associate alla mutazione *super-kdr*.

Tabella 1 - Distribuzione delle mutazioni S431F (MACE), *kdr* e *super-kdr* nelle popolazioni dell'Italia centro-meridionale

popolazione n	mutazione			origine	
	S431F	KDR	sKDR	provincia	ospite
26	S/S	S/S		PI	pesco
52	S/S	S/S		CH	tabacco
56	S/S	S/S		PE	tabacco
57	S/S	S/S		PE	tabacco
58	S/R	S/R	S/R	AP	pesco
64	S/S	S/S		CH	pesco
65	S/S	S/S		CH	pesco
66	S/S	S/R	S/S	CH	pesco
22	S/R	RR	S/R	CS	pesco
23	S/R	S/S		CZ	patata
34	S/R	R/R	S/S	CZ	pesco
48	S/S	S/S		BN	tabacco
49	S/S	S/S		SA	tabacco
50	S/S	S/S		SA	tabacco
51	S/S	S/S		SA	tabacco
70	S/R	R/R	S/S	CS	pesco

Tabella 2 - Distribuzione delle mutazioni S431F (MACE), kdr e super-kdr nelle popolazioni dell'Italia settentrionale

popolazione n	mutazione			origine	
	S431F	KDR	sKDR	provincia	ospite
3	S/S	S/R	S/S	BO	pesco
4	S/S	S/R	S/R	RA	pesco
6	S/R	S/R	S/S	PC	pesco
8	S/R	S/R	S/S	RA	pesco
10	S/R	S/R	S/S	PC	pesco
11	S/S	R/R	S/R	FE	pesco
12	S/R	S/S		FE	pesco
14	S/R	S/S		CN	pesco
15	S/R	S/S		RA	pesco
16	S/S	S/S		PC	pesco
17	S/S	S/R	S/S	PC	pomodoro
18	S/S	S/R	S/S	RA	pesco
19	S/S	S/S		PC	pomodoro
20	S/S	S/R	S/S	RA	pesco
24	S/S	S/R	S/S	BO	pesco
27	S/R	S/S		RA	pesco
28	S/S	S/R	S/S	RA	pesco
31	S/S	S/S		PC	pomodoro
32	S/S	S/S		PC	pomodoro
35	S/S	S/R	S/S	FE	pesco
36	S/S	S/R	S/S	FE	pesco
37	S/S	S/R	S/S	FE	pesco
38	S/S	S/R	S/S	RA	pesco
39	S/R	S/R	S/S	FC	pesco
40	S/S	S/R	S/S	PC	pomodoro
41	S/S	S/S		PC	pesco
42	S/S	S/R	S/S	RA	pesco
43	R/R	S/R	S/S	RA	pesco
44	S/S	S/S		RA	pesco
45	S/S	S/S		BO	pesco
46	S/S	R/R	S/R	TO	pesco
47	S/S	R/R	S/R	TO	pesco
53	S/S	S/R	S/S	TO	pesco
54	S/S	S/R	S/S	PD	pesco
55	S/R	S/S		PD	pesco
59	S/S	S/S		BO	pesco
61	S/R	S/S		RA	pesco
62	S/S	S/R	S/R	RA	pesco
63	S/R	S/R	S/S	CO	pesco
67	S/S	S/R	S/R	PC	pesco
68	S/R	R/R	S/R	BO	pesco
69	S/S	S/R	S/S	PC	melanzana
71	S/S	S/R	S/S	FE	pesco

CONCLUSIONI

I dati presentati in questo lavoro mostrano per la prima volta in popolazioni italiane la presenza e la diffusione delle mutazioni responsabili dei fenotipi *kdr* e MACE. L'analisi di questi dati, evidenzia la larga diffusione delle mutazioni *kdr* responsabili della resistenza ai piretroidi. Nonostante gli insetticidi di questa classe non siano normalmente inseriti nei disciplinari di lotta integrata, non bisogna tuttavia dimenticare che il loro impiego contro *M. persicae* è largamente diffuso in forme più tradizionali di frutticoltura. Inoltre le pietrine naturali, che sono tra i pochi prodotti insetticidi ammessi in agricoltura biologica, hanno lo stesso sito bersaglio dei piretroidi di sintesi. Pertanto la presenza di mutazioni *kdr* può costituire una ulteriore difficoltà contro la quale entrambe queste forme di agricoltura dovranno confrontarsi.

Più contenute ma comunque diffuse su tutto il territorio nazionale sono le mutazioni che determinano il fenotipo MACE. L'analisi molecolare conferma quanto già evidenziato a proposito di questo meccanismo di resistenza con tecniche biochimiche e biologiche (Mazzoni e Cravedi, 2002). Questa forma di resistenza riguarda gli insetticidi della classe dei dimetilcarbammati e la sua diffusione in passato ha notevolmente ridotto l'impiego in Italia di questi prodotti, principalmente il pirimicarb, che erano tuttavia in grado di superare la resistenza mediata dalle esterasi E4/FE4. Attualmente, in molte situazioni, l'impiego di questa molecola contro quelle popolazioni che non sono portatrici della mutazione potrebbe costituire una valida alternativa ad altri principi attivi (Cravedi e Mazzoni, 2000).

Da queste considerazioni deriva l'importanza applicativa dei risultati ottenuti. Dal momento che le resistenze "target-site insensitivity" come "MACE" e "*kdr*" sono in grado di vanificare l'impiego di intere classi di insetticidi, la possibilità di identificare la loro presenza e diffusione può aiutare gli operatori del settore verso una scelta ragionata delle strategie di controllo delle popolazioni dell'afide verde che tengano anche in debito conto la necessità di non favorire o far regredire la resistenza.

Questo può quindi migliorare l'efficacia dei trattamenti consentendo di utilizzare, con la sicurezza di ottenere buoni risultati, anche prodotti "più datati" per alternarli ai principi attivi di più recente introduzione e dei quali occorre conservare, il più a lungo possibile l'efficacia.

LAVORI CITATI

- Anstead J.A., Williamson M.S., Denholm I., 2005. Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35, 249-256.
- Anthony N., Unruh T., Ganser D., French-Constant R., 1998. Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid *Myzus persicae*. *Mol. Gen. Genet.*, 260, 165-175.
- Bizzaro D., Mazzoni E., Barbolini E., Giannini S., Cassanelli S., Pavesi F., Cravedi P., Manicardi G., 2005. Relationship among expression, amplification, and methylation of FE4 esterase genes in Italian populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Pest. Biochem. Physiol.*, 81, 51-58.
- Cassanelli S., Cerchiarì B., Giannini S., Bizzaro D., Mazzoni E., Manicardi G. 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and KDR insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.* 61, 91-96.
- Cravedi P., Mazzoni E., 2000. Resistenza agli insetticidi. Le basi biochimiche e genetiche, le tecniche d'indagine, le nuove problematiche. *Informatore Fitopatologico*, 10, 48-51.

- Devonshire A.L., Moores G.D., 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids. *Pest Biochem. Physiol.*, 18, 235-246.
- Field L.M., Devonshire A.L., Forde B.G., 1988. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulzer) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.*, 251, 309-312.
- Field L.M., Foster S.P., 2002. Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag. Sci.*, 58, 889-894.
- Martinez-Torres D., Devonshire A.L., Williamson M.S., 1997. Molecular genetic studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. *Pestic. Sci.*, 51, 265-270.
- Mazzoni E., Cravedi P., 2002. Analysis of insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards. *Pest Manag. Sci.*, 58, 975-980.
- Moores G.D., Devine G.J., Devonshire A.L., 1994. Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pest Biochem. Physiol.*, 49, 114-120.
- Nabeshima T., Kozaki T., Tomita T., Kono Y., 2003. An aminoacid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 307, 15-22.
- Needham P.H., Sawicki R.M., 1971. Diagnosis of resistance to organophosphorus insecticides in *Myzus persicae* (Sulzer). *Nature*, 230, 125-126.