MONITORAGGIO DELLA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI IN POPOLAZIONI EMILIANO-ROMAGNOLE DI CARPOCAPSA CON METODI BIOCHIMICI E MOLECOLARI

S. CASSANELLI[1], M. RIVI[1], A. BUTTURINI[2], M. MELANDRI[3], G. CASALI[3], L. ZANZI[3], M. PAGNI[3], G. PRADOLESI[3], G.C. MANICARDI[1]
[1] Dipartimento di Scienze Agrarie e degli Alimenti, Università di Modena e Reggio Emilia Via Amendola, 2, Padiglione Besta, 42100 Reggio Emilia
[2] Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna - Via di Saliceto, 81, 40128 Bologna
[3] Terremerse Soc. Coop. - Via Cà del Vento, 21, 48012 Bagnacavallo (RA)
giancarlo.manicardi@unimore.it

RIASSUNTO

La carpocapsa (*Cydia pomonella*) è il fitofago più dannoso per le colture di pero e melo tanto che, in assenza di controllo fitosanitario, può provocare danni notevoli che possono arrivare alla distruzione dell'intero raccolto. In questo lavoro sono illustrati i risultati relativi al monitoraggio della resistenza agli insetticidi fosforganici (OPs) e ai regolatori della crescita (IGRs) in popolazioni emiliano-romagnole di *C. pomonella*, mediante l'impiego combinato di analisi biochimiche, volte a saggiare le principali attività detossificanti, e di analisi genetiche, che prevedono la ricerca di eventuali mutazioni nel gene che codifica per l'acetilcolinestarasi 1 (AChE-1). Nelle popolazioni esaminate, la ridotta suscettibilità ai trattamenti sembra essere attribuibile in prima istanza alle MFO e in seconda battuta alle GST e meno frequentemente alle EST, con incrementi e variabilità intrapopolazione in funzione della eterogeneità genetica e dell'effettiva pressione selettiva esercitata in campo. Il profilo metabolico riscontrato concorda con quanto riportato in letteratura per le popolazioni europee di carpocapsa con una ridotta sensibilità ai trattamenti, che prevedono l'uso alternato di OP e IGR. Da segnalare che nessuna delle popolazioni di carpocapsa analizzate presenta mutazioni *target site* a carico del gene AChE-1.

Parole chiave: carpocapsa, resistenza, test biochimici, mutazioni *target-site*

SUMMARY

MONITORING INSECTICIDE RESISTANCE IN EMILA-ROMAGNA POPULATIONS OF CODLING MOTH BY MEANS OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ASSAYS

In this paper we show data dealing with the monitoring of insecticide resistance against both organophosphates (OPs) and IGR in codling moth populations collected in Emilia-Romagna orchards. In this context, we carried out biochemical analyses in order to put in evidence the presence and the diffusion of the so called "metabolic resistance" together with a molecular assay aimed to allow the identification of target-site resistance within the coding sequence of the AChE-1 gene. In all the populations analysed, the reduced susceptibility to insecticide treatments seems to be mainly caused by an increased MFO activity with a minor extent of GST. The involvement of esterase activity seems a rare phenomenon. In all cases we found high intra-population variability due both to genetic heterogeneity and different pest management strategies followed in different orchards. The metabolic profile emerging from our analyses results in agreement with data reported in literature for codling moth populations showing a reduced susceptibility to pesticide treatments based on alternate use of organophosphates and IGR. It must be stressed that none of the populations analysed possess target-site mutations within AChE-1 sequence.

Keywords: Codling moth, insecticide resistance, biochemical assays, target site mutations

INTRODUZIONE

La carpocapsa (*Cydia pomonella*) è senza dubbio il fitofago più dannoso, a livello mondiale, per la produzione delle pomacee. La specie, che ha esclusivamente abitudini carpofaghe, ha infatti come ospiti principali melo e pero ma può comunque vivere a spese anche di altri fruttiferi (ad esempio noce ma anche albicocco, susino e pesco). I danni prodotti variano in funzione delle aree geografiche e delle condizioni climatiche ma, in assenza di specifici interventi, possono arrivare a compromettere l'intero raccolto.

Le popolazioni di carpocapsa sono prevalentemente contenute mediante l'impiego di insetticidi chimici di sintesi, in particolare fosforganici e regolatori di crescita (IGR). Dal momento che il numero di trattamenti può raggiungere i 10-12 interventi per anno, risulta decisamente importante la possibilità di monitorare le popolazioni trattate allo scopo di identificare il possibile sviluppo di resistenze. Le prime segnalazioni di ceppi resistenti risalgono ai primi anni del secolo scorso quando negli USA sono stati riportati casi che riguardavano gli arseniati (Hough, 1928). Successivamente si sono avute varie segnalazioni nelle aree di coltivazione delle pomacee, ma solo nell'ultima decade del secolo scorso il fenomeno ha assunto proporzioni molto gravi e diffuse anche in Europa (Reyes *et al.*, 2007; 2009). I primi casi di resistenza in popolazioni italiane sono stati segnalati, a partire dal 1992, in Alto Adige (Ioriatti e Bouvier, 2000); dal 1997 anche in Emilia-Romagna sono stati accertati casi di resistenza nei confronti di alcuni prodotti chitino-inibitori (diflubenzuron) e di fosforganici (azinphos-metile) ampiamente usati nei programmi di difesa (Ioriatti *et al.*, 2003; Butturini *et al.*, 2006).

La resistenza agli insetticidi in *C. pomonella* in molti casi è causata da meccanismi multipli e relativamente aspecifici. Molte ricerche hanno evidenziato il coinvolgimento di sistemi enzimatici detossificanti/sequestranti basati sulle monoossigenasi a funzione mista (MFO), sulle glutatione s-transferasi (GST) e anche su esterasi (Sauphanor *et al*., 1998; Dunley e Welter, 2000; Boivin *et al*., 2001; Bouvier *et al*., 2001), in relazione allo stadio vitale esaminato (Bouvier *et al*., 2002; Reyes *et al*., 2007). Sono però note anche resistenze "*target-site*" prodotte da mutazioni sia a carico del gene che codifica per la proteina che regola il canale del sodio provocando resistenza nei confronti di insetticidi piretroidi (Brun-Barale *et al*., 2005), sia nella porzione codificante del gene che contiene le informazioni per la sintesi dell'acetilcolinesterasi con conseguente resistenza ad esteri fosforici e carbammati (Cassanelli *et al*., 2006).

Dal momento che solo la conoscenza delle basi genetiche della resistenza ai fitofarmaci e lo sviluppo di una diagnostica dedicata permettono una riduzione dei costi dei trattamenti e dell'impatto ambientale derivante da trattamenti inadeguati, la regione Emilia-Romagna ha finanziato il Progetto di Ricerca "Resistenza di fitofagi ai fitofarmaci" col Coordinamento del CRPV (L.R. 28/98) allo scopo di mettere a punto protocolli in grado di permettere un corretto monitoraggio della resistenza agli insetticidi in popolazioni emiliane di carpocapsa.

Obiettivo di questo lavoro è di presentare i dati preliminari ottenuti nell'ambito di questo progetto mediante l'impiego combinato di analisi biochimiche (valutazione dell'attività EST, GST ed MFO) e analisi genetiche che prevedono la ricerca di eventuali mutazioni target-site nei geni che codificano per l'AChE-1 sia in popolazioni di campo che in popolazioni selezionate in laboratorio.

MATERIALI E METODI

Le popolazioni analizzate sono state raccolte nelle province indicate dalla sigla che le caratterizza e provengono da aziende che sono state segnalate al Servizio Fitosanitario regionale per gli elevati danni riscontrati alla raccolta e per la generale difficoltà di contenimento del fitofago in seguito all'applicazione delle usuali strategie di difesa (IGR e fosforganici). Le popolazioni PC, GOF41 e GOF37 (popolazioni recuperate da coltura biologica ed allevate in laboratorio) sono state utilizzate come controllo.

Le analisi biochimiche e molecolari sono state condotte sia su popolazioni raccolte direttamente da campo (BO20, BO21, RA17) che su popolazioni selezionate in laboratorio (RA10 ed FE6). In particolare la popolazione RA10 è stata selezionata utilizzando due concentrazioni diverse (2,73 e 6 mg di principio attivo/L) di tebufenozide distribuito uniformemente sulla superficie della dieta mediante torre di Potter; FE6 è stata sottoposta a trattamento topico con chlorpyriphos alla concentrazione di 2200 ppm (FE6).

I saggi enzimatici EST, GST ed MFO sono condotti seguendo i metodi descritti da Reyes *et al.* (2007). Sono state esaminate 10 larve per saggio enzimatico.

Il Test di Newman-Keuls è stato adottato per valutare la significatività statistica delle differenze fra le attività enzimatiche dei ceppi analizzati (Statistica 7, StatSoft). Nei grafici ad istogramma, il livello di significatività $p< 0,05$ è indicato col simbolo di asterisco.

Per le analisi molecolari è stata innanzitutto effettuata l'estrazione di RNA totale, per singola larva, con 500 µl di Tri-Reagent (5 larve per ogni ceppo). Successivamente si è proceduto a retrotrascrizione (1 µg RNA tot), amplificazione di tre frammenti parzialmente sovrapposti di cDNA, purificazione, sequenziamento e ispezione della sequenza per ricercare mutazioni del gene. La sequenza nucleotidica di riferimento è quella ricavata da un ceppo sensibile Sv (origine francese) depositata nella banca dati GenBank con il codice di accesso DQ267977.

RISULTATI

Valutazione delle attività enzimatiche detossificanti in larve mature selezionate in laboratorio nei confronti di tebufenozide

L'attività dei sistemi enzimatici detossificanti Esterasi (figura 1), GST (figura 2) e MFO (figura 3) è stata valutata in larve mature provenienti dalla popolazione RA10, dopo selezione delle neonate con due diversi dosaggi di Mimic: 2,73 mg (figure 1a, 2a, 3a) e 6 mg (figure 1b, 2b, 3b) di principio attivo/L distribuito sulla superficie della dieta. Le analisi biochimiche sono state condotte in parallelo sulle popolazioni di riferimento GOF33/PC.

I grafici a seguire mostrano l'attività media e la deviazione standard. L'asterisco * indica la significatività statistica $P<0,05$ (test di Newman-Keuls) rispetto ai livelli enzimatici riscontrati nei ceppi sensibili.

Figure 1-3. Analisi biochimiche condotte su larve mature del ceppo resistente RA10 trattate con Mimic e su larve provenienti dai ceppi sensibili GOF33 e PC

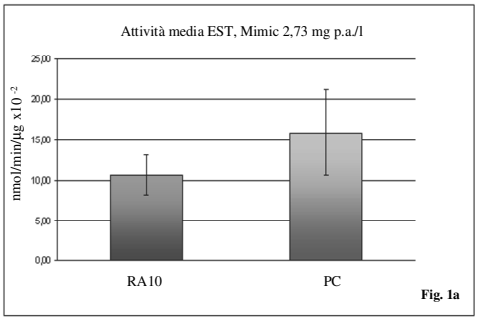


Fig. 1a

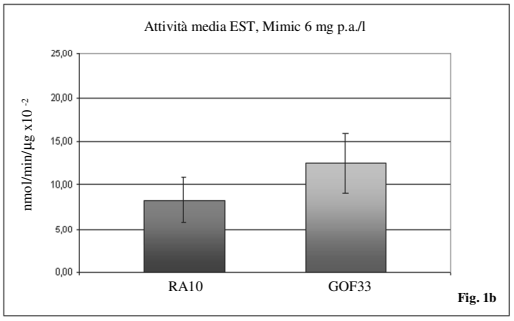


Fig. 1b

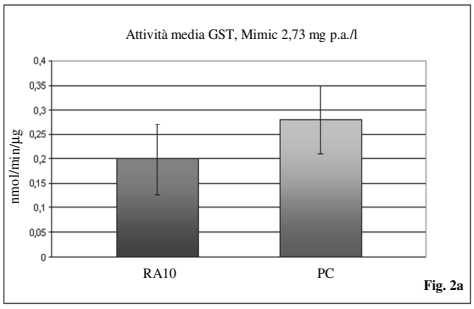


Fig. 2a

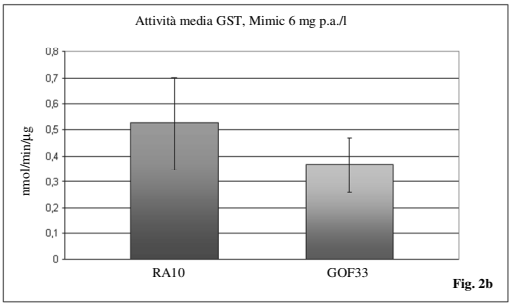


Fig. 2b

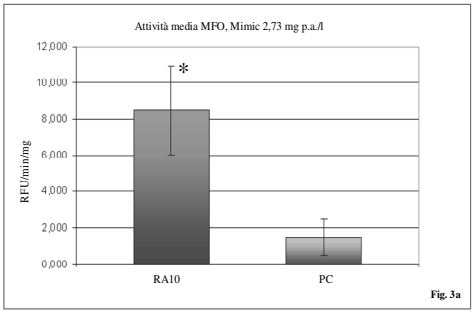


Fig. 3a

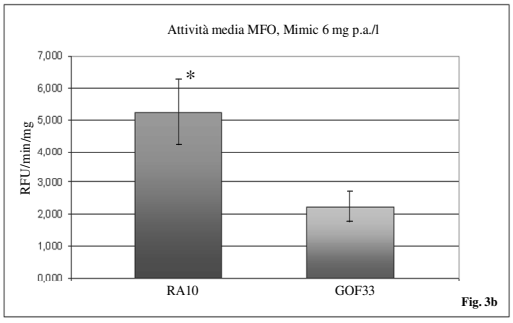
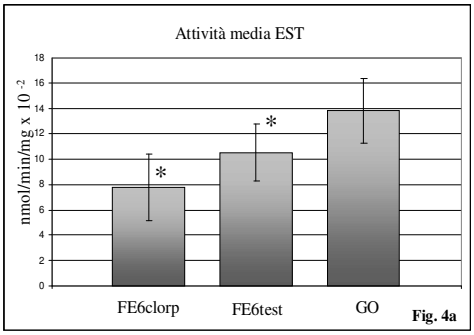


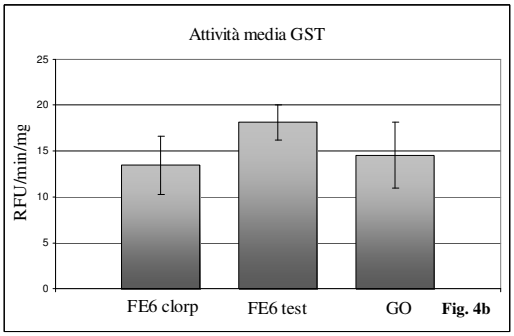
Fig. 3b

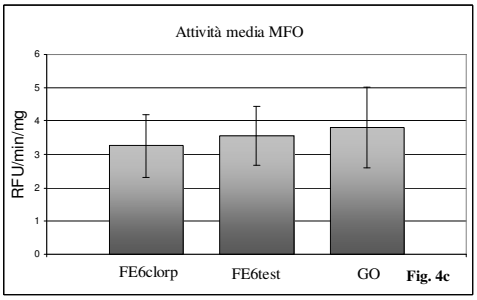
Valutazione delle attività enzimatiche detossificanti in adulti selezionati in laboratorio nei confronti di chlorpyriphos

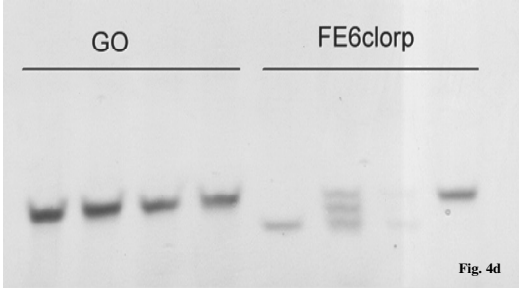
L'attività dei sistemi enzimatici detossificanti Esterasi (figura 4a), GST (figura 4b) ed MFO (figura 4c) è stata valutata in adulti provenienti dalla popolazione FE6, trascorse 72 h dopo selezione topica con chlorpyriphos alla concentrazione di 2200 ppm (FE6clorp) o acetone (FE6test). L'attività esterasica è stata anche analizzata mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide (PAGE) in condizioni native (figura 4d). Le analisi biochimiche sono svolte in parallelo sulla popolazione di riferimento GO (in allevamento). I grafici a seguire mostrano l'attività media e la deviazione standard. L'asterisco * indica la significatività statistica $P<0,05$ (test di Newman-Keuls) rispetto ai livelli enzimatici riscontrati nei ceppi sensibili.

Figura 4. Attività esterasica (4a), GST (4b) ed MFO (4c) valutata su adulti del ceppo resistente FE6 trattati con chlorpyriphos e acetone. Profilo elettroforetico delle esterasi in PAGE nativo (4d). La popolazione GO è stata utilizzata come controllo









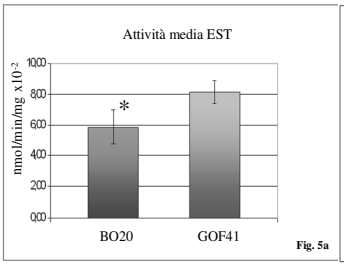
PAGE

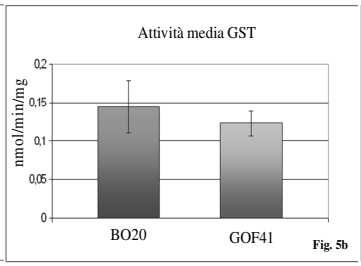
Valutazione delle attività enzimatiche detossificanti in popolazioni di campo

Le popolazioni analizzate: BO20 (figura 5), BO21 e RA17 (figura 6) sono state raccolte nelle province di Bologna e Ravenna e provengono da aziende che sono state segnalate al Servizio Fitosanitario regionale per gli elevati danni riscontrati alla raccolta e per la generale difficoltà di contenimento del fitofago in seguito all'applicazione delle usuali strategie di difesa.

I grafici a seguire mostrano l'attività media e la deviazione standard relative all'attività dei sistemi enzimatici EST (figure 5a e 6a) GST (figure 5b e 6b) e MFO (figure 5c e 6c). L'asterisco * indica la significatività statistica $P<0,05$ (test di Newman-Keuls) rispetto ai livelli enzimatici riscontrati nei ceppi sensibili.

Figura 5. Attività dei sistemi detossificanti EST, GST e MFO valutate in larve post-diapausa della popolazione di campo BO20 e del ceppo di riferimento GOF41





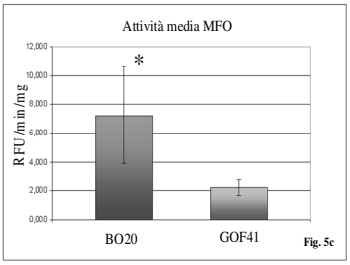


Figura 6. Attività dei sistemi detossificanti EST, GST e MFO valutate in larve post-diapausa delle popolazioni di campo BO21 e RA17 e dei ceppi di riferimento GOF41 e PC

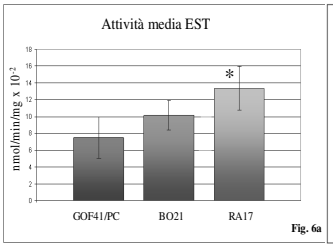


Fig. 6a

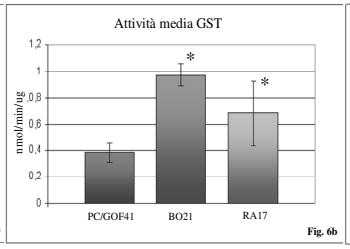


Fig. 6b

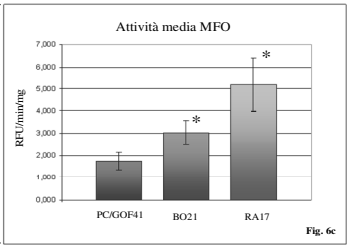


Fig. 6c

Analisi molecolari volte alla ricerca di mutazioni *target site* nel gene AChE-1

Le analisi molecolari condotte su tutte le popolazioni precedentemente riportate non hanno messo in evidenza la presenza di mutazioni nella sequenza del cDNA, che possano indurre sostituzioni aminoacidiche a livello della proteina bersaglio AChE-1, modificandone la sensibilità agli insetticidi organofosforici.

CONCLUSIONI

La selezione con tebufenozide (Mimic) condotta sulla popolazione RA10 non influisce significativamente sulle attività enzimatiche delle glutatione S-trasferasi ed esterasi, anche se, almeno per quest'ultima, la tendenza è ad una sua riduzione (figure 1a e 1b). Il trattamento con questo principio attivo induce invece un aumento significativo della attività MFO (circa 4 volte) col dosaggio del principio attivo meno elevato (figura 3a), mentre l'incremento è ridotto a circa 2,5 volte nelle larve selezionate col dosaggio di 6 mg di p.a./L (figura 3b). I risultati sopra riportati potrebbe essere causati da un effetto tossico del principio attivo applicato al dosaggio più elevato non totalmente compensato dalle maggiori capacità di detossificazione degli individui resistenti. Questa ipotesi è supportata dall'evidente ritardo nei tempi maturazione larvale che si verifica all'aumentare del dosaggio del principio attivo.

La selezione topica con chlorpyrifos o il trattamento con acetone operata su individui adulti non influisce significativamente sulle attività enzimatiche GST e MFO (figure 4b e 4c). L'assenza di una depressione metabolica generalizzata è probabilmente indice di una migliore ottimizzazione della procedura di selezione, rispetto ai tentativi svolti precedentemente. L'unico effetto riscontrabile sull'attività detossificante indotta dal trattamento col chlorpyriphos, riguarda una riduzione dell'attività esterasica di circa 1,7 volte rispetto al controllo (figura 4a). Una riduzione (di circa 1,3 volte) è presente anche nei testimoni trattati col solo acetone. Tale decremento è probabilmente un effetto del precedente ciclo di selezione, dove era già stata riscontrata una tendenza a una diminuzione della attività di questo sistema detossificante negli individui sopravvissuti al trattamento di selezione. Nel complesso, la diminuzione della attività esterasica negli individui selezionati suggerisce la presenza di isoforme modificate con una bassa affinità per il substrato usato per l'analisi, putativamente associabili ad una diversa capacità metabolica nei confronti dell'insetticida. Il profilo elettroforetico in condizioni native, conferma in effetti una minore attività esterasica negli individui selezionati, accompagnata da una elevata eterogeneità delle isoforme presenti (figura 4d). Nonostante il limitato impatto sulle capacità detossificanti indotto dal trattamento col chlorpyrifos, l'elevata mortalità entro le 48-72 ore degli individui resistenti, indica comunque un elevato costo di fitness di questo carattere fenotipico.

Per quanto riguarda le popolazioni di campo, caratteristica comune a tutti i ceppi esaminati è un significativo aumento della attività MFO. Tuttavia le popolazioni si distinguono per il livello di incremento e eterogeneità del campione esaminato. L'aumento più evidente ~ 3 volte rispetto ad un pool di larve sensibili, è riscontrabile nei ceppi BO20 (figura 5c) e RA17 (figura 6c). La popolazione BO21 mostra un incremento più limitato dell'attività MFO (~ 2 volte; figura 6c). Tuttavia l'ampiezza della deviazione standard rivela una elevata eterogeneità nella popolazione BO20. L'attività GST si distingue particolarmente nel ceppo BO21 (figura 6b) dove raggiunge dei valori pari a circa il doppio rispetto a quella dei ceppi sensibili. La popolazione RA17 mostra un andamento meno evidente e con maggiore variabilità (figura 6b), mentre quella misurata in BO20 è sovrapponibile ai ceppi sensibili GOF41 (figura 5b). In individui RA17, è rinvenibile anche un leggero aumento delle esterasi (1,75 volte; figura 6a), che invece mostrano un leggero decremento in BO20 (figura 5a). Limitatamente alle popolazioni esaminate, in condizioni di campo la ridotta suscettibilità ai trattamenti sembra essere attribuibile in prima istanza alle MFO e in seconda battuta alle GST e meno frequentemente alle EST, con incrementi e variabilità intra-popolazione in funzione della eterogeneità genetica e dell'effettiva pressione selettiva esercitata in campo. Il profilo metabolico riscontrato concorda con quanto riportato in letteratura per le popolazioni europee di carpocapsa con una ridotta sensibilità ai trattamenti, che prevedono l'uso alternato di OP e IGR. Il ruolo prevalente della attività detossificante a carico delle MFO è probabilmente riconducibile ad una maggiore copertura offerta da questo sistema detossificante, garantita da un numero maggiore di geni e flessibilità di substrato, rispetto alla famiglia delle glutatione S-trasferasi e delle esterasi o a una resistenza target specifica. L'elevata eterogeneità del profilo biochimico nelle popolazione di campo con difficoltà di controllo è solo in parte dovuta a diversi percorsi di sviluppo della resistenza. I dati sopra riportati sottolineano l'esigenza di semplificare lo studio dei meccanismi di resistenza mediante la creazione di popolazioni modello selezionate in laboratorio, che permettano di isolare i marcatori funzionali legati effettivamente al fenotipo insensibile dal rumore di fondo imposto dalla variabilità genetica.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato tratto dal Progetto di Ricerca "Resistenza di fitofagi ai fitofarmaci" finanziato dalla Regione Emilia-Romagna col Coordinamento del CRPV (L.R. 28/98). Una parte delle analisi è stata condotta grazie ad un finanziamento della Du Pont de Nemours Italiana S.r.l..

LAVORI CITATI

Boivin T., Chabert D'Hieres C., Bouvier J.C., Belsay D., Sauphanor B., 2001. Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella. Entomol. Exp. Appl*. 99, 381-386.

Bouvier J.C., Bues-R., Boivin T., Boundinhon L., Belsay D., Sauphanor B., 2001. Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity*, 87, 456-462.

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

Brun-Barale A., Bouvier J.C., Pauron D., Berge J.B., Benoit S., 2005. Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L., and development of a diagnostic test. *Pest Manag. Sci.*, 61, 549-554.

Butturini A., Caroli L., Boselli M., Fagioli L., 2006. Monitoraggio della resistenza di *Cydia pomonella* agli insetticidi in Emilia-Romagna: test di laboratorio e prove di campo. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1, 29-36.

Cassanelli S., Reyes M., Rault M., Manicardi G.C., Sauphanor B., 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochem Mol Biol,* 36, 642-653.

Dundley E., Welter S.C., 2000. Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera : Tortricidae). *J. Econom. Entomol*. 93, 955-962.

Hough W.S., 1928. Relative resistence to arsenical poisoning of two Codling Moth strains. *Journal of Economic Entomology*, 21(2), 325-329.

Ioriatti C., Bouvier J.C., 2000. La resistenza agli insetticidi: il caso della carpocapsa (Cydia pomonella L.). *Informatore Fitopatologico*, 9, 5-10.

Ioratti 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*, 12, 53-59.

Pasquier D., Charmillot P.J., 2004. Effectiveness of twelve insecticides applied topically to diapausing larvae of the codling moth, Cydia pomonella L.. *Pest Manag. Sci.*, 60 (3), 305-308.

Reyes M., Franck P., Charmillot P.J., Ioriatti C., Olivares J., Pasqualini E., Sauphanor B., 2007. Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the Codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Manag. Sci.*, 63, 890-902.

Reyes M., Franck P., Olivares J., Margaritopoulos J., Knight A., Sauphanor B., 2009. Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bull. Entomol. Res.*, 99, 359-369.

Sauphanor B., Brosse V., Monier C., Bouvier J.C., 1998. Differential ovicidal and larvicidal resistance to benzoylureas in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.*, 88, 247-253.