

RESISTENZA AGLI INSETTICIDI NEONICOTINOIDI IN POPOLAZIONI EMILIANO-ROMAGNOLE DELL'AFIDE VERDE DEL PESCO

E. MAZZONI, M. PANINI, M. ANACLERIO

Istituto di Entomologia e Patologia vegetale – Facoltà di Agraria
Università Cattolica del Sacro Cuore - Via E. Parmense, 84, 29122 Piacenza
emanuele.mazzoni@unicatt.it

RIASSUNTO

Nel corso del 2010-2011 in alcuni pescheti dell'Emilia-Romagna si sono verificati casi di ridotta efficacia dei trattamenti con neonicotinoidi contro l'afide verde del pesco *Myzus persicae* (Sulzer). La risposta ad imidacloprid in 2 di queste popolazioni è stata studiata mediante biosaggi anche impiegando il sinergico piperonilbutossido (PBO). Con tecniche biomolecolari si è inoltre cercata la mutazione responsabile della resistenza "target-site" ai neonicotinoidi. I biosaggi hanno evidenziato fattori di resistenza rispettivamente di circa 12 e di oltre 600. In entrambi i casi il PBO ha ridotto significativamente tali valori, evidenziando il probabile coinvolgimento anche di resistenze metaboliche causate da monossigenasi. Nella popolazione più resistente è stata anche trovata, per la prima volta in Italia, la mutazione responsabile della sostituzione R81T nella sub-unità $\beta 1$ del recettore nicotinico e associata alla resistenza ai neonicotinoidi.

Parole chiave: *Myzus persicae*, piperonilbutossido, recettore nicotinico

SUMMARY

RESISTANCE TO NEONICOTINOID INSECTICIDES IN GREEN PEACH APHID POPULATIONS FROM EMILIA-ROMAGNA

In 2010-2011 in a few peach orchards in Emilia-Romagna some cases of reduced efficacy of insecticide treatments with neonicotinoids against the green peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) have been reported. The susceptibility towards imidacloprid in a couple of these population has been studied by bioassays, also applying the synergist piperonyl butoxide (PBO). To detect the mutation conferring "target-site" resistance to neonicotinoid insecticides biomolecular analysis have been used. Bioassays pointed out in the two studied populations resistance factors respectively equal to 12 and more than 600. PBO reduced significantly in both cases the resistance factors suggesting the involvement of metabolic resistance produced by mixed function oxidases. The population with the strongest resistance was also positive to the mutation R81T associated with neonicotinoids resistance. This is the first report for Italy of this resistance mechanism.

Keywords: *Myzus persicae*, piperonylbutoxide, nicotinic receptor

INTRODUZIONE

L'afide verde, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae), rappresenta una specie chiave nella difesa fitosanitaria del pesco (Cravedi, 2000). In anni recenti gli insetticidi della classe dei neonicotinoidi (modalità d'azione IRAC 4A – agonisti del recettore nicotinico dell'acetilcolina - nAChR), hanno rappresentato ampiamente il più consolidato e diffuso strumento per la lotta contro questo afide. Fin dalla loro introduzione sono stati una valida alternativa a vecchi prodotti dimostrando di essere un utile supporto alle strategie di lotta integrata contribuendo contemporaneamente anche alla gestione della resistenza agli insetticidi (Elbert *et al.*, 1996; Cravedi e Mazzoni, 2004; Elbert *et al.*, 2008; Jeschke e Nauen, 2008).

Infatti i neonicotinoidi, sin dalla loro comparsa, sono stati considerati insetticidi piuttosto sicuri per quanto riguarda lo sviluppo di resistenze (Nauen *et al.*, 1998; Nauen e Denholm, 2005). Tuttavia le segnalazioni di popolazioni di afide sulle quali i trattamenti con neonicotinoidi hanno dimostrato una riduzione di efficacia si sono moltiplicate nel corso degli ultimi anni, sia in Europa (Foster *et al.*, 2008; Philippou *et al.*, 2010; Puinean *et al.*, 2010) che nel resto del mondo (Toor *et al.*, 2008), arrivando a forme di resistenza conclamate causate da mutazioni specifiche nella sequenza amminoacidica del recettore nicotinic dell'acetilcolina (Bass *et al.*, 2011). Le prime segnalazioni di tale resistenza specifica risalgono al 2010 in Francia e Spagna (Anonimo, 2011; Slater *et al.*, 2011).

A seguito di segnalazioni di ridotta efficacia di trattamenti con neonicotinoidi in pescheti dell'Emilia-Romagna sono state avviate, nel 2010 e intensificate nel corso dell'anno successivo, specifiche raccolte di esemplari di *M. persicae*, allo scopo di identificare e confermare la presenza di popolazioni resistenti e di studiare anche i meccanismi alla base di tali riduzioni di efficacia. I risultati preliminari ottenuti su 2 popolazioni raccolte rispettivamente a Cesena nel 2010 e a Castelbolognese nel 2011 sono oggetto della presente comunicazione.

MATERIALI E METODI

Gli afidi raccolti direttamente dai germogli di pesco infestati sono stati trasferiti in laboratorio e allevati in cella climatizzata a $21 \pm 0,5$ °C, fotoperiodo 16:8, su plantule di pisello nano secondo procedure consolidate (Mazzoni e Cravedi, 2002). La risposta agli insetticidi è stata stimata tramite biosaggi effettuati immergendo plantule di pisello nano nella soluzione insetticida e, dopo asciugatura, trasferendo su ciascuna plantula 10-15 esemplari adulti atteri dell'afide. I gruppi di controllo sono stati trattati con acqua. L'inibizione dei sistemi metabolici potenzialmente coinvolti nella resistenza (esterasi, monossigenasi) è stata condotta miscelando, al momento dell'uso, il formulato insetticida con il piperonilbutossido (PBO 80 EC) in rapporto 1:5 peso:peso di principio attivo. La mortalità è stata controllata dopo 72 ore. Ciascun biosaggio è stato replicato almeno 4 volte in tempi differenti e impiegando almeno 5 differenti concentrazioni di un formulato commerciale a base di imidacloprid.

La relazione "concentrazione – mortalità" è stata stimata mediante l'analisi dei probit (Finney, 1971). Per la stima dei fattori di resistenza si è fatto riferimento alla baseline dell'imidacloprid di una popolazione sensibile di riferimento, siglata Mp1X, in allevamento presso gli insettari dell'Istituto di Entomologia e Patologia vegetale dell'Università Cattolica del Sacro Cuore dal 1996, senza essere stata sottoposta ad alcuna pressione di selezione.

L'identificazione molecolare della mutazione responsabile della sostituzione R81T nella sub-unità $\beta 1$ del recettore nicotinic è stata condotta secondo la metodica di Bass e colleghi (2011).

RISULTATI

Nel corso del 2010 è stata segnalata una sola azienda nei pressi di Cesena, in cui si erano verificati problemi di controllo delle infestazioni di *M. persicae*. Nel mese di maggio 2011 sono state invece raccolte 22 popolazioni provenienti da varie aziende e località come riassunto in tabella 1.

Sulla popolazione di Cesena del 2010, siglata Mp92, e su una popolazione raccolta a Castelbolognese nel 2011, siglata Mp99, sono stati eseguiti i biosaggi e contemporaneamente le analisi molecolari per identificare le mutazioni responsabili della resistenza.

Tabella 1. Elenco delle popolazioni raccolte nella tarda primavera 2011 in Emilia-Romagna in seguito a gravi reinfestazioni dopo trattamenti con formulati insetticidi a base di neonicotinoidi

Località	Azienda	Data di raccolta	Popolazioni
Imola (BO)	A	5/5	5
Imola (BO)	B	5/5	9
Castelbolognese (RA)	C	13/5	2
Durazzano (RA)	D	13/5	1
Brisighella (RA)	E	13/5	1
Pievesestina (FC)	F	19/5	2
Faenza (RA)	G	19/5	2

I risultati ottenuti con l'analisi dei probit e i relativi fattori di resistenza per le popolazioni studiate sono presentati in tabella 2 mentre in figura 1 sono tracciate le curve stimate per la relazione "concentrazione – mortalità".

Il fattore di resistenza (FR) nei confronti del formulato di imidacloprid impiegato è risultato essere particolarmente elevato nel caso della popolazione Mp99 raccolta nel 2011 (FR > 600). Nel caso della popolazione Mp92, il fattore di resistenza è decisamente inferiore (FR ~ 12) tuttavia la differenza di CL₅₀ rispetto alla popolazione sensibile è comunque significativa, come evidenziato dalla non sovrapposizione degli intervalli di confidenza (tabella 2).

Tabella 2. Risultati dell'analisi dei probit eseguita sui dati di mortalità registrati nei biosaggi con imidacloprid (I) e imidacloprid + PBO (I+P) sulle popolazioni di *M. persicae* oggetto dello studio

Popolazione	tesi	CL ₅₀ (µg m/l)	IC 95% ⁽¹⁾	Pendenza (± es)	g.l. ⁽²⁾	χ ²	FR ⁽³⁾	FS ⁽⁴⁾
Mp1X	I	0,49	0,35-0,64	2,46 (± 0,21)	39	93,6	=	
Mp92	I	5,72	3,55-7,73	3,20 (± 0,47)	45	91,7	11,6	
	I+P	2,58	1,51-3,63	2,23 (± 0,35)	45	94,1	5,3	2,2
Mp99	I	297,02	n.c. ⁽⁵⁾	1,21 (± 0,32)	21	66,2	605	
	I+P	54,06	7,70-243,20	0,97 (± 0,21)	13	28,7	110	5,5

(1) IC 95% = intervallo di confidenza al 95%

(2) g.l. = gradi di libertà

(3) FR = fattore di resistenza CL₅₀ popolazione resistente / CL₅₀ popolazione sensibile

(4) FS = fattore di sinergismo (CL₅₀ senza sinergico / CL₅₀ con sinergico)

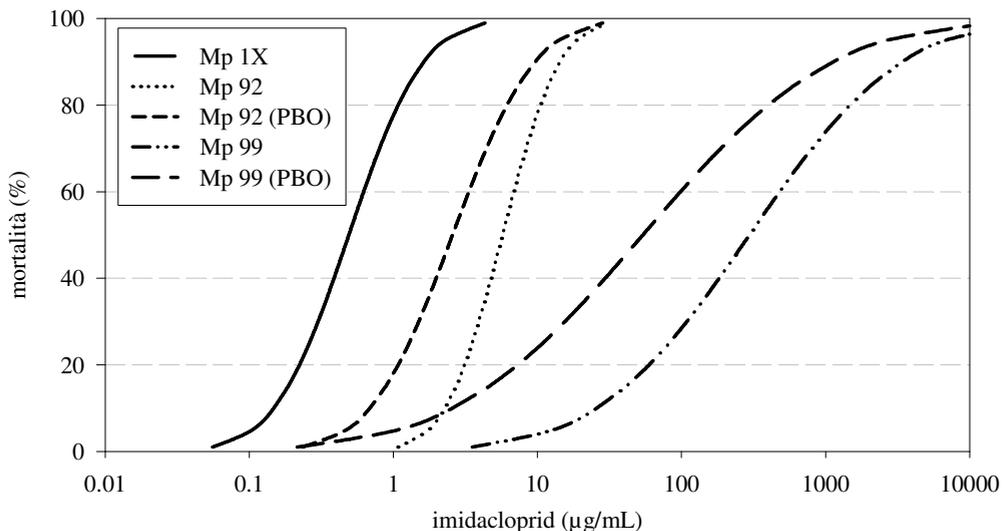
(5) n.c. = non calcolabile per eccesso di eterogeneità dei dati

Per entrambe le popolazioni resistenti è poi significativo l'effetto sinergico esercitato dal PBO con fattori di sinergismo rispettivamente di 2,2 (Mp92) e 5,5 (Mp99) abbassando quindi i fattori di resistenza da circa 12 a circa 5 per Mp92 e da oltre 600 a circa 110 per Mp99.

L'analisi biomolecolare ha inoltre evidenziato che la mutazione R81T nella sub-unità $\beta 1$ del recettore nicotinico, associata alla resistenza ai neonicotinoidi, non è presente in Mp1X e in Mp92 mentre entrambi gli alleli di Mp99 sono mutati.

La presenza di tale mutazione incrementa notevolmente la CL_{50} per la popolazione Mp99 rispetto non solo a quella della popolazione sensibile ma anche rispetto a quella di Mp92. Inoltre modifica significativamente la pendenza della curva "concentrazione-mortalità" (figura 1). Mentre infatti le curve della popolazione sensibile e di Mp92 sono parallele, come confermato dall'analisi dei probit ($\chi^2 = 2,84$; g.l. = 1; $p = 0,092$) e come ci si attende in presenza di resistenza prodotta da un incremento della capacità di detossificazione (Robertson *et al.*, 2007), confermata dall'effetto sinergico del PBO, la pendenza della curva per Mp99 è differente da quella di Mp1X ($\chi^2 = 5,63$; g.l. = 1; $p = 0,018$). Ciò è presumibilmente dovuto all'effetto combinato dei diversi meccanismi di resistenza e l'analisi della pendenza della curva e il relativo test di parallelismo pur non confermando in modo completo il fenomeno ne sono un indizio (Robertson *et al.*, 2007).

Figura 1. Curve "concentrazione-mortalità" stimate dall'analisi dei probit eseguita sui dati di mortalità registrati nei biosaggi con imidacloprid (I) e imidacloprid + PBO (I+P) sulle popolazioni di *M. persicae* oggetto dello studio



CONCLUSIONI

Il presente contributo rappresenta la prima segnalazione, confermata con tecniche biologiche e molecolari, della presenza di resistenza "target-site" ai neonicotinoidi in popolazioni italiane dell'afide verde del pesco. Nelle popolazioni studiate appare evidente l'effetto particolarmente elevato che la mutazione R81T del recettore nicotinico esercita sui fattori di resistenza. E' tuttavia anche evidente che nelle popolazioni italiane, al pari di quanto già visto in quelle greche, la resistenza ai neonicotinoidi in *M. persicae* è supportata da altri meccanismi biochimici come le monossigenasi (Philippou *et al.*, 2010). Tali enzimi risultano inoltre in

grado di ridurre significativamente anche l'efficacia di varie altre classi di insetticidi tra cui i piretroidi. Nel prossimo futuro la presenza di resistenze multiple e incrociate renderà certamente problematico il controllo di alcune popolazioni di *M. persicae*. La caratterizzazione con tecniche biochimiche e molecolari dei meccanismi di resistenza posseduti dalle popolazioni raccolte nel 2011 è in fase di completamento. Tale indagine sarà estesa possibilmente anche alle nuove popolazioni che si andranno a raccogliere nel corso del 2012, al fine di definire meglio una mappa di distribuzione della resistenza e consentire l'adozione delle strategie di difesa più appropriate.

Ringraziamenti

Si ringraziano il dott. Davide Dradi (CRPV Cesena – Forlì/Cesena) e il dott. Gabriele Marani (Agrisol-Unicoop – Cotignola – Ravenna) per l'aiuto alla raccolta delle popolazioni.

Il PBO utilizzato nel corso dello studio è stato gentilmente fornito dal dr V. Borzatta e dalla dr.ssa C Gobbi di Endura (Bologna).

Si ringraziano inoltre il dr. S. Cassanelli ed il prof. G. Manicardi dell'Università di Reggio Emilia per i suggerimenti durante la messa a punto dei saggi molecolari.

LAVORI CITATI

- Anonimo, 2011. *Myzus persicae* resistance alert!. http://www.irac-online.org/wp-content/uploads/2009/11/eConnection_issue25v1.0.pdf, 2012.
- Bass C., Puinean A.M., Andrews M., Culter P., Daniels M., Elias J., Paul V.L., Crossthwaite A.J., Denholm I., Field L.M., Foster S.P., Lind R., Williamson M.S., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience*, 12, (31 May 2011).
- Cassanelli S., Cerchiari B., Giannini S., Bizzaro D., Mazzoni E., Manicardi G.C., 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science*, 61, 91-96.
- Cravedi P., 2000. Integrated peach production in Italy: objectives and criteria. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 53 (2/3), 177-197.
- Cravedi P., Mazzoni E., 2004. Insecticide resistance management of the green peach aphid in Italian peach orchards. *Bulletin OILB/SROP*, 27, 75-78.
- Elbert A., Nauen R., Cahill M., Devonshire A.L., Scarr A.W., Sone S., Steffens R., 1996. Resistance management with chloronicotinyl insecticides using imidacloprid as an example. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer (English ed.)*, 49, 5-54.
- Elbert A., Haas M., Springer B., Thielert W., Nauen R., 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science*, 64, 1099-1105.
- Finney D.J., 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 333 pp.
- Foster S.P., Cox D., Oliphant L., Mitchinson S., Denholm I., 2008. Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*, 64, 1111-1114.
- Jeschke P., Nauen R., 2008. Neonicotinoids - from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science*, 64, 1084-1098.
- Mazzoni E., Cravedi P., 2002. Analysis of insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards. *Pest Management Science*, 58, 975-980.
- Nauen R., Tietjen K., Wagner K., Elbert A., 1998. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Science*, 52, 53-57.

- Nauen R., Denholm I., 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58, 200-215.
- Philippou D., Field L., Moores G., 2010. Metabolic enzyme(s) confer imidacloprid resistance in a clone of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) from Greece. *Pest management science*, 66, 390-395.
- Puinean A.M., Foster S.P., Oliphant L., Denholm I., Field L.M., Millar N.S., Williamson M.S., Bass C., 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genetics* 6, e1000999.
- Robertson J.L., Russel R.M., Preisler H.K., Savin N.E., 2007. Bioassays with Arthropos – 2nd edition. CRC Press, Boca Raton (FL – USA), 199 pp.
- Slater R., Paul V.L., Andrews M., Garbay M., Camblin P., 2011. Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. *Pest Management Science*, doi: 10.1002/ps.2307 (early view).
- Toor R.F.v., Foster S.P., Anstead J.A., Mitchinson S., Fenton B., Kasprovicz L., 2008. Insecticide resistance and genetic composition of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on field potatoes in New Zealand. *Crop Protection*, 27, 236-247.