



**La resistenza ai prodotti fitosanitari:
una sfida per la moderna protezione integrata delle colture**

Meccanismi di azione dei prodotti fitosanitari e basi genetiche e fisiologiche della resistenza - insetticidi e acaricidi

Piero Cravedi, Emanuele Mazzoni

Istituto di Entomologia e Patologia vegetale – Università Cattolica del Sacro Cuore – Piacenza

Giancarlo Manicardi

DipSAA - Università di Modena e Reggio Emilia

Carlo Duso

DAFNAE - Università di Padova

Sommario

- i meccanismi d'azione di insetticidi/acaricidi
- i meccanismi di resistenza
- conclusioni

bersagli e meccanismi

sistema neuro-muscolare

processi metabolici

sintesi della cuticola

mute e metamorfosi

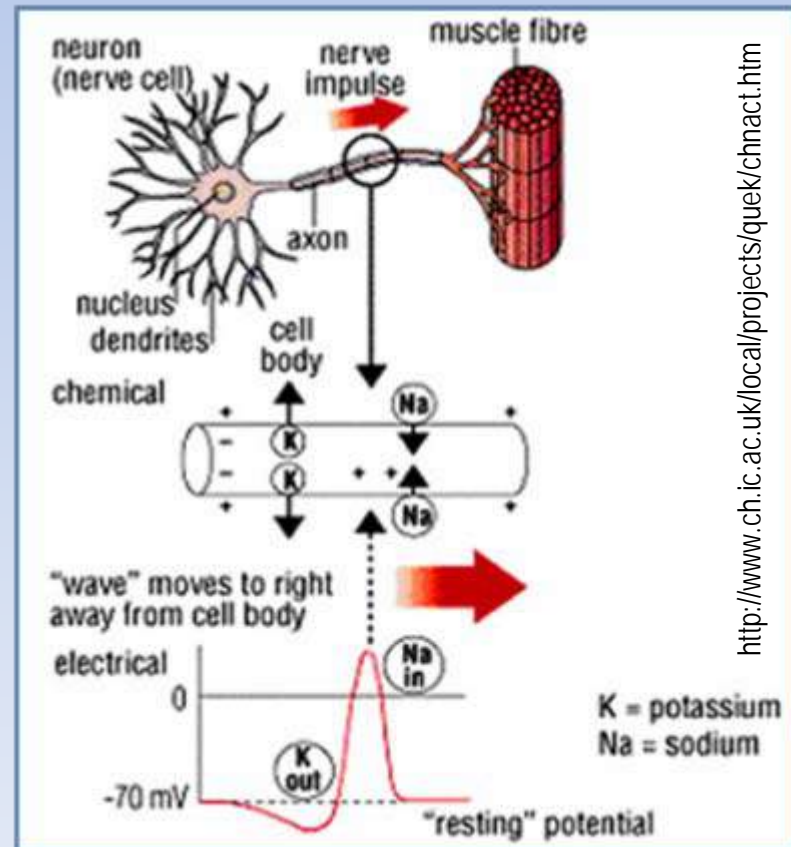
sistema digerente

target e meccanismi sconosciuti



Sistema neuro-muscolare: assoni

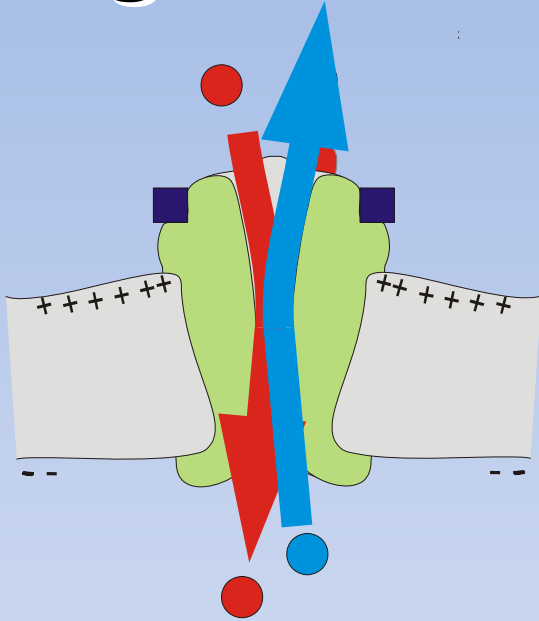
- Modulatori del canale del sodio
 - piretrine e piretroidi
- Bloccanti dei canali del sodio voltaggio dipendenti
 - indoxacarb,
metaflumizone



Sistema neuro-muscolare: neurotrasmettitori

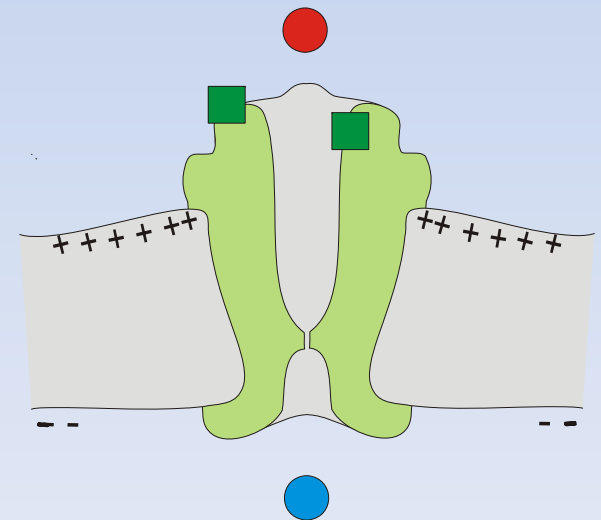
- **Acetilcolina**: trasmissione *eccitatoria* nel sistema nervoso centrale
- **Glutammato**: trasmissione *eccitatoria* alle giunzioni neuromuscolari
- **GABA**: trasmissione *inibitoria*

Agonisti e Antagonisti



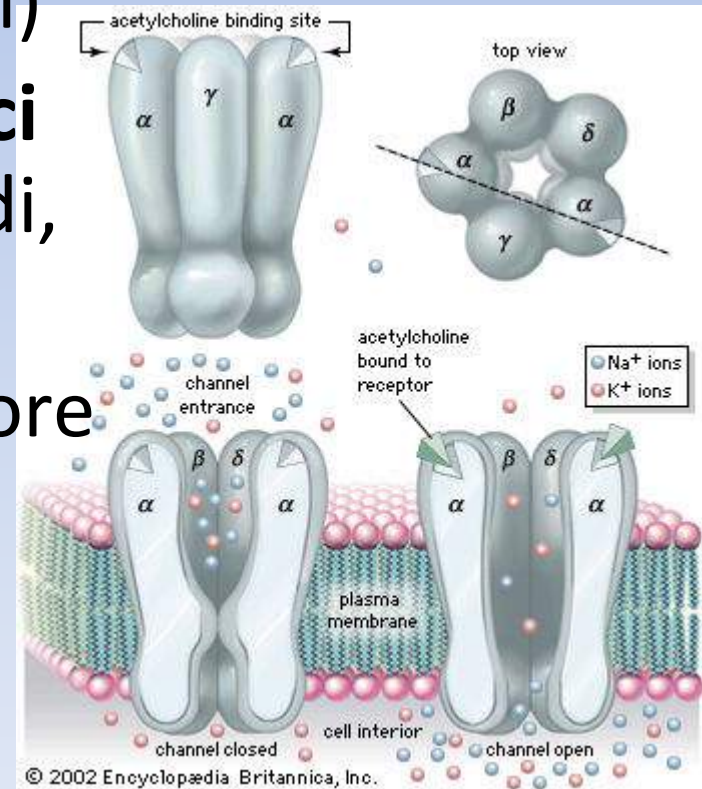
- **Agonisti:** si legano al recettore provocando il flusso ionico come la sostanza con cui competono di cui **incrementano** l'effetto

- **Antagonisti** si legano al recettore inibendo il flusso ionico che sarebbe provocato dalla sostanza con cui competono di cui **inibiscono** l'effetto



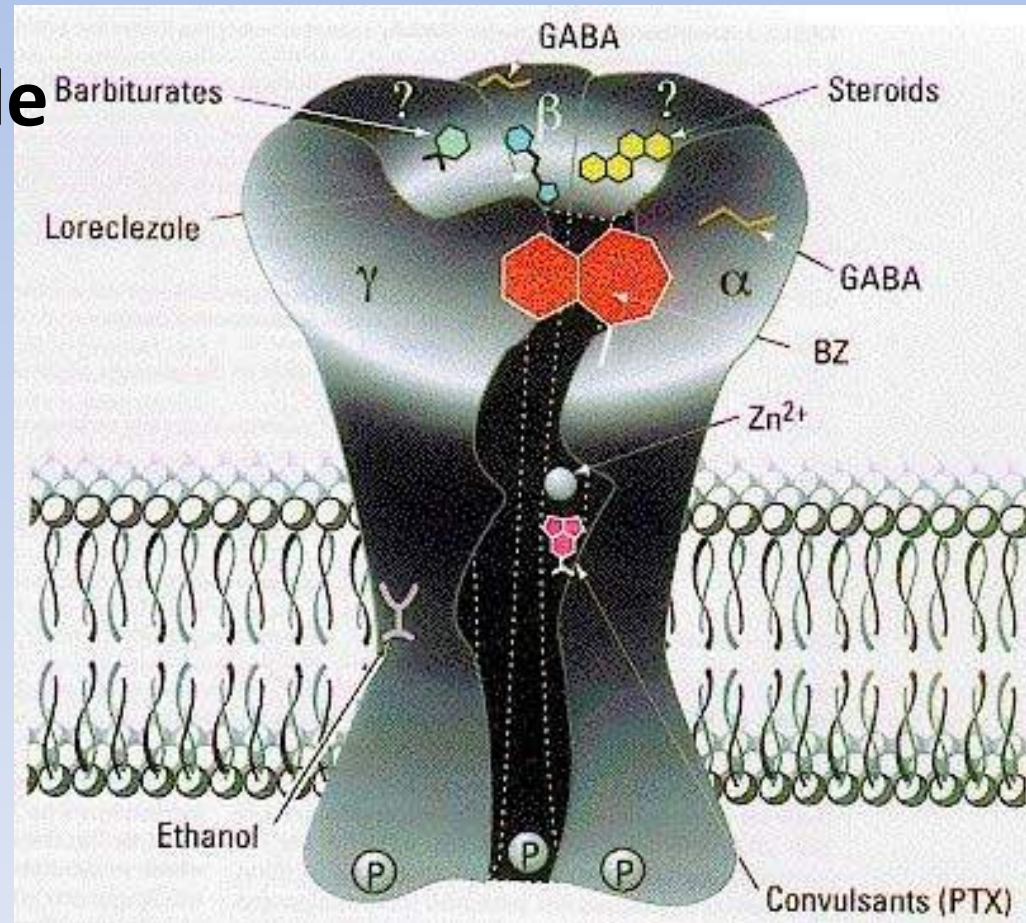
Sistema neuro-muscolare: sinapsi eccitatorie

- inibitori dell'**acetilcolinesterasi** (carbammati ed esteri fosforici)
- agonisti dei **recettori nicotinici** dell'acetilcolina (neonicotinoidi, nicotina, sulfoxaflor)
- attivatori allosterici del recettore nicotinici dell'acetilcolina (spinosine)



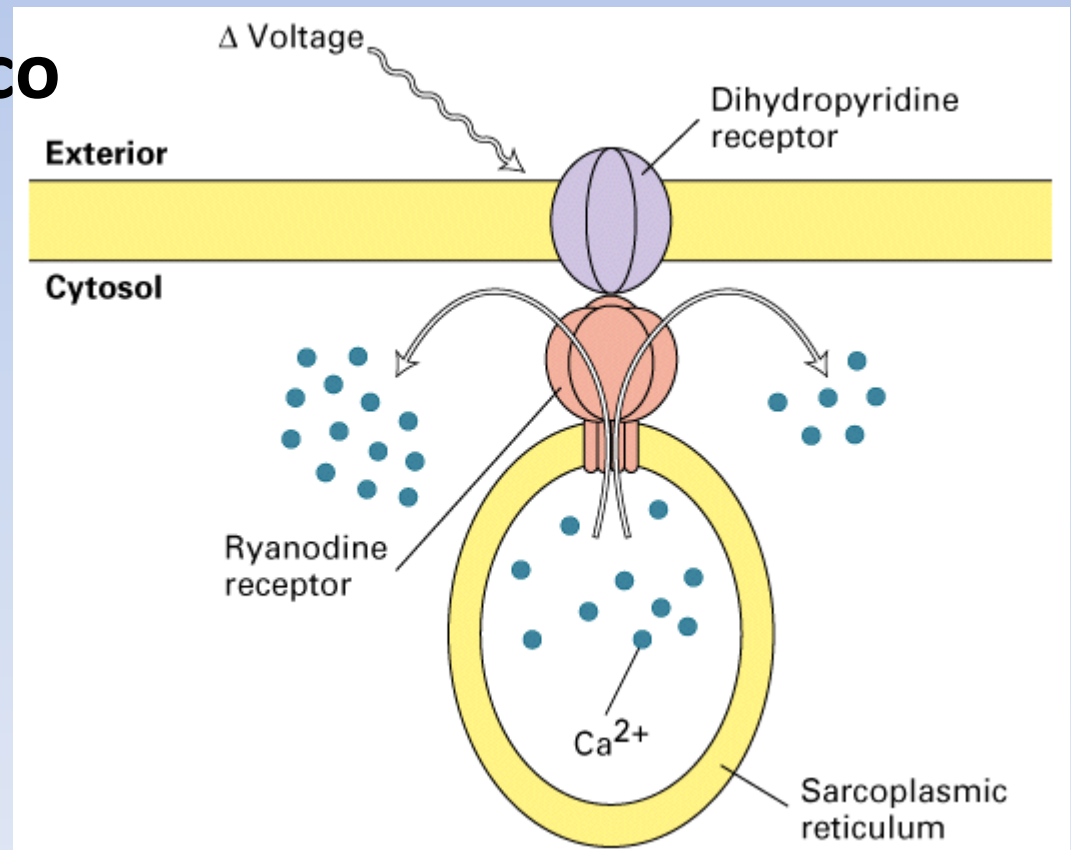
Sistema neuro-muscolare: sinapsi inibitorie

- **Antagonisti del canale del cloro GABA** attivati (ciclodieni, fenilpirazoli)
- **Attivatori dei canali del cloro** (avermectine, milbemicine)



Sistema neuro-muscolare: recettori rianodinici

- **Modulatori del recettore nicotinico**
 - diammidi



Mute e metamorfosi

- Inibitori della **sintesi della chitina**
 - benzoiluree, buprofezin, ciromazina
- Agonisti dell'**ecdisone**
 - tebufenozide
- Mimetici dell'**ormone giovanile**
 - fenoxycarb, methoprene, pyriproxyfen



Sistema digerente

- **Tossine prodotte da agenti microbici** con effetto sulle membrane dell'intestino medio degli insetti
 - preparati a base di *Bt* e tossine *Cry* espresse in piante transgeniche
- **Blocco selettivo della nutrizione negli Omotteri**
 - pymetrozine, flonicamide



Processi metabolici

- **Inibitori dei sistemi mitocondriali del trasporto di elettroni**
 - cianuri, fosfina, METI, rotenone
- **Inibitori dell'acetil CoA carbossilasi**
 - derivati dell'acido tetramico
- **Inibitori dell'ATP sintasi mitocondriale**
 - vari acaricidi
- **Inibitori dello sviluppo degli acari**
 - clofentezine, hexythiazox, etoxacole

Meccanismi di resistenza

- Riduzione della penetrazione
- Incremento della detossificazione
 - resistenza «metabolica»
- Insensibilità del sito bersaglio
 - resistenza «target-site»

Alterazioni cuticolari

- riduzione assorbimento (spessore o struttura della cuticola, ecc.)
- è un meccanismo probabile, ma conferirebbe un basso tasso di resistenza
- è ancora da dimostrare completamente, misurando direttamente l'ingresso dell'insetticida attraverso la cuticola
- ci sono evidenze molecolari indirette
 - ceppi resistenti esprimono più proteine cuticolari

Table 3. Fold change in expression of *CYP6CY3* and cuticular proteins in the insecticide resistant *M. persicae* clone 5191 (compared to the susceptible reference clone 4106A) as determined by quantitative PCR.

Protein gene ID	Fold change - qPCR	95% confidence limits	Fold change - microarray
<i>CYP6CY3</i>	22.04	1.8	5.3–7.5
7126	3.86	0.46	3.59
4585	3.17	0.27	3.2
65840	3.93	0.34	7.22
2236	4.28	0.26	2.82
1252	1.83	0.14	2.5
23566	13.52	1.29	4.76
31162	2.98	0.72	2.42
72563	15.55	6.28	6.24
3580	7.99	2.61	7.9

For comparison the fold change measured by microarray is also shown.
doi:10.1371/journal.pgen.1000999.t003



Incremento della detossificazione

- monoossigenasi dipendenti dal citocromo P₄₅₀
 - causano resistenza a tutti i maggiori gruppi di insetticidi
 - evidenziate indirettamente
 - effetto sinergizzante del PBO e composti correlati
 - famiglie geniche complesse
 - dati molecolari evidenziano una espressione differente ma anche amplificazione genica

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS GENETICS

Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*

Alin M. Puinean^{1,2}, Stephen P. Foster¹, Linda Oliphant¹, Ian Denholm¹, Linda M. Field¹, Neil S. Millar², Martin S. Williamson¹, Chris Bass^{1*}

Incremento della detossificazione esterasi e idrolasi e GST

- causano resistenza a molti insetticidi a causa di:
 - maggior efficienza enzimatica e/o maggior produzione
 - i quantitativi possono essere sufficienti a produrre resistenze per «sequestro»
- esistono forme diverse identificabili elettroforeticamente e / o spettrofotometricamente impiegando substrati artificiali
- come per le MFO sono famiglie geniche complesse
 - i meccanismi di regolazione dell'espressione giocherebbero un ruolo importante ma sono solo in parte conosciuti

- è noto il legame tra attività esterasica e intensità della resistenza

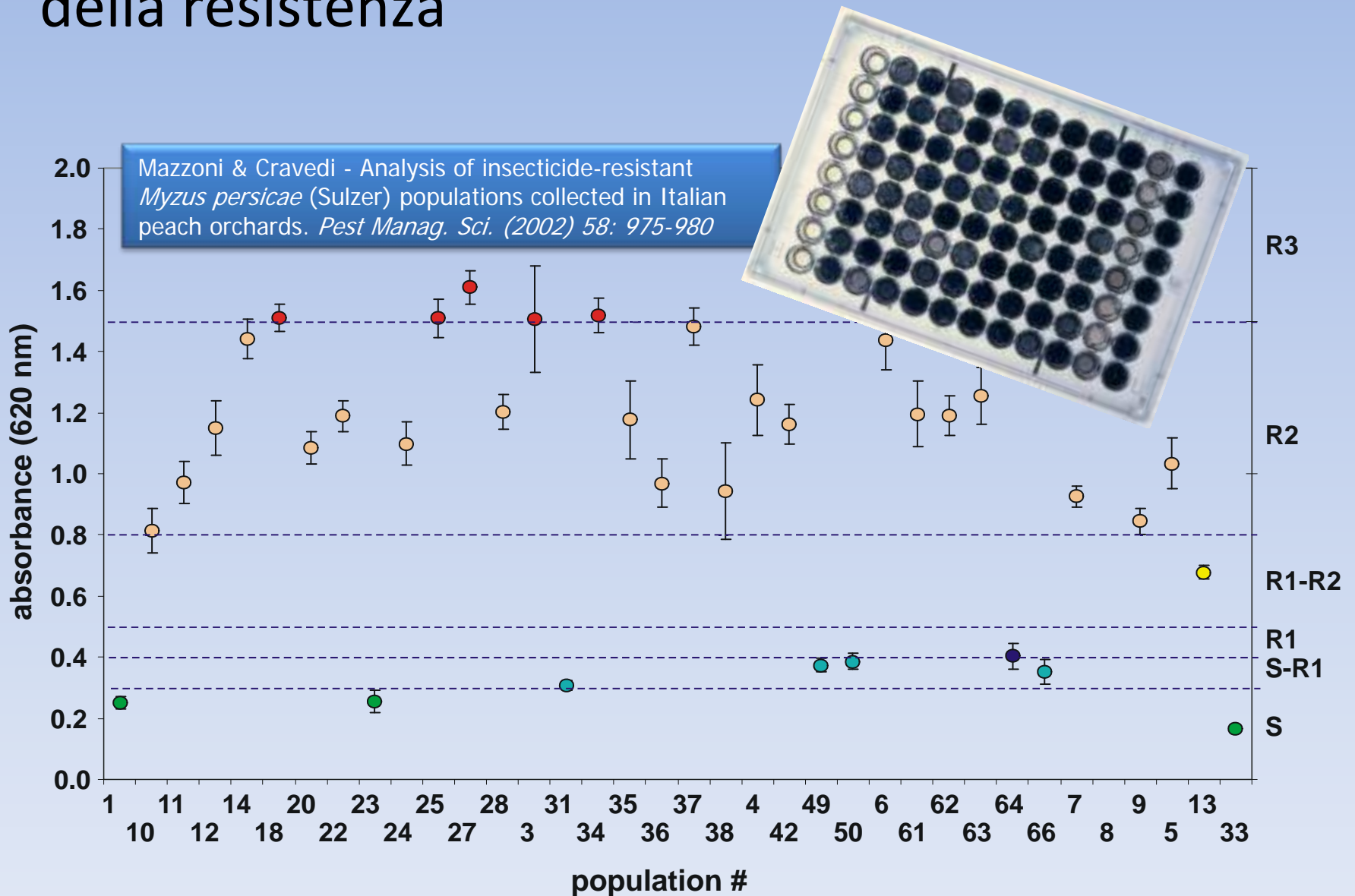


Figura 1a, b, c. Analisi biochimiche condotte su larve post-diapausa del ceppo resistente FO3 e del ceppo proveniente da cultura biologica FO2

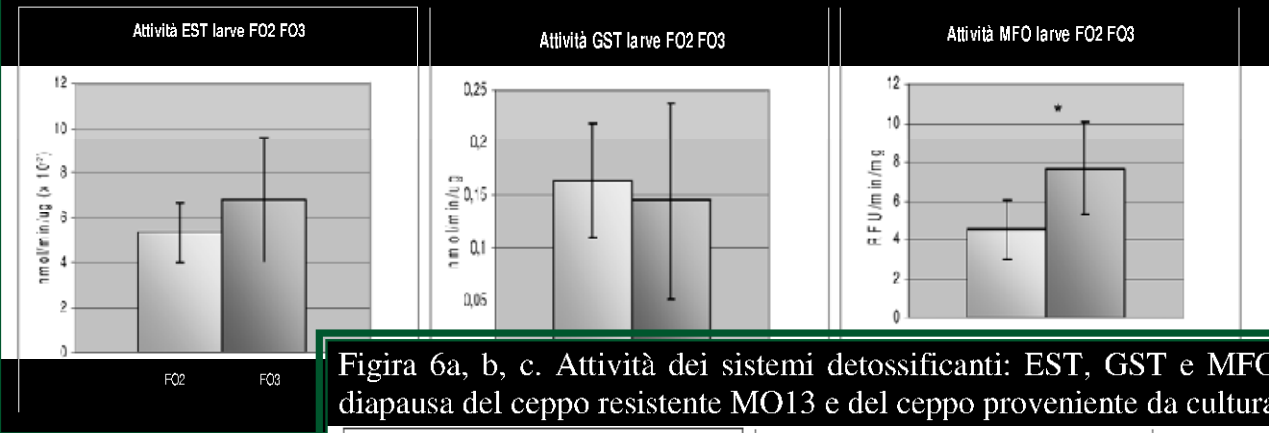


Figura 6a, b, c. Attività dei sistemi detossificanti: EST, GST e MFO valutate in larve post-diapausa del ceppo resistente MO13 e del ceppo proveniente da cultura biologica FO2

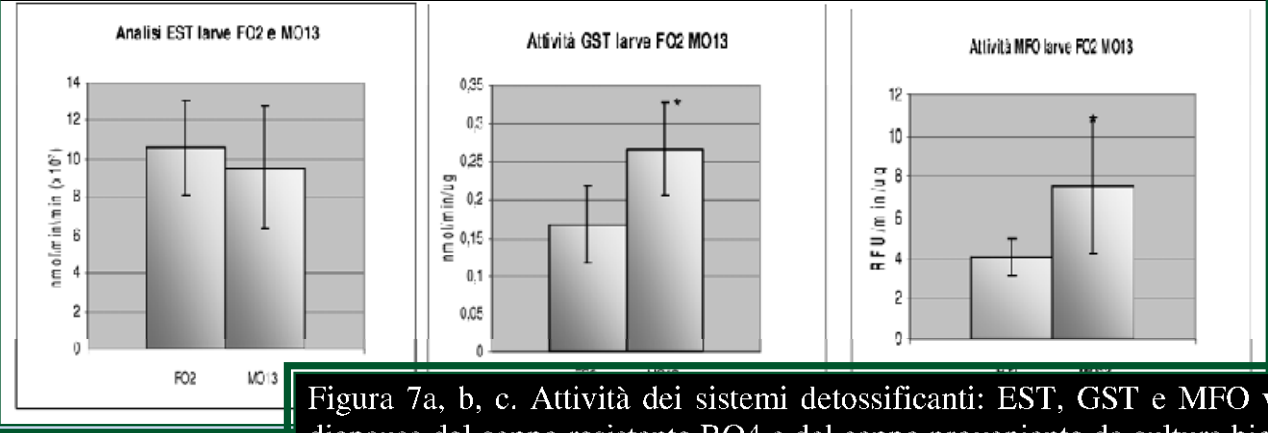
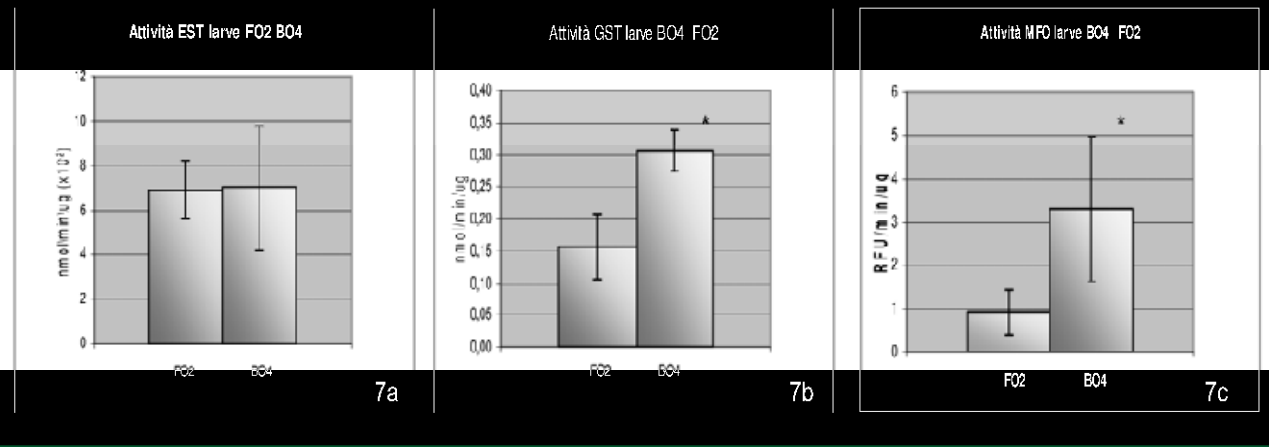


Figura 7a, b, c. Attività dei sistemi detossificanti: EST, GST e MFO valutate in larve post-diapausa del ceppo resistente BO4 e del ceppo proveniente da cultura biologica FO2



Cassanelli *et al.*, 2008
GF 2008

Alterazione del sito bersaglio

- Recettore nicotinico
- Acetilcolinesterasi
- Canali
 - sodio voltaggio dipendente
 - cloro «GABA» attivati

Mutazioni del recettore nicotinic

- Sono state descritte varie mutazioni puntiformi nella sequenza genica codificante il recettore nicotinic
- la sostituzione di singoli amminoacidi riduce l'affinità del legame tra recettore e insetticida producendo resistenza
 - in molti casi la mutazione rende il recettore più simile a quello dei vertebrati

RESEARCH ARTICLE

Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*

Chris Bass^{1†}, Alin M. Puiu^{1†}, Andrew J. G. Cook^{1†}, Melanie Andrews², Penny Cutler³, Miriam Daniels³, Jan Elias², Verity Laura Paul², Ian Denholm¹, Linda M Field¹, Stephen P Foster¹, Rob Lind³, Martin S Williamson¹ and Neil S. Millar^{4*}

Table 4 Alignment of amino acid sequence in loop D of the agonist binding site of vertebrate and insect nicotinic acetylcholine receptors

Species	Amino Acid Number of <i>Myzus persicae</i> β 1 Subunit										
	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
<i>Homo sapiens</i> β 2	N	V	W	L	T	Q	E	W	E	D	Y
<i>Gallus gallus</i> β 2	N	V	W	L	T	Q	E	W	E	D	Y
<i>Rattus norvegicus</i> β 2	N	V	W	L	T	Q	E	W	E	D	Y
<i>Drosophila melanogaster</i> β 1	C	V	W	L	R	L	V	W	Y	D	Y
<i>Anopheles gambiae</i> β 1	N	V	W	L	R	L	V	W	S	D	Y
<i>Bemisia tabaci</i> β 1	N	V	W	L	R	L	V	W	N	D	Y
<i>Locusta migratoria</i> β 1	N	V	W	L	R	L	V	W	N	D	Y
<i>Heliothis virescens</i> β 1	N	V	W	L	R	L	V	W	M	D	Y
<i>Ctenocephalides felis</i> β 1	N	V	W	L	R	L	V	W	S	D	Y
<i>Myzus persicae</i> 4106A β 1	N	V	W	L	R	L	V	W	R	D	Y
<i>Myzus persicae</i> 5191A β 1	N	V	W	L	R	L	V	W	R	D	Y
<i>Myzus persicae</i> FRC β 1	N	V	W	L	T	L	V	W	R	D	Y



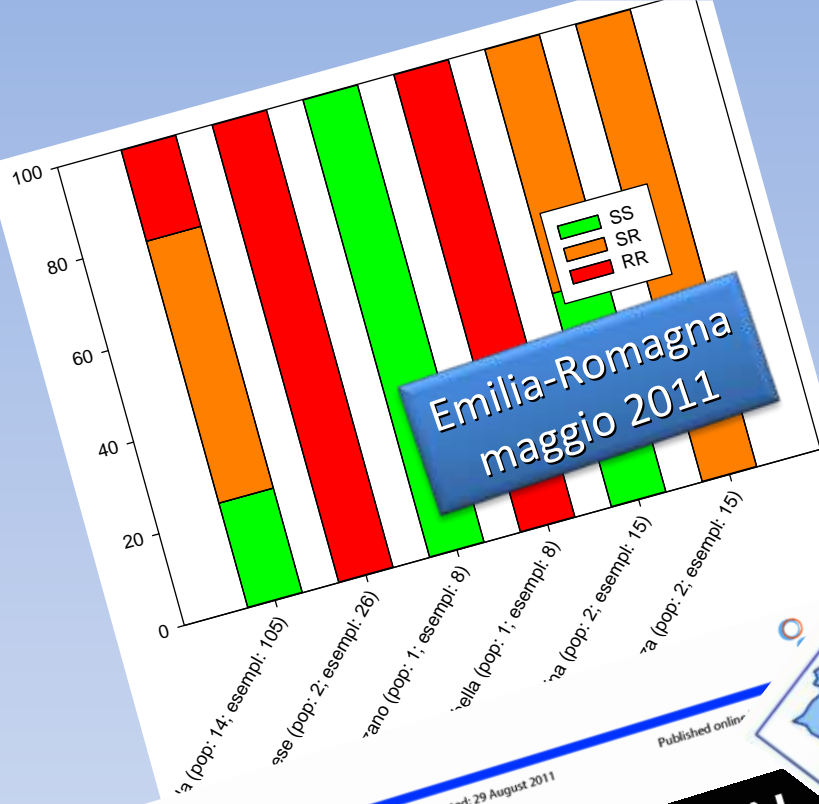
A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper)

Zewen Liu^{*}, Martin S. Williamson¹, Stuart J. Lansdell¹, Ian Denholm¹, Zhaojun Han^{*,5}, and Neil S. Millar^{4*}

^{*}Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ¹Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, United Kingdom; and ²Department of Pharmacology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, United Kingdom

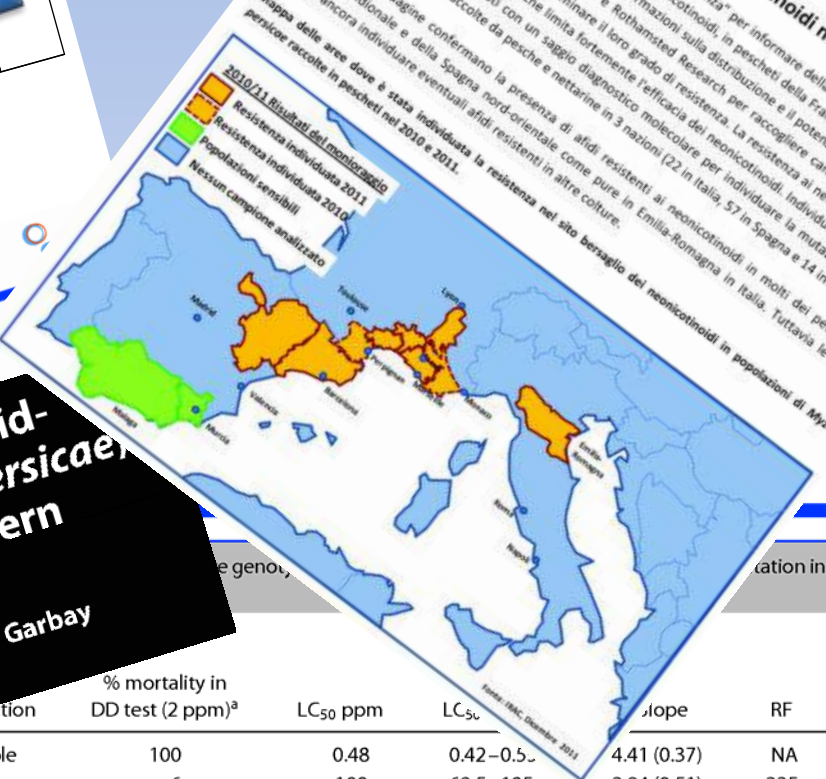
Communicated by John E. Casida, University of California, Berkeley, CA, April 18, 2005 (received for review September 24, 2004)

**Emilia-Romagna
maggio 2011**



Aggiornamento sulla resistenza ai neonicotinoidi nell'afide verde del pesco

Nel marzo 2011, IRAC ha pubblicato un "allarme resistenza" per informare della scoperta di popolazioni dell'afide verde del pesco (*Myzus persicae*) resistenti ai neonicotinoidi, in pescheti della Francia meridionale e della Spagna nord-orientale. Al fine di ottenere ulteriori informazioni sulla distribuzione e il potenziale impatto di questi afidi è stata avviata una collaborazione tra IRAC e Rothamsted Research per raccogliere campioni da pescheti e altre colture in Europa meridionale e determinare il loro grado di resistenza. La resistenza ai neonicotinoidi è basata su una mutazione del sito bersaglio che limita fortemente l'efficacia dei neonicotinoidi. Individui prelevati da ciascun campione sono stati analizzati con un saggio diagnostico molecolare per individuare la mutazione. In totale 93 popolazioni sono state raccolte da pesche e nettarie in 3 nazioni (22 in Italia, 57 in Spagna e 14 in Francia).



I risultati dell'indagine confermano la presenza di afidi resistenti ai neonicotinoidi in molti dei pescheti della Francia meridionale e della Spagna nord-orientale come pure in Emilia-Romagna in Italia. Tuttavia le indagini devono ancora individuare eventuali afidi resistenti in altre colture.

Mappa delle aree dove è stata individuata la resistenza nel sito bersaglio dei neonicotinoidi in popolazioni di Myzus persicae raccolte in pescheti nel 2010 e 2011.

Research Article

Received: 18 May 2011
Revised: 24 August 2011
DOI 10.1002/ps.2307

Accepted: 29 August 2011

Identifying the presence of neonicotinoid-resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain

Russell Slater,^{*} Verity Laura Paul, Melanie Andrews, Michel Garbay and Philippe Camblin

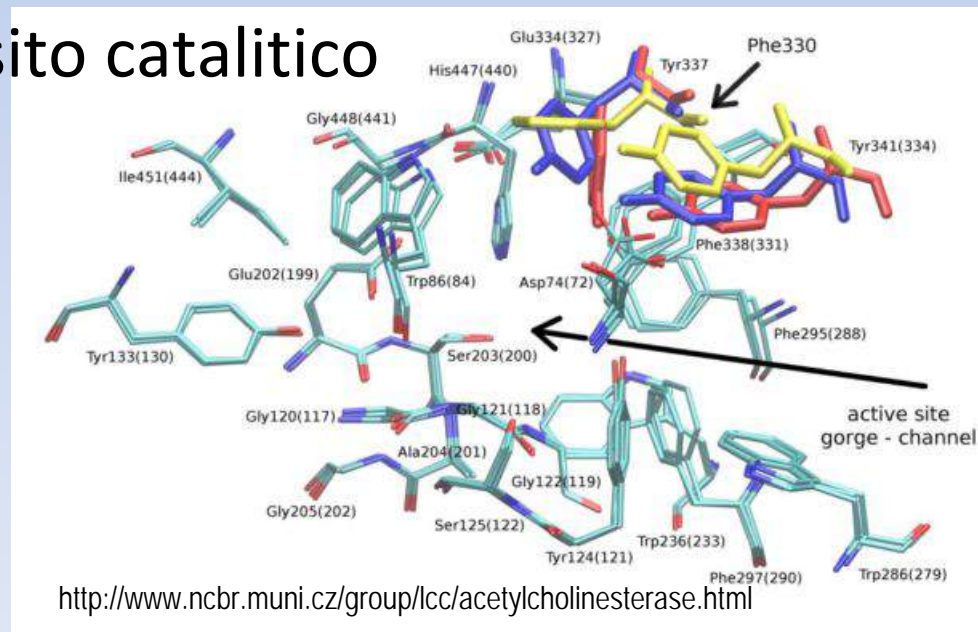
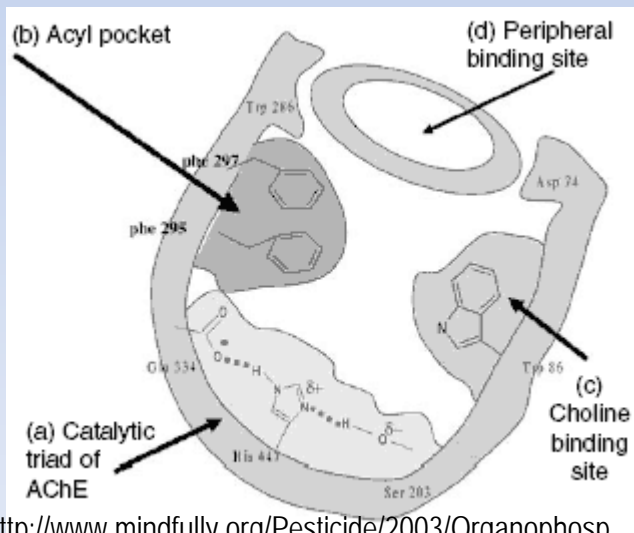
R Slater et al.

Sample	Population	% mortality in DD test (2 ppm) ^a	LC ₅₀ ppm	LC ₅₀	Slope	RF	R81T genotype ^b % of population (n > 20)		
							SS	SR	RR
	Lab susceptible	100	0.48	0.42–0.5	4.41 (0.37)	NA	100	0	0
FRC-P	Monteux	6	108	69.5–185	2.94 (0.51)	225	0	0	100
MG01	St Martin de Crau	57	1.94	1.41–2.41	3.46 (0.47)	4	94	0	6
MG04	Mauguio	35	55.33	33.02–103.88	1.92 (0.31)	115	5	0	95
MG07	Générac	0	127.06	99.62–167.89	4.93 (0.62)	265	0	0	100
ES01	Lleida	29	18.65	12.98–27.55	3.57 (0.579)	39	0	83	17
ES01C	Lleida	14	21.15	15.11–31.04	3.00 (0.46)	44	0	100	0

^a Corrected for control mortality using Abbott's formula.²⁰
^b SS = wild-type R81; SR = heterozygous R/T81; RR = homozygous T81.

Acetilcolinesterasi insensibile

- interessa fosfororganici e carbammati
 - esistono varie forme mutanti e spesso più mutazioni concorrono a modificarla
- alcune mutazioni modificano l'accesso dell'insetticida al sito catalitico



Alterazione del sito bersaglio

- knockdown resistance (*kdr*)
 - interessa piretroidi e difeniletani (DDT e methoxychlor)
 - dovuta alla sostituzione di 1 (*kdr*) o 2 (*skdr*) amminoacidi nel canale del sodio
 - si stanno scoprendo molte nuove mutazioni in molte specie resistenti

Alterazione del sito bersaglio

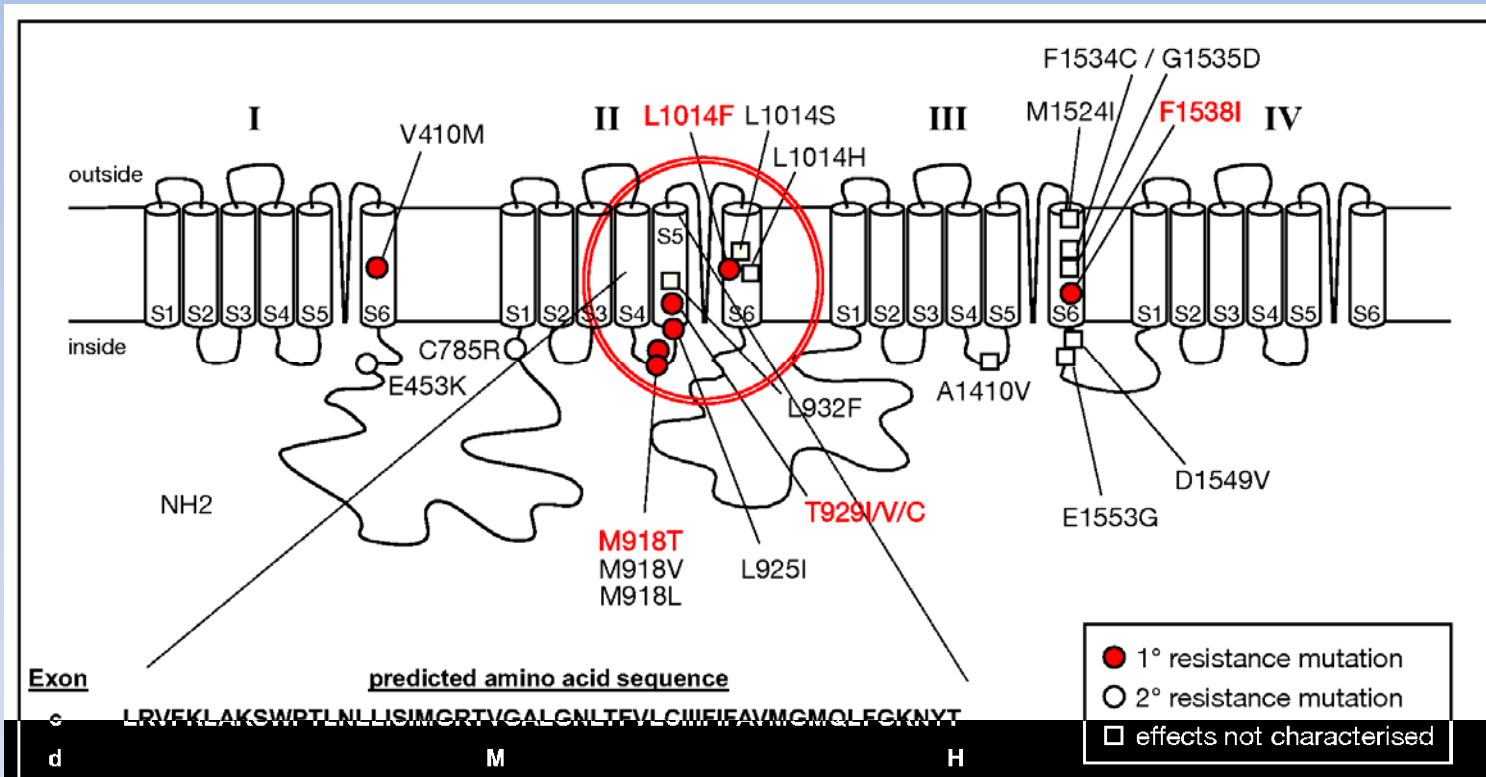


Fig. 2: The voltage-gated sodium channel is composed of four domains, each containing six membrane spanning helices. The S5 and S6 helices of each domain come together to form the central ion selective pore of the channel, the re-entrant P-loops (between S5 and S6) constituting the selectivity filter. Helices 1 to 4 make up the four independent voltage sensors, responsible for voltage-sensitive gating, and control opening and closing of the channel. The approximate location of channel mutations implicated in pyrethroid/DDT resistance (see Table 2) are also shown.

Alterazione del sito bersaglio

- recettore GABA
 - ha interessato in passato i ciclodienici
 - attualmente interessa i fenilpirazoli e composti correlati

Considerazioni

- Il numero dei meccanismi d'azione degli insetticidi è aumentato considerevolmente
- Vengono sfruttati anche meccanismi d'azione non completamente conosciuti
- Frequentemente i bersagli biochimici coinvolti rappresentano specifici stadi di fenomeni fisiologici (azione selettiva che può favorire l'insorgenza di resistenze)

Considerazioni

- I meccanismi di resistenza sono conosciuti solo per alcuni gruppi di insetticidi
 - alcuni meccanismi sono noti per la loro interferenza con specifici meccanismi fisiologici di alcuni gruppi di insetticidi
 - altri meccanismi, più numerosi, determinano un incremento della detossificazione /sequestro di insetticidi diversi fra loro.
 - s tratta di alcune famiglie enzimatiche ad azione difficile da definire con precisione, che hanno un ruolo complesso e presumibilmente molto rilevante