



LA RESISTENZA A PRODOTTI FITOSANITARI: UNA SFIDA PER LA MODERNA PROTEZIONE INTEGRATA DELLE COLTURE

Metodi e tecniche per la rilevazione e quantificazione della resistenza
Insetticidi ed acaricidi

Manicardi G.C.¹, Cassanelli S.¹, Mazzoni E.², Duso C.³

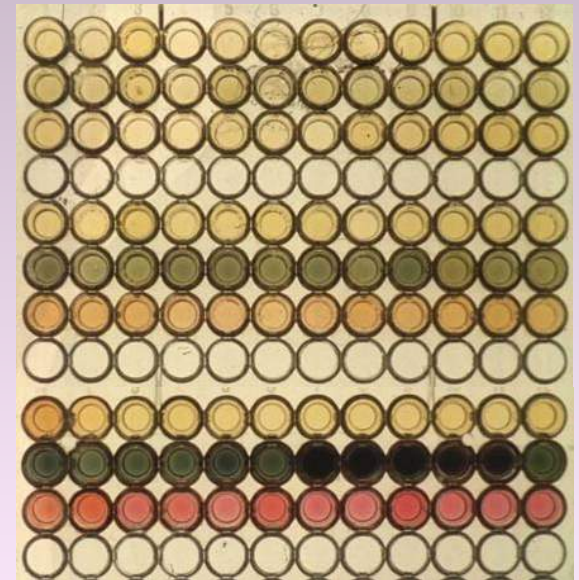
¹DipSAA - Università di Modena e Reggio Emilia, ²Istituto di Entomologia e Patologia vegetale - Università Cattolica del Sacro Cuore - Piacenza, ³DAFNAE - Università di Padova

Metodi e tecniche per la rilevazione e quantificazione della resistenza

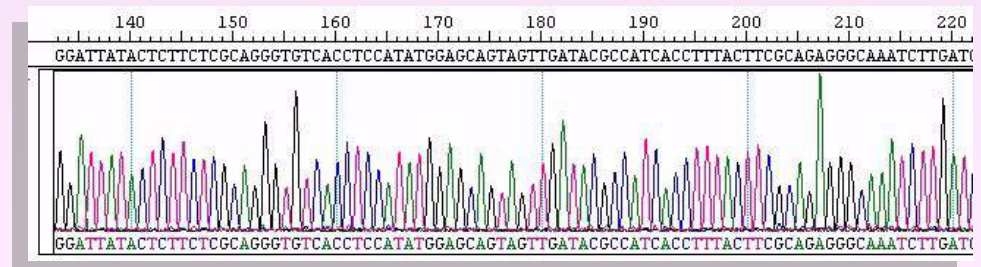
• Biosaggi



• Metodi biochimici

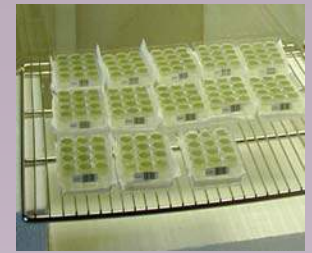


• Metodi molecolari

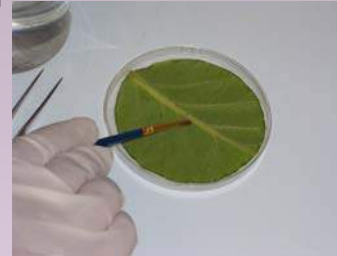


Biosaggi:

- utili per qualsiasi tipo di insetticida



- non richiedono conoscenze approfondite del MOA



- richiedono adattamenti in funzione delle modalità di applicazione

- sono richiesti molti esemplari

- hanno basso potere "risolvente"



- poco adatti per identificare una resistenza nelle fasi iniziali di diffusione

Metodi molecolari: ricerca di mutazioni target-site

Sequenziamento del gene

Impegnativi in sede di messa a punto

Rapidi, precisi ed economici una volta standardizzati

❖ Clonaggio del cDNA del gene di interesse

✓ Estrazione del RNA_m da insetti in toto

✓ Analisi regioni della proteina conservate: sintesi di coppie di primers degenerati per amplificare selettivamente il gene di interesse

RT-PCR: clonaggio cDNA codificante il sito catalitico

5'RACE: clonaggio cDNA codificante l'estremità aminotermine

3'RACE: clonaggio cDNA codificante l'estremità carbossiterminale

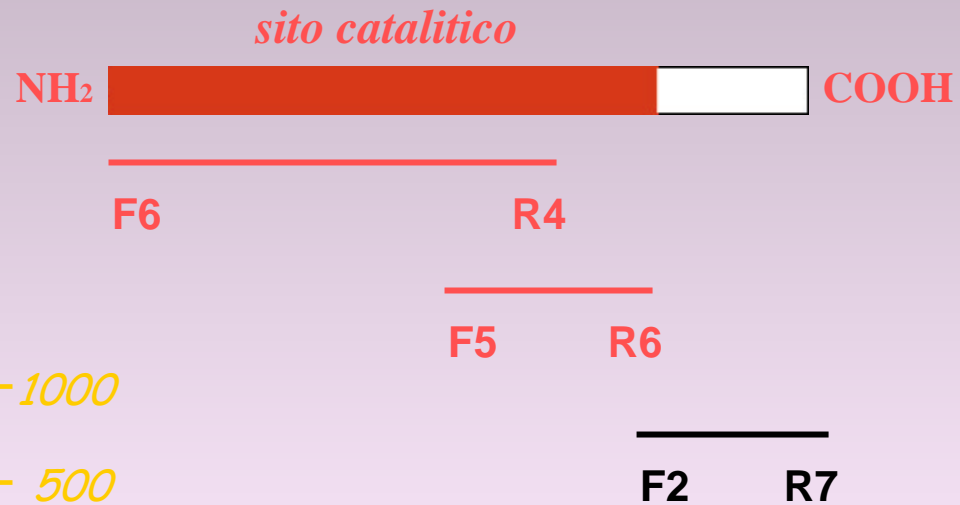
❖ Identificazione delle mutazioni responsabili del fenotipo resistente

• Confronto del cDNA dei ceppi sensibili e resistenti

Strategia di sequenziamento

Schema di amplificazione

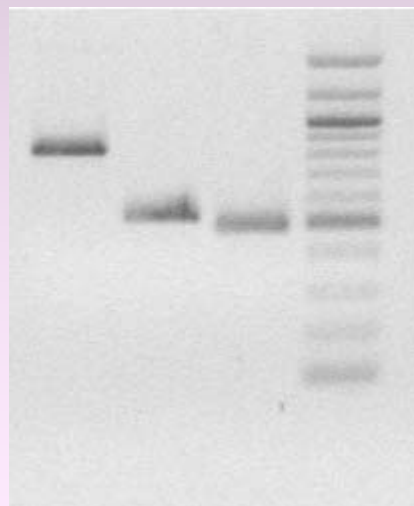
Corsa elettroforetica



ACE1 CP-F6/R4

ACE1 CP-F5/R6

ACE1 CP-F2/R7



1 2 3 MW marker

1000

500

bp

Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.)

Stefano Cassanelli^{a,*}, Maritza Reyes^b, Magali Rault^b,
 Gian Carlo Manicardi^a, Benoît Sauphanor^b

^aDepartment of Agricultural Science, University of Modena and Reggio Emilia, Reggio Emilia, Via JFK Kennedy 17/19, RE 42100, Italy

^bUMR Ecologie des Insectes, INRA Site Arignon, 84 914 Arignon Cedex 09, France

Received 21 December 2005; received in revised form 13 May 2006; accepted 15 May 2006

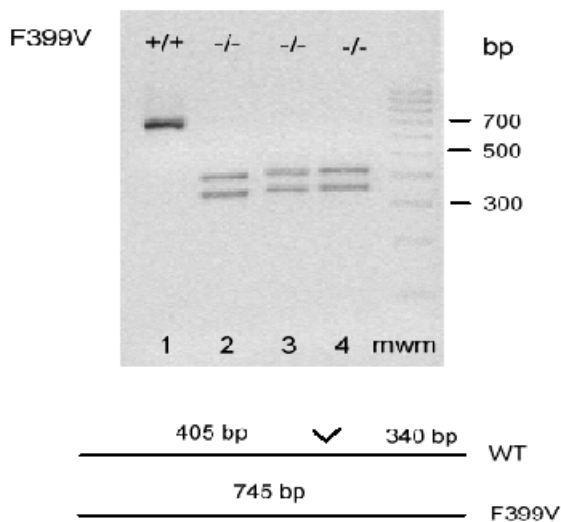
RFLP-PCR

PCR-Allele specific

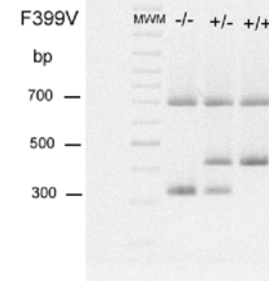
Apol

S
 AGGTATTTGTGAA TTTCC TTTTCGT TCCCATTATCGACG
 TCCATAAACACTTAAAGGAAAGCAAGGGT AATAGCTGC
 Gly Ile Cys Glu **Phe** Pro Phe Val Pro Ile Ile Asp

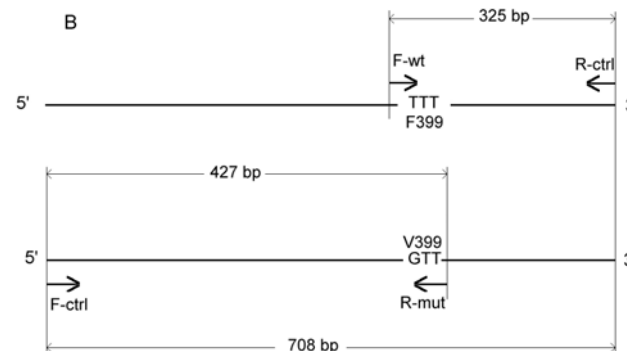
R
 AGGTATTTGTGAA GTTCC TTTTCGT TCCCATTATCGACG
 TCCATAAACACTTCAAGGAAAGCAAGGGT AATAGCTGC
 Gly Ile Cys Glu **Val** Pro Phe Val Pro Ile Ile Asp



A



B



Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*

Stefano Cassanelli,¹ Barbara Cerchiarì,¹ Sara Giannini,¹ Davide Bizzaro,² Emanuele Mazzoni³ and Gian Carlo Manicardi^{1*}

¹Dipartimento Interdisciplinare di Scienze Agrarie, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italia

²Istituto di Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia

³Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia

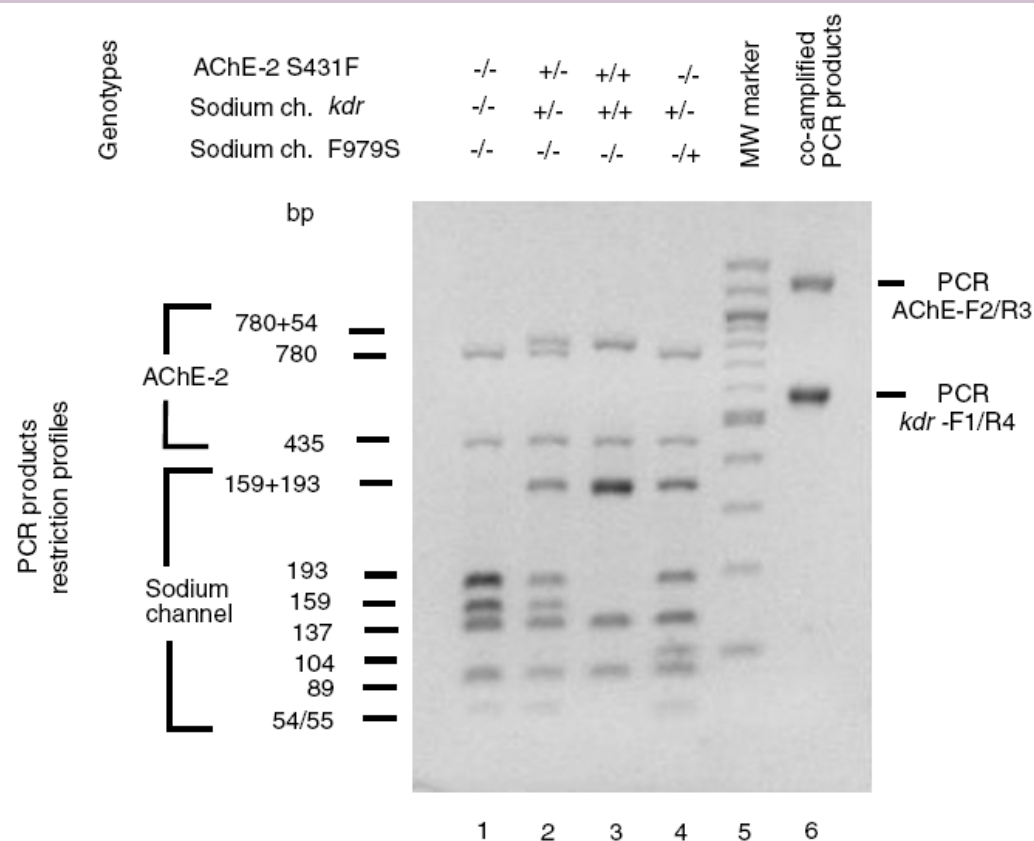


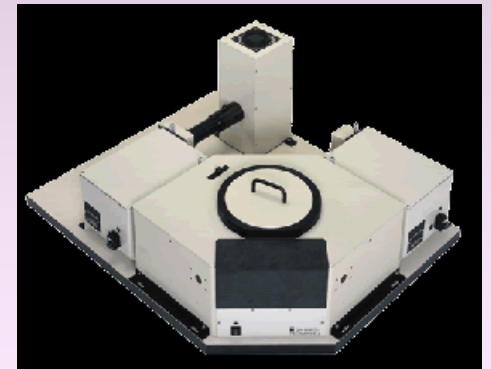
Figure 3. Gel electrophoresis of restriction profiles for the co-amplified PCR products according to different genotypes.

Analisi biochimiche:

- sono specifiche per la diagnosi di resistenze metaboliche (esterasi, GST, MFO) talvolta anche target-site (AChE)
- consentono diagnosi a livello di "individuo"
 - a) possibilità di identificare la coesistenza di diversi meccanismi di resistenza
 - b) Possibilità di identificare una resistenza nelle fasi iniziali di diffusione



- sono rapide



- sono normalmente abbastanza economiche
- danno informazioni quantitative ma non qualitative

Esterasi

ESTs

1/2-naftyl-acetato



acetato+1/2naftolo

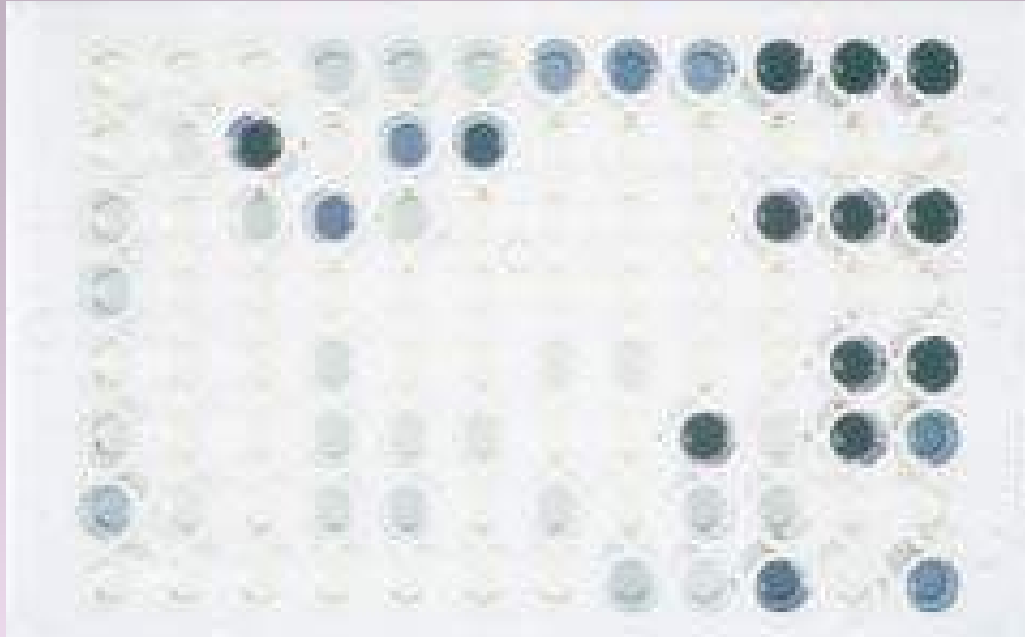


+SDS+

1/2naftolo+
Fast RR-salt



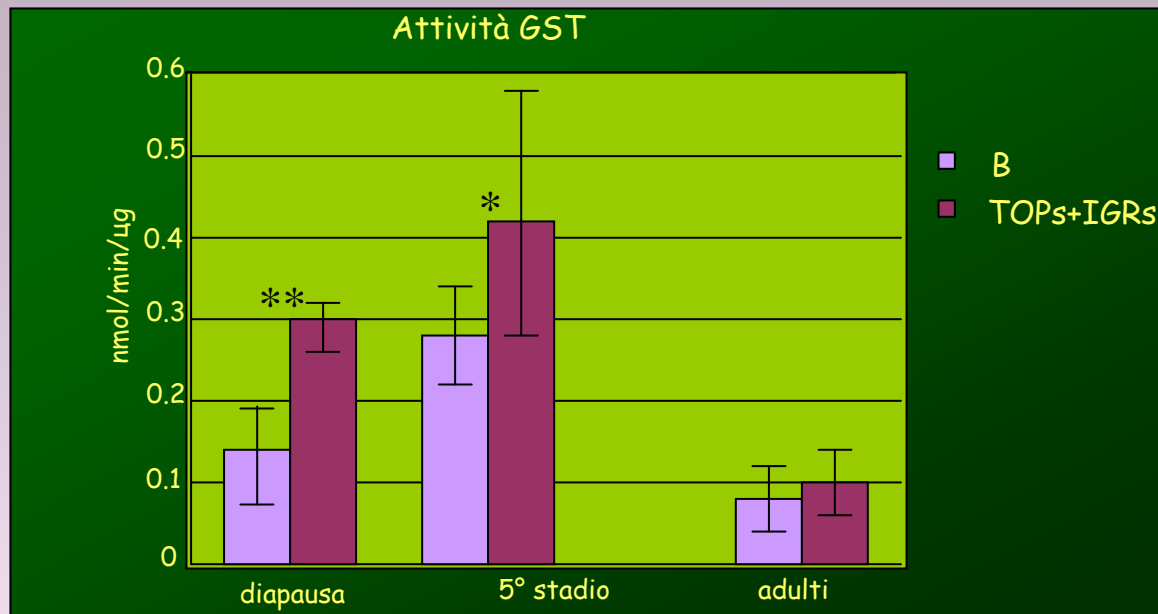
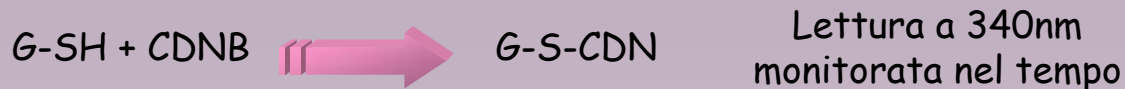
complesso coniugato,
assorbimento a
450nm



Nelle ESTERASI, differenze qualitative (isoenzimi), oltre che quantitative, in singoli individui, possono essere potenzialmente responsabili di una diversa risposta al trattamento



Glutathione Solfo Trasferasi



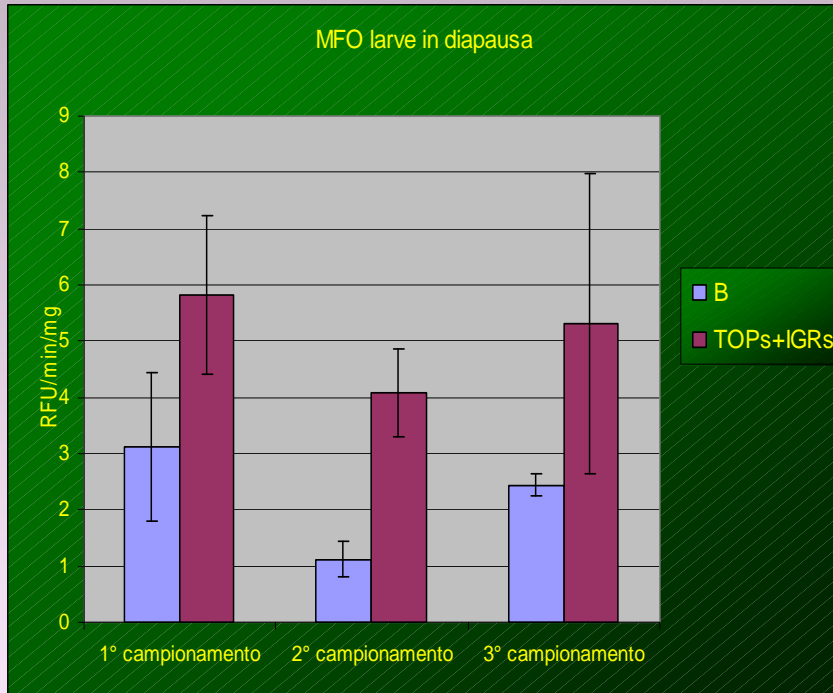
✓ Stadi larvali: sistema di detossificazione preferenziale famiglia GST (t-Student * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$)

Il saggio biochimico sfrutta la capacità degli enzimi GSTs di coniugare un reagente substrato (1-cloro, 2-4 dinitrobenzene; CDNB) con il glutathione ridotto (GSH) per ottenere un prodotto, otticamente attivo

Ossidasi a Funzione Mista

MFO

7-ethoxycoumarin $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ 7-oxycoumarin $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ eccitazione a 350nm $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ emissione fluorescenza a 450nm

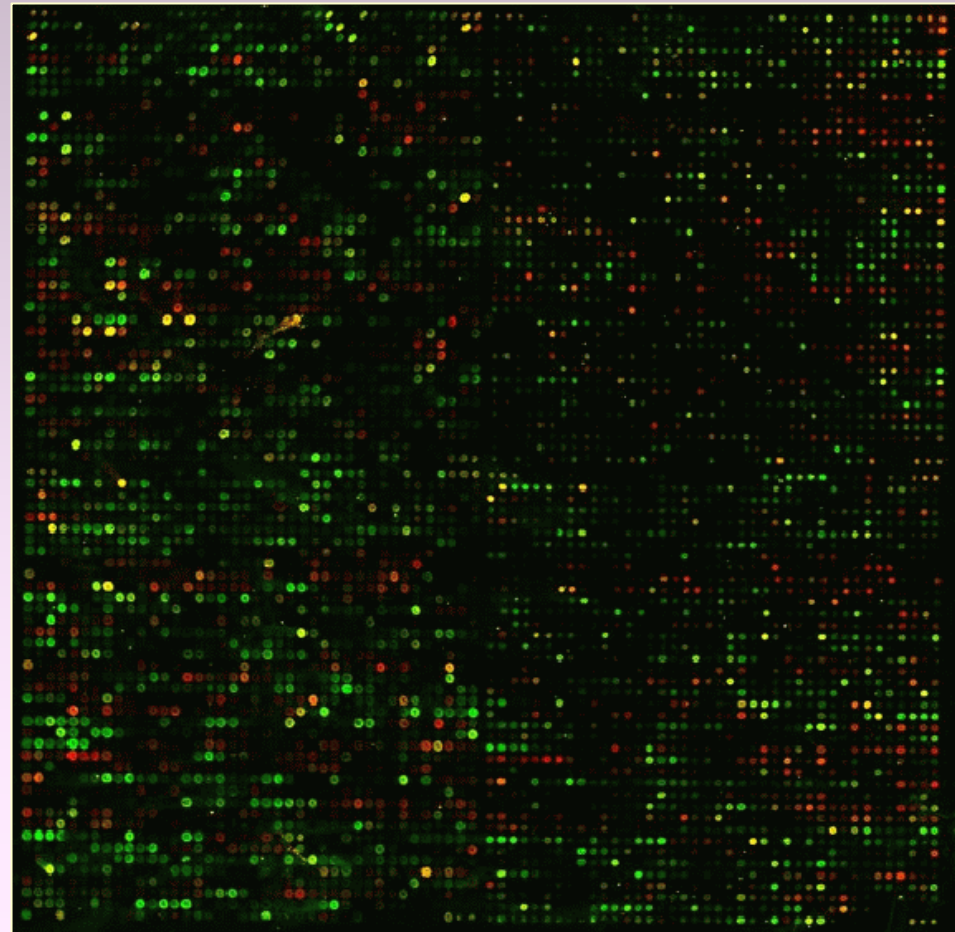


✓Le MFO contribuiscono al processo di detossificazione degli OPs e IGRs nelle larve in diapausa (t-Student *P<0.05; **P<0.001).

Il saggio biochimico valuta la capacità delle MFO di convertire **7-ethoxycoumarin** in **7-oxycoumarin**, composto fluorescente. La procedura è automatizzata tramite l'utilizzo di un lettore di micropiastre piastre

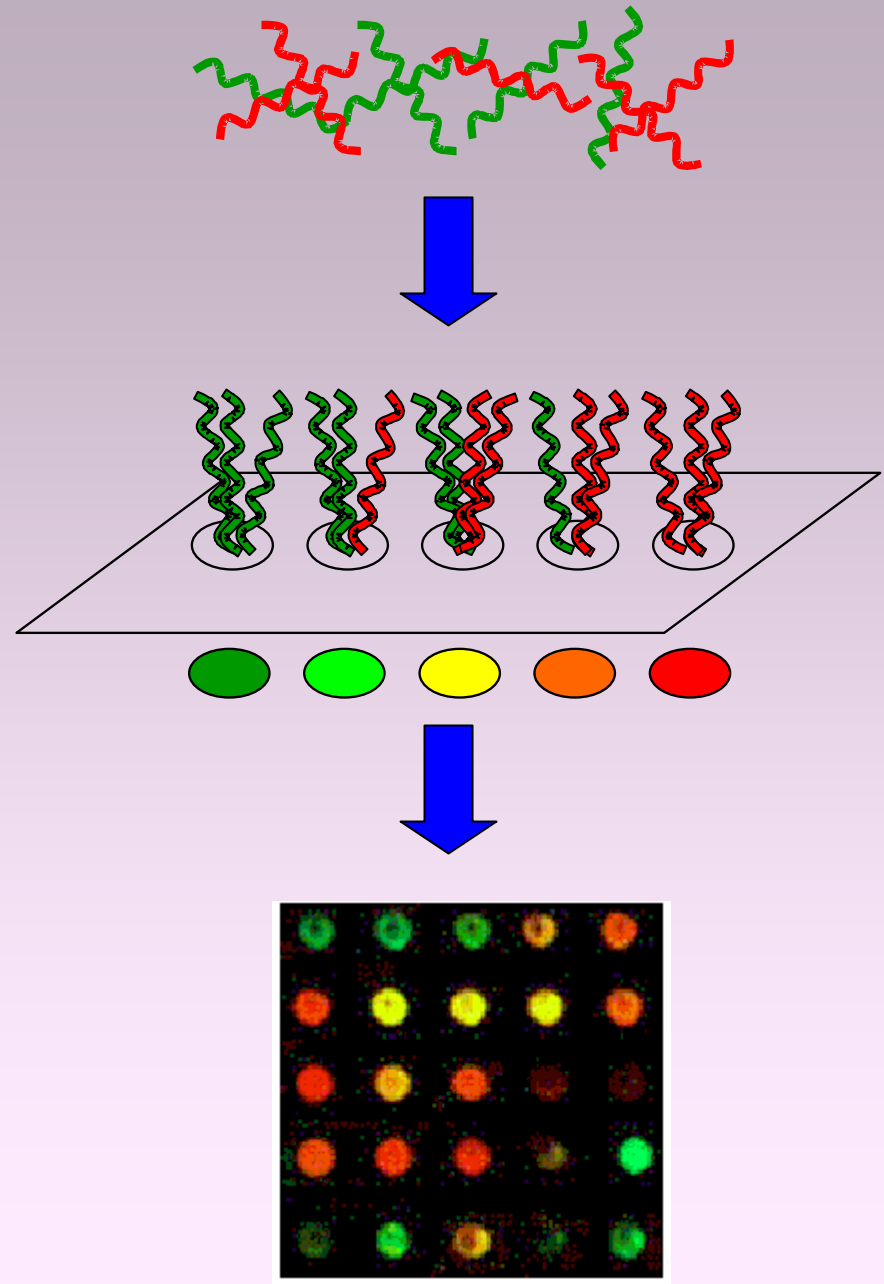
Microrray di cDNA (o di oligonucleotidi lunghi)

- Le molecole sonda sono cDNA o oligonucleotidi lunghi **70-80 paia di basi**, sintetizzati tradizionalmente e legati ad un vetrino da microscopio per mezzo di un processo di stampa a getto (spotting)
- Su ogni vetrino trovano posto fino a 10000 geni.
- Metodica usata per comparare le differenze di espressione genica tra due campioni biologici



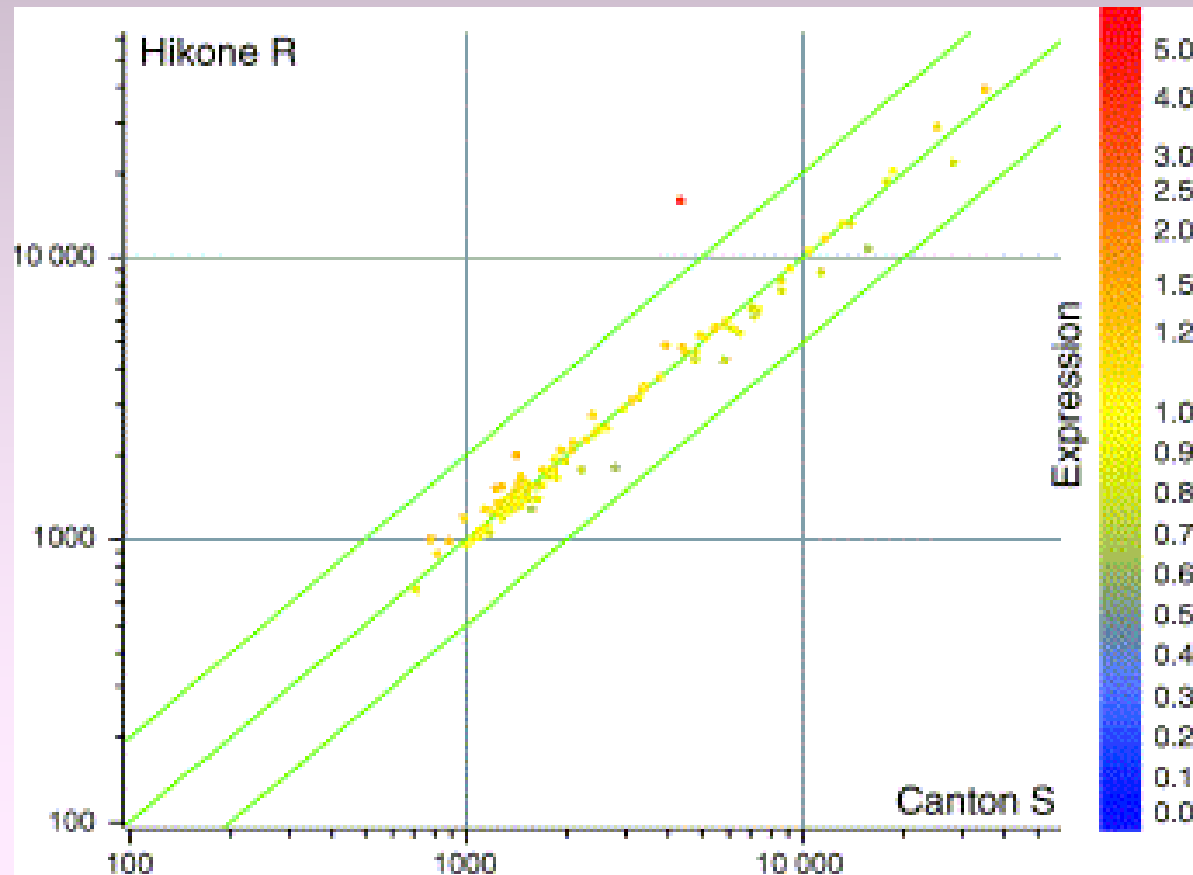


piccola regione di un microarray che rappresenta
l'espressione di 110 geni del lievito



The genetics and genomics of insecticide resistance

Richard H. ffrench-Constant, Phillip J. Daborn and Gaelle Le Goff

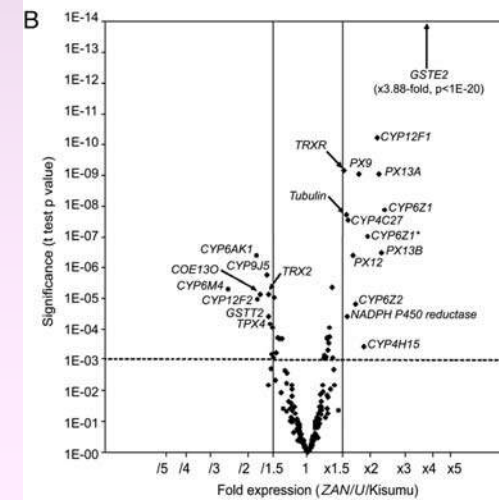
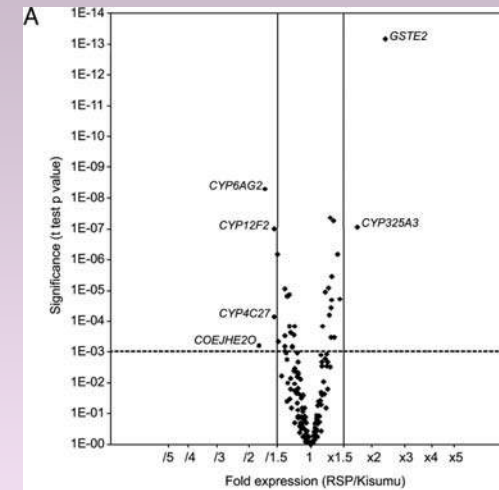
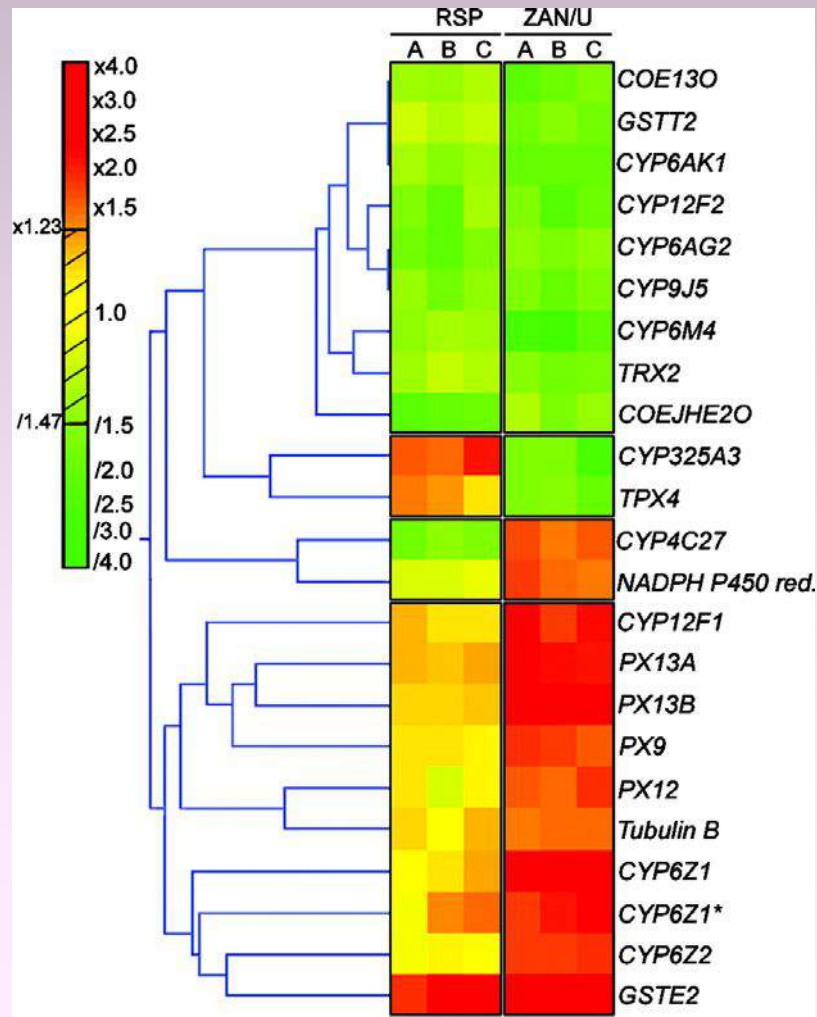


The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors

Jean-Philippe David*, Clare Strode*, John Vontas^{†‡}, Dimitra Nikou^{†‡}, Ashley Vaughan*, Patricia M. Pignatelli*, Christos Louis^{‡§}, Janet Hemingway*, and Hilary Ranson*^{¶1}

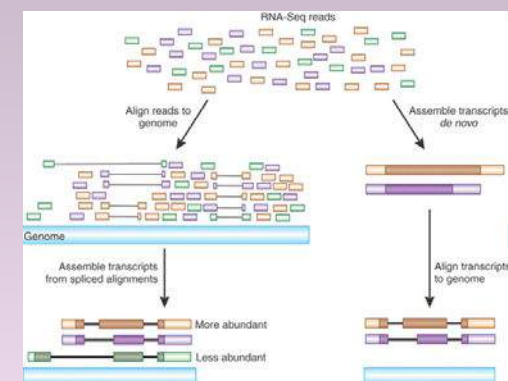
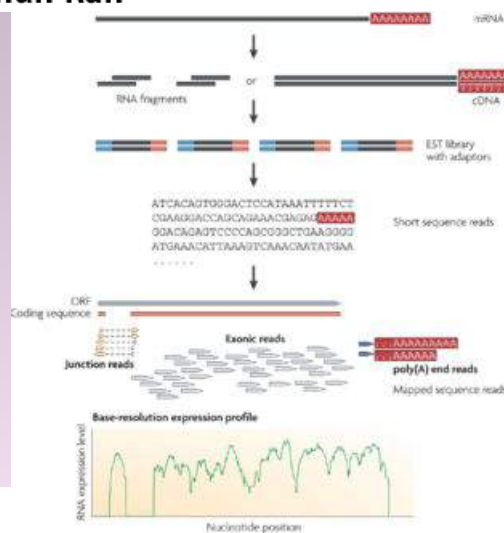
*Vector Research Group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L35QA, United Kingdom; [†]Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Foundation for Research and Technology, Hellas, Vassilika Voutou, P.O. Box 1527, 711 10 Heraklion, Crete, Greece; and [‡]Department of Biology, University of Crete, 714 09 Heraklion, Crete, Greece

Edited by Barry J. Beaty, Colorado State University, Fort Collins, CO, and approved February 7, 2005 (received for review December 16, 2004)



Analysis of Transcriptome Differences between Resistant and Susceptible Strains of the Citrus Red Mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae)

Bin Liu^{1,2}, Gaofei Jiang², Yunfei Zhang², Junli Li², Xiaojiao Li^{1,2}, Jiansu Yue^{1,2}, Fei Chen^{2,3}, Haoqiang Liu², Hongjun Li², Shiping Zhu², Jinjun Wang³, Chun Ran^{2*}



Mamidala et al. *BMC Genomics* 2012, **13**:6
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/6>

Nature Reviews | Genetics



RESEARCH ARTICLE

Open Access

RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug

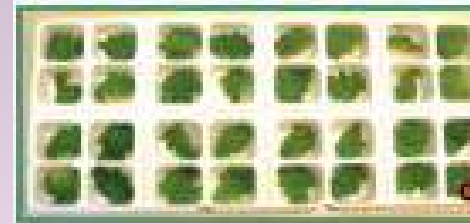
Praveen Mamidala¹, Asela J Wijeratne², Saranga Wijeratne², Karl Kornacker³, Babu Sudhamalla⁴, Loren J Rivera-Vega¹, Andrew Hoelmer⁵, Tea Meulia², Susan C Jones⁵ and Omprakash Mittapalli^{1*}

Sviluppo di nuovi test diagnostici: Fase I: Identificazione del modello

Rilevazione della ridotta efficacia in campo

Raccolta dei campioni della popolazione (stadio target)

Biosaggio



Popolazione di campo

CTRL

Selezionati al biosaggio
(diversi principi attivi)

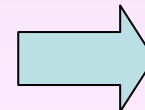
Resistenza crociata

Resistenza multipla

mantenimento del modello

Allevamento
Diapausa (copia popolazione originale)

selezione in lab (progressivo arricchimento popolazione di studio con individui resistenti)



Analisi di laboratorio

Sviluppo di nuovi test diagnostici: Fase II: Identificazione possibili meccanismi

Selezionati da campo/biosaggio/ in lab
(diversi principi attivi)

1 fase

2 fase

Screening geni candidati noti

Screening geni candidati non noti

- Test molecolari rapidi

- Analisi biochimica (attività enzimatica totale)

ricerca mutazioni note es: AChE, KdR
(target specifica)

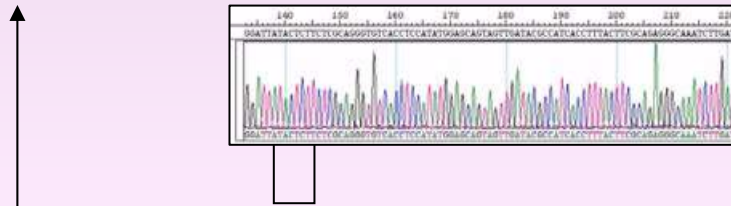
analisi espressione singoli membri noti delle
famiglie multigeniche: MFO, GST, Esterasi
(metabolica)

↑ Esterasi (metabolica)

↑ MFO (metabolica)

↑ GST (metabolica)

- Sequenziamento diretto geni es: AChE e KdR
(ricerca nuove mutazioni)



Sviluppo test rapidi per i nuovi geni candidati
identificati

verifica

meccanismi

CTRL

Ricampionati
da campo