Gestione delle resistenze: nuove strategie di difesa integrata
Veneto Agricoltura 19 gennaio 2012

Fitofagi: evoluzione delle popolazioni a rischio resistenza

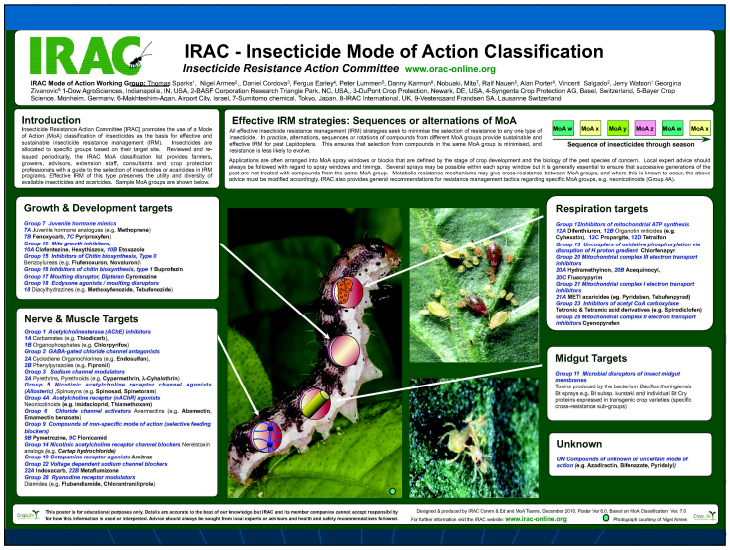
Piero Cravedi
Istituto di Entomologia e Patologia vegetale
U.C.S.C.- Piacenza

LA RESISTENZA definizioni

- Sawicki, 1987
  - "Resistance is a genetic change in response to selections to toxicants that may impair control in the field"
- IRAC, 2005
  - *"a heritable change in the sensitivity of a pest population that is reflected in the repeated failure of a product to achieve the expected level of control when used according to the label recommendation for that pest species"*

Le prime segnalazioni

- 1908 - *Quadraspidiotus perniciosus* resistente ai polisolfuri
  - Forgash A.J., 1984. *History, evolution and consequences of insecticide resistance.* Pest Biochem. Physiol. 22: 178-186
- Incremento dei casi con l'avvento degli insetticidi di sintesi



Studi sulla resistenza

- Gli studi disponibili interessano prevalentemente ditteri di interesse medico e veterinario e Drosofila
- Gli insetti di interesse agrario sono stati meno studiati. I modelli già noti possono essere un prezioso riferimento per gli aspetti genetici e di biologia molecolare

Origine della resistenza aspetti teorici

- La resistenza è la risposta di una popolazione di insetti alla pressione di selezione operata da ripetuti trattamenti chimici
- Gli insetticidi non provocano le variazioni genetiche
- Mutazioni casuali sono responsabili della diminuzione della sensibilità ad un insetticida.

Preadattamento

- I geni che regolano i meccanismi di resistenza possono essere già presenti, con frequenze molto basse, nella popolazione prima che un insetticida entri nell'uso
- Possono essere avvenute mutazioni in precedenza.
- I caratteri di resistenza possono essere stati selezionati da trattamenti con altri prodotti
- La teoria del preadattamento è stata dimostrata in ceppi di mosca domestica resistenti al DDT

Frequenza genica

- La frequenza degli alleli di resistenza è generalmente bassa
- Sono tuttavia noti casi in cui la frequenza è sorprendentemente alta (es. ceppi di Anofele resistenti ai piretroidi e di Sesamia resistenti al *Bacillus thuringiensis*)

Dominanza e numero dei geni

- La resistenza ai carbammati e agli esteri fosforici è generalmente dominante o parzialmente dominante
- La resistenza a *B.t.* e a spinosine è generalmente recessiva
- La resistenza ai piretroidi è generalmente incompletamente recessiva
- Nei casi di ereditarietà monofattoriale il grado di dominanza si può calcolare nelle progenie F1

Instaurazione della resistenza

- Fattori che favoriscono l'instaurarsi della resistenza (pressione di selezione):
  - ripetuto impiego del prodotto
  - superficie interessata ampia
  - popolazione isolata
  - impiego ripetuto sulla stessa generazione
  - alte dosi di impiego
    - (se dovuta a gene dominante anche le basse dosi)

Meccanismi di resistenza fisiologica

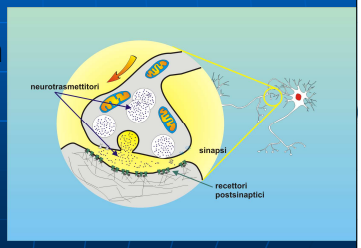
- Riduzione della penetrazione degli insetticidi
- Insensibilità del sito bersaglio
- Incremento della detossificazione

Trasmissione sinaptica eccitatoria

- L'acetilcolina è un neurotrasmettitore ubiquitario
- Ci sono due tipi distinti di recettori per l'acetilcolina: nicotinico e muscarinico
- Il recettore nicotinico è un singolo complesso proteico nella membrana che è sia recettore sia canale ionico
- I recettori muscarinici controllano canali ionici attraverso la produzione di secondi messaggeri intracellulari

Acetilcolinesterasi

- enzima responsabile della idrolisi dell'acetilcolina a livello della sinapsi
  - il livello di ACh deve essere mantenuto prossimo a 0
- effetti della mancata idrolisi:
  - crescita del livello di AChE
  - ripetuta eccitazione dei neuroni
  - morte per "esaurimento"



Alterazione dell'acetilcolinesterasi (insensitive AChE)

- prodotta da mutazioni
- spesso più mutazioni concorrono a modificarla
- in genere le mutazioni riducono l'efficienza globale dell'AChE

Mutazione del recettore nicotinico

- E' stata descritta una mutazione puntiforme in una posizione conservata della sub unità 2 del n AChR
- Come risultato si ha una riduzione dell'intensità di legame tra recettore e insetticida

Trasmissione sinaptica inibitoria

- I canali postsinaptici responsabili sono controllati dal trasmettitore acido gamma amino butirrico (GABA)
- L' alterazione del recettore GABA (sito bersaglio) conferisce resistenza
- Gli insetticidi interessati sono i phenylpyrazoles (fipronil) e le avermectine

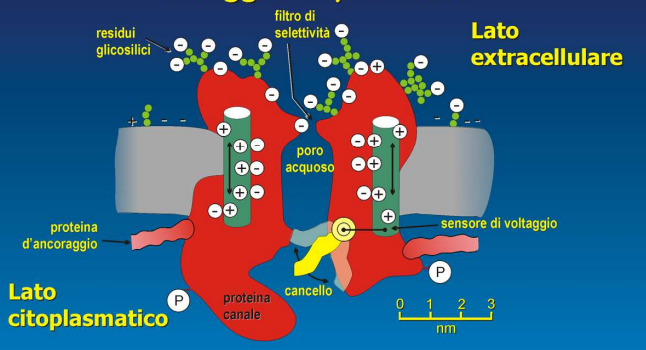
Propagazione dei potenziali d'azione

- Ogni neurone deve trasformare l'input sinaptico in una sequenza di potenziali d'azione per la **propagazione entro il suo assone**
- I componenti eccitabili del neurone risiedono nella sua **membrana superficiale**
- Il doppio strato lipidico della membrana contiene **macromolecole specializzate** che servono come **canali selettivi per il flusso ionico** verso l'interno e l'esterno della cellula

I canali del Na

- Alla fine degli anni 80 è stato clonato, entro il locus paralysis sul cromosoma X di Drosophila, il "para" voltage-gated sodium channel del sistema nervoso degli insetti

Ipotesi sulla struttura di un canale ionico voltaggio - dipendente



Alterazione del sito bersaglio

- knockdown resistance (kdr)
  - interessa piretroidi e difeniletani (DDT e methoxychlor)
  - dovuta nei casi più noti alla sostituzione di 1 (*kdr*) o 2 (s*kdr*) amminoacidi nel canale del sodio
  - sono però note molte altre mutazioni il cui effetto è però solo parzialmente conosciuto

Incremento della detossificazione
monoossigenasi dipendenti dal citocromo P_{450}

- causano resistenza a tutti i maggiori gruppi di insetticidi (esclusi i ciclodienici)
- evidenziate indirettamente
  - (effetto sinergizzante del PBO e composti correlati)
  - spesso con risultati contraddittori
- è anche possibile utilizzare tecniche biochimiche o molecolari

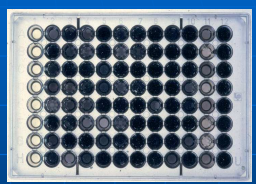
Incremento della detossificazione
esterasi e idrolasi

- causano resistenza ai fosforganici e ai piretroidi
  - maggior efficienza enzimatica
  - maggior produzione
- esistono forme diverse identificabili elettroforeticamente e / o spettrofotometricamente impiegando substrati artificiali

Incremento della detossificazione
esterasi e idrolasi

- carbossilesterasi E4/FE4 in *Myzus persicae*
  - 10-12 pmoli/afide
  - 1-2% del contenuto proteico totale
  - gene amplificato
  - agisce soprattutto sequestrando l'insetticida

Saggi biochimici in micropiastra
Esterasi totali



- 1-naftilacetato + H_2O → 1-naftolo + acido acetico
- naftolo + DBLS → assorbanza a 620 nm

E' noto il legame tra assorbanza e livello di resistenza

Legame assorbanza - livello di resistenza (A.L. Devonshire, 1992)

- Ceppi di *Myzus persicae* con livello noto di resistenza danno questi valori di assorbanza:
  - Sensibili (S) A620 < 0.4
  - Poco Resistenti (R1) 0.3 < A620 < 0.8
  - Molto Resistenti (R2) 0.5 < A620 < 1.5
  - Estremamente Resistenti (R3) A620 > 1.5

Considerazioni

- Le ricerche stanno fornendo risultati scientifici di rilievo grazie all'applicazione di tecniche di biochimica e di genetica molecolare.
- Gli sforzi futuri dovranno essere rivolti ad applicare le conoscenze di base alla soluzione di problemi di campo.