

PROVE DI LABORATORIO SULL'ATTIVITÀ OVICIDA E LARVICIDA DI ALCUNE SOSTANZE SU UOVA DI *HALYOMORPHA HALYS*

M. PASINI¹, F. LANZA¹, M. ANDREOLLI²

¹ Agrea Centro Studi, via G. Garibaldi 5/16 - 37057 San Giovanni Lupatoto (VR)

² Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona

Strada Le Grazie 15 - 37134 Verona

max.pasini@agrea.it

RIASSUNTO

Nel corso del 2021 sono state condotte ricerche di laboratorio per verificare l'attività ovicida di olii paraffinici, acetamiprid e olio di arancio dolce nei confronti della cimice marmorata asiatica *Halyomorpha halys*. Sono state trattate singole ovature, che costituiscono una replica ed è stata calcolata la media di uova non schiuse e la mortalità delle neanidi nell'arco della prima età. I risultati indicano un notevole decremento della percentuale di schiusa (statisticamente significativo) in uova trattate con olio paraffinico (formulati Oliocin e Ultra Fine Oil). Inoltre, è emersa la elevata attività insetticida residua di acetamiprid sia in miscela all'olio di arancio dolce (Prev-Am Plus), sia da solo. I risultati aprono una possibile via di ricerca per la determinazione in campo di effetti tossici su uova di *H. halys* da parte di sostanze di largo uso e con basso impatto sugli ausiliari e dimostrano l'attività residua di acetamiprid sui neonati di cimice.

Parole chiave: cimice asiatica, olio minerale paraffinico, acetamiprid, olio di arancio dolce

SUMMARY

LABORATORY TESTS ON THE OVICIDAL AND INSECTICIDAL ACTIVITY OF SOME SUBSTANCES ON *HALYOMORPHA HALYS*

During 2021, laboratory trials were conducted to verify the ovicidal activity of paraffinic oils, acetamiprid and sweet orange oil against the Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys*. Single egg masses were treated (1 egg mass = 1 replicate) and the mean number of unhatched eggs and the mortality of the nymphs in the first age were calculated. The results indicate a significant decrease in the percentage of hatching in eggs treated with the paraffinic oil (both Oliocin and Ultra Fine Oil formulations). In addition, a high residual insecticidal activity was shown by acetamiprid both in mixture with orange oil (Prev-Am Plus) and alone. These results open up new possible ways of determining in the field toxic effects on *H. halys* eggs of widely used substances with low impact on beneficials. They also demonstrate the residual activity of acetamiprid in the young first age nymphs of BMSB.

Keywords: Brown Marmorated Stink Bug, mineral oil, acetamiprid, sweet orange oil

INTRODUZIONE

Da diversi anni il settore ortofrutticolo in Italia è costretto a convivere con la cimice asiatica *Halyomorpha halys* (Stål), che in molti areali è divenuto un fitofago chiave attorno al quale ruota, con notevoli difficoltà, la difesa fitosanitaria: Allo stato attuale delle conoscenze, la lotta chimica non è sufficiente a contenere completamente i gravi danni inferti alle colture ortofrutticole (Maistrello et al., 2018).

Diverse sperimentazioni condotte in Italia e all'estero hanno contribuito a validare o meno l'uso di sostanze chimiche di sintesi e di derivazione naturale (Bergmann e Raupp, 2014; Nannini et al., 2016; Pasini et al., 2018; Pasqualini et al., 2016), mentre si sta completando la prima fase della lotta biologica classica, in corso di attuazione attraverso il lancio del

parassitoide oofago *Trissolcus japonicus*, coadiuvato dall'azione del già insediato *Trissolcus mitsukurii* (Zapponi et al., 2021). A livello di pratiche agronomiche, l'impatto viene ridotto con l'utilizzo di reti multifunzionali abbinate ai trattamenti chimici (Caruso e Vergnani, 2019) e altri metodi, anch'essi non risolutivi, in una prospettiva di lotta integrata, come il metodo "attract and kill" e le trappole a cattura massale (Tommasini et al., 2019). Un recente filone di ricerca è il controllo simbiotico, cioè l'interruzione della trasmissione verticale del batterio endosimbionte *Pantoea carbekii* dall'uovo alle neanidi neonate, attraverso l'uso di sostanze di diversa natura, con risultati promettenti ottenuti in laboratorio (Gonella et al., 2019).

Anche la sperimentazione oggetto del presente contributo ha avuto come bersaglio l'uovo di cimice asiatica, ma con l'obiettivo di verificare la tossicità diretta di sostanze insetticide di diversa natura, tra cui gli olii minerali paraffinici. Questi sono molto usati nella lotta antiparassitaria ed esplicano l'azione insetticida principalmente per asfissia, attraverso l'occlusione delle trachee (via stigmi tracheali), come nel caso di cocciniglie, afidi e acari. L'azione non si limita alle sole forme pre-immaginali ma anche alle uova, con meccanismi d'azione più complessi e variegati, interferendo con la struttura del corion o addirittura penetrando all'interno e interferendo con l'embriogenesi (Buteler e Stadler, 2010). Seguendo questa strada, ci si è chiesti se questo tipo di meccanismo potesse essere un fattore limitante anche per la sopravvivenza dell'embrione di *H. halys* in applicazioni su ovature appena deposte.

Tale ipotesi è stata saggiata in uno studio di laboratorio in condizioni controllate, a cui si è aggiunta la verifica dell'azione di acetamiprid, una sostanza attiva tra le più impiegate nella lotta chimica alla cimice asiatica (Nannini et al., 2016), nell'ipotesi di un effetto insetticida diretto o di persistenza a carico dell'embrione o delle neanidi neonate, quando applicato precedentemente sulle ovature. Si è voluto verificare anche l'attività della miscela di acetamiprid e olio di arancio dolce e di quest'ultimo da solo. L'olio di arancio dolce viene attualmente utilizzato come insetticida-acaricida su diversi fitofagi ma non vi sono dati sperimentali sulle uova di cimice asiatica.

MATERIALI E METODI

La prova è stata svolta in cella climatica con temperatura di 25°C, U.R. 60% e fotoperiodo pari a 16:8 (luce : buio). Le ovature da saggiare sono state prodotte negli allevamenti del laboratorio di Agrea, sempre in cella climatica con le stesse caratteristiche. Si tratta di uova deposte dalle 8 alle 32 ore prima dell'applicazione. Gli allevamenti sono costituiti da box del tipo BugDorm in cui sono inseriti maschi e femmine provenienti dal campo (areale frutticolo veronese), alimentati con fagiolino, peperone, kiwi, semi di girasole in accordo con i metodi a tutt'oggi più produttivi (Dingha e Jackai, 2016).

Le ovature raccolte dagli allevamenti sono state incollate su un piccolo supporto rettangolare in PET in attesa dell'applicazione, previo conteggio del numero di uova presenti. Una ovatura costituiva una replica e sono state utilizzate dalle 3 alle 12 repliche per ogni trattamento. Dopo l'applicazione ogni ovatura è stata posta in scatole di plastica (contenitori per alimenti) con fagiolini come fonte di alimentazione e una provetta con tampone di carta assorbente come fonte di acqua.

Il disegno sperimentale utilizzato era la randomizzazione completa. Nella tabella 1 sono riportate le sostanze attive, i formulati e le dosi utilizzate nella prova.

Tabella 1. Tesi e formulati considerati nella sperimentazione

Numero	Sostanza attiva	Formulato	Formulazione e concentrazione s. a.	Dose formulato mL/hL	Numero repliche
1	Testimone non trattato	-	-	-	12
2	Olio minerale paraffinico	Oliocin	EW 696 g/L	1.500	7
3	Olio minerale paraffinico	Ultra Fine Oil	EC 790 g/L	1.500	6
4	Acetamiprid	Epik SL	SL 50 g/L	150	3
5	Acetamiprid	Epik SL	SL 50 g/L	150	5
	Olio di arancio	Prev-Am Plus	SL 60 g/L	400	
6	Olio di arancio	Prev-Am Plus	SL 60 g/L	400	3

L'applicazione è stata fatta attraverso l'immersione diretta dell'ovatura nella soluzione insetticida per 3 secondi e successivo tamponamento del liquido in eccesso (nel caso del testimone, solo in acqua) con carta da filtro. Dopo l'applicazione è iniziato il periodo di osservazione, con la registrazione del numero di uova non schiuse, del numero di neanidi neonate e della loro mortalità, fino al raggiungimento della seconda età.

L'analisi statistica è stata fatta attraverso Anova e test SNK, previa trasformazione angolare dei dati espressi in percentuale.

RISULTATI

Il dato più interessante è l'elevata percentuale di uova non schiuse nei due trattamenti con gli olii minerali, che per il formulato Oliocin si posiziona al 76% mentre per Ultra Fine Oil al 56% (figura 1). L'analisi statistica dei dati pone entrambi i formulati a differenziarsi dal testimone non trattato. La mancanza di schiusura di uova negli altri trattati raggiunge il 23% in Epik + Prev-Am Plus, il 27% in Prev-Am Plus e il 18% in Epik. Questi tre valori, che non si differenziano statisticamente dal testimone, indicano che l'azione tossica non si è esplicata verso l'uovo, se non in minima parte.

Nella figura 2 è riportata la percentuale di mortalità delle neanidi neonate dalla schiusura fino al momento della prima muta. Come si osserva, i dati si orientano in un senso quasi opposto, con le mortalità più alte a carico dei trattamenti contenenti acetamiprid. I due trattamenti con Epik da solo e in miscela con Prev-Am Plus raggiungono rispettivamente il 64 e il 65% di mortalità, differenziandosi entrambi in modo significativo rispetto al testimone, in cui invece la mortalità si pone al 9%. Fra gli altri trattamenti sia l'olio di arancio da solo che i due olii minerali provocano una mortalità trascurabile, non significativa rispetto al testimone all'analisi statistica.

Figura 1. Percentuale di uova non schiuse dopo l'applicazione delle sostanze insetticide
 Le lettere indicano la significatività statistica considerando il livello di $P < 0,05$; lettere diverse indicano medie statisticamente diverse. Le barre rappresentano l'errore standard.

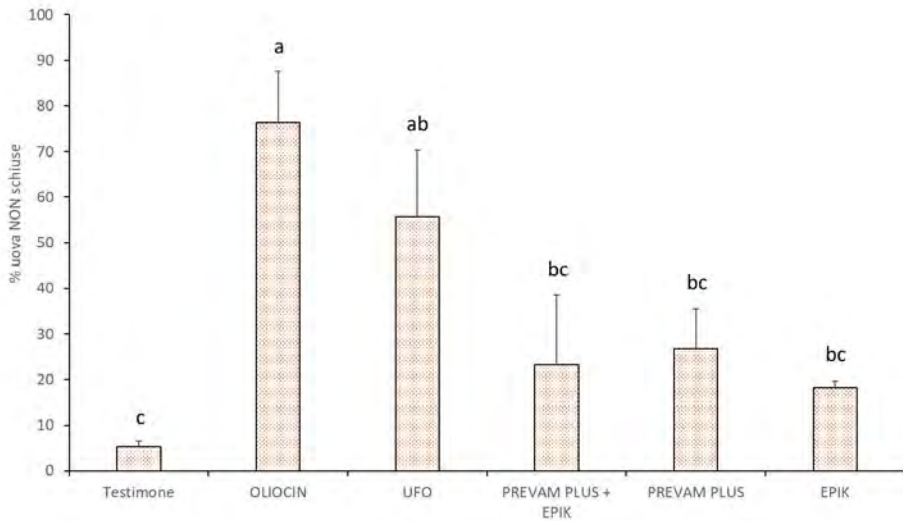
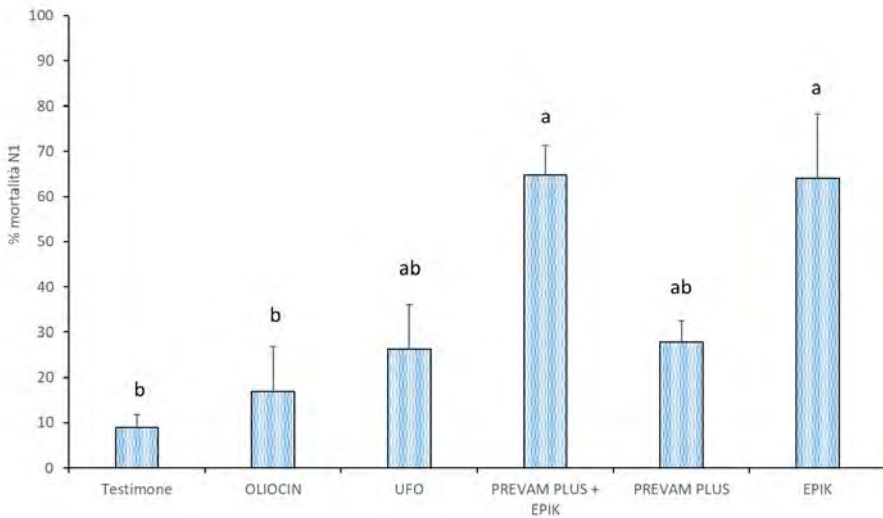


Figura 2. Percentuale di mortalità delle neanidi neonate rispetto alle uova deposte.
 Le lettere indicano la significatività statistica considerando il livello di $P < 0,05$; lettere diverse indicano medie statisticamente diverse. Le barre rappresentano l'errore standard.

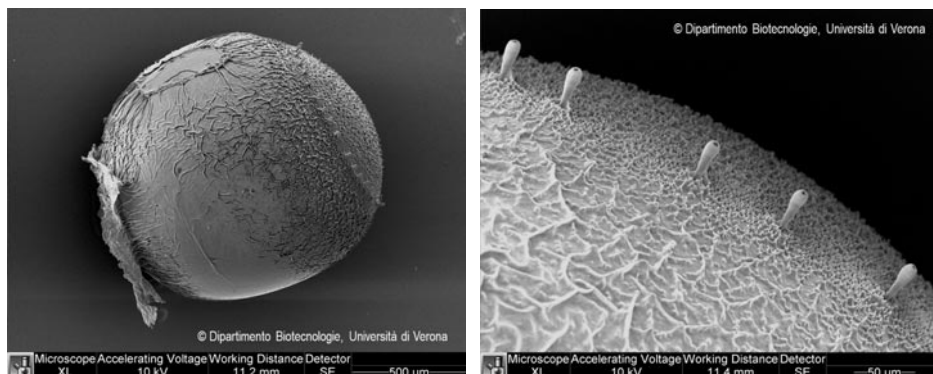


DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati raccolti indicano un importante effetto sulla schiusura da parte degli olii paraffinici e un altrettanto importante effetto residuo di acetamiprid, applicato precocemente sulle ovature, a carico delle neanidi di prima età.

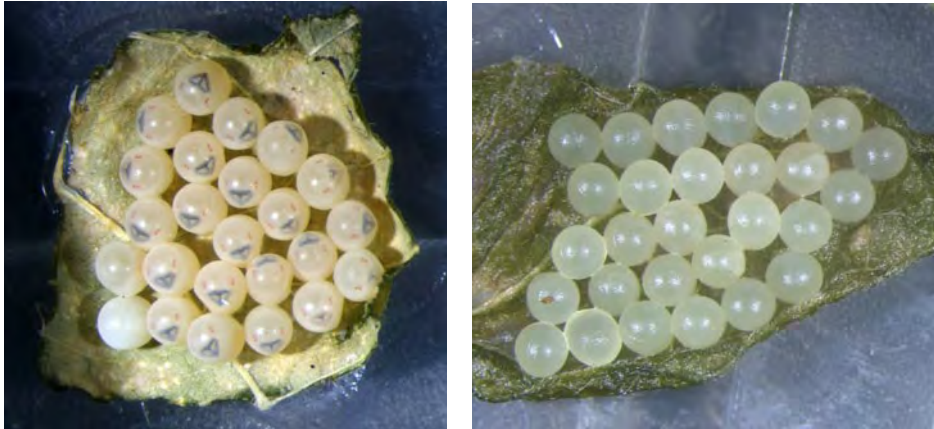
Una delle ipotesi sul meccanismo di azione degli olii paraffinici è che vengano occlusi gli aeropili, presenti nella regione superiore, disposti ad anello circolare, a definire la regione del corion (opercolo) che aprendosi permette l'uscita della neanide (figura 3). Queste strutture sono preposte allo scambio gassoso interno-esterno (Hinton, 1981; Matesco et al., 2009) e, conoscendo l'azione generale degli olii, l'interferenza a questo livello sembra essere confermata. Secondo la revisione fatta da Buteler e Stadler (2010) il meccanismo d'azione degli olii paraffinici, quando applicati sulle uova di insetti è molteplice: 1) blocco del normale scambio di gas attraverso il rivestimento esterno (non solo via aeropili); 2) interferenza sulla schiusura a causa dell'indurimento del rivestimento esterno; 3) interferenza con l'equilibrio idrico interno; 4) destrutturazione del corion; 5) penetrazione e successiva coagulazione del protoplasma; 6) interferenza con l'attività enzimatica o ormonale.

Figura 3. Immagini al SEM dell'uovo di *H. halys* nel testimone non trattato. A sinistra, particolare della regione superiore dove è evidente la "corona" di aeropili (© Dipartimento Biotecnologie, Università di Verona).



Nella figura 4 si può osservare l'evidente differenza nell'aspetto esterno delle ovature trattate con uno dei due olii minerali (Ultra Fine Oil) rispetto al testimone. L'immagine mostra come si deposita lo strato oleoso superficie del corion, suggerendo che il meccanismo di azione possa essere dovuto, oltre all'asfissia, anche ad altri tipi di interferenze. In particolare, si nota l'assenza degli abbozzi della neanide, segno di un arresto dello sviluppo avvenuto dal momento dell'applicazione in avanti.

Figura 4. Ovature del testimone non trattato (sinistra) e del trattato con Ultra Fine Oil (destra), quattro giorni dopo l'ovideposizione



Per quanto riguarda acetamiprid, vi sono studi che indicano mortalità delle uova elevate (Bergmann e Raupp, 2014). In questo studio appare invece evidente solo l'attività residua insetticida a carico delle neanidi. Un possibile ulteriore effetto da verificare potrebbe essere quello della miscela di acetamiprid con olio paraffinico, per conferire maggiore affinità fisico-chimica con la superficie del corion e una possibile via di penetrazione, dato il carattere prettamente idrofobo della superficie esterna dell'uovo.

L'olio di arancio dolce è stato saggiato in diverse sperimentazioni in Italia contro *H. halys*, riscontrando una certa efficacia sulle forme giovanili (Nannini et al., 2016) e in studi recenti è stata dimostrata un'azione tossica del suo principale componente, il limonene, contro neanidi di seconda età di *H. halys* (Finetti et al., 2021). Dai risultati qui ottenuti non si osservano azioni contro le uova né un effetto residuo contro le neanidi neonate, così come non appare un evidente effetto sinergico quando utilizzato insieme ad acetamiprid precocemente sulle uova appena deposte. Certamente si tratta di una sostanza che, per esplicare la sua azione, deve entrare in diretto contatto con l'insetto, come dimostrano gli studi di cui sopra.

La sperimentazione ha consentito di raccogliere interessanti indicazioni sul comportamento e sulle caratteristiche specifiche degli olii minerali ed apre la strada ad ulteriori verifiche che potrebbero essere avviate sia in semi-campo che in campo, anche con altri formulati. Viene inoltre dimostrata l'azione insetticida di acetamiprid anche quando applicato precocemente sulle ovature. Ulteriori saggi potrebbero essere condotti anche con l'olio di arancio, lavorando sui dosaggi.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Dott.ssa Ilaria Checchia, del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona, per il lavoro di microscopia effettuato al SEM.

LAVORI CITATI

Bergmann E.J., Raupp M.J., 2014. Efficacies of common ready to use insecticides against *Halymorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Fla. Entomol.*, 97, 2, 791-800

- Buteler M., Stadler T., 2010. A review on the mode of action and current use of petroleum distilled spray oils. In: *Pesticides in the Modern World*, Stoytcheva M. Eds, DOI: 10.5772/20394
- Caruso S., Vergnani S., 2019. Cimice asiatica: buon controllo con le reti multifunzionali. *L'Informatore Agrario*, 24, 25, 47-50
- Dingha N., Jackai A. N., 2016. Laboratory rearing of the brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) and the impact of single and combination of food substrates on development and survival. *Can. Entomol.* 149, 1, 1-14 doi:10.4039/tce.2016.39
- Finetti L., Civolani S., Bernacchia G., 2021. Monoterpenes-induced toxicity in nymphal stages of *Halyomorpha halys*. *Journal of Plant Diseases and Protection - New Series-* 128, 2
- Gonella E., Orrù B., Alma A., 2019. Egg masses treatment with micronutrient fertilizers has a suppressive effect on newly-emerged nymphs of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*. *Entomologia Generalis*, 39, 3-4 doi: 10.1127/entomologia/2019/0819
- Hinton H. E., 1981. Biology of insect eggs. Pergamon Press, New York, 3 vols, 1125 pp
- Maistrello L., Vaccari G., Caruso S., Costi E., Bortolini S., Macavei L., Foca G., Ulrici A., Bortolotti P., Nannini R., Casoli L., Fornaciari M., Mazzoli G. L., Dioli P., 2018. L'invasiva *Halyomorpha halys* è fitofago chiave dei frutteti: risultati del monitoraggio triennale in Emilia. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1, 273-284
- Matesco V. C., Fürstenau B. R. J., Bernardes J. L. C., Schwertner C. F., Grazia J., 2009. Morphological features of the eggs of Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera). *Zootaxa* 1984, 1-30
- Nannini R., Bortolotti P. P., Casoli L., Boselli M., 2016. Attività di diversi insetticidi contro la cimice asiatica. *L'Informatore Agrario*, 17, 53-58
- Pasini M., Tosi L., Mori N., 2018. Cimice asiatica, bassa efficacia di insetticidi di origine naturale. *L'Informatore Agrario*, 3, 59-61
- Pasqualini E., Scannavini M., Preti M., Depalo L., Masetti A., 2016. Attività di diversi insetticidi contro *Halyomorpha halys*. *L'Informatore Agrario*, 20, 50-53
- Serratore V., Capriotti M., Guarnone A., Guastamacchia F., Vitali D., Noacco A., Bitonte D., Passariello S., 2018. Acetamiprid, etofenprox e clorpirifos-metile: esperienze di impiego da soli e in strategia nel controllo della cimice asiatica (*Halyomorpha halys*) su diverse colture frutticole. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1, 415-422
- Tommasini M. G., Maistrello L., Vaccari G., Nannini R., Bortolotti P. P., Caruso S., Casoli L., Vergnani S., Preti M., Montanari M., Landi M., Simoni M., Costi E., Di Bella E., Bulgarini G., Masino F., Antonelli A., 2019. Approccio multidisciplinare per contenere la cimice asiatica. *L'Informatore Agrario*, 13, 38-43
- Zapponi L., Tortorici F., Anfora G., Bardella S., Bariselli M., Benvenuto L., Bernardinelli I., Butturini A., Caruso S., Colla R. et al., 2021. Assessing the distribution of exotic egg parasitoids of *Halyomorpha halys* in Europe with a large-scale monitoring program. *Insects*, 12, 316 <https://doi.org/10.3390/insects12040316>