

• NEI MEDICAI DELL'EMILIA-ROMAGNA

Difendersi dalle cavallette, ma tutelare le api

La miscela di piretro e rotenone e l'acetamiprid potrebbero, in prospettiva, trovare impiego nei confronti delle forme giovanili di cavallette su erba medica, in agricoltura biologica e integrata. Test di tossicità «non tradizionali» hanno però evidenziato ulteriori e determinanti elementi di cui tenere conto al momento della scelta dell'insetticida da impiegare in colture visitate dalle api

di **B. Maccagnani, R. Ferrari, L. Zucchi, M. Bariselli**

Tra le numerose specie di cavallette presenti in Emilia-Romagna *Calliptamus italicus* L. (Orthoptera Acrididae), riconoscibile per le ali posteriori rosa (foto 1), è l'unica le cui popolazioni raggiungono densità tali da diventare problematiche in particolare sull'erba medica, alimento preferito negli stadi giovanili. Forti infestazioni si verificano soprattutto negli ambienti collinari degradati, in cui la semplificazione delle rotazioni colturali ha determinato un sensibile aumento dei terreni messi a riposo. (Ferrari *et al.*, 2006). Solo raramente, sciami di cavallette alla ricer-



Foto 1 - Adulto di *Calliptamus italicus*

ca di cibo raggiungono aree coltivate di pianura, arrecando estesi danni su colture orticole, vite e piante da frutto.

L'utilizzo su vasta scala di insetticidi è inopportuno, e del tutto inutile sugli adulti. Poiché attualmente la deltametrina è l'unica sostanza attiva autorizzata in Italia nei medicinali, il presente lavoro ha avuto il duplice obiettivo di valutare l'efficacia nel controllo delle cavallette di agrofarmaci a minor impatto ambientale e di verificarne la tossicità verso ecotipi locali di api (*Apis mellifera* L.), in quanto i medicinali in fiore rappresentano una fondamentale fonte di cibo per gli insetti pronubi.

Risultati

Efficacia su *Calliptamus italicus*

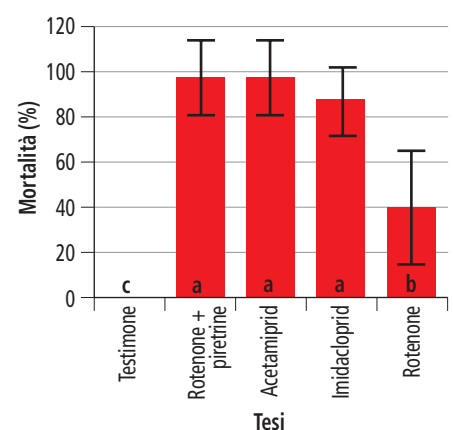
Nella prima prova, condotta trattando direttamente le neanidi, l'analisi della varianza ha mostrato differenze significative, evidenziando un'efficacia statisticamente maggiore di tutti i prodotti nei confronti del testimone. Rotenone + piretrine, acetamiprid e imidacloprid sono risultati più efficaci di rotenone. Non sono invece emerse differenze significative tra rotenone + piretrine, acetamiprid e imidacloprid (grafico 1).

Anche nella seconda prova, in cui le neanidi erano allevate su piantine di medica, l'analisi statistica ha evidenziato differenze significative nella mortalità rispetto al testimone, confermando così l'efficacia insetticida delle due

sostanze attive anche in condizioni più simili a quelle di campo. Inoltre si sono evidenziate differenze significative tra acetamiprid e rotenone + piretrine non manifestatesi nel corso della prima prova (grafico 2), probabilmente attribuibili alle diverse condizioni sperimentali: la sistemicità di acetamiprid potrebbe aver favorito una mortalità maggiore nella seconda prova, grazie alla presenza di piante vive, rispetto alla prima, dove l'insetticida agiva solo per contatto. Al contrario, l'azione dell'insetticida naturale, non sistemico, potrebbe essere stata in parte ostacolata dalla protezione offerta alle neanidi dalle piante di erba medica.

Tossicità acuta su *Apis mellifera*

I dati relativi alla mortalità rilevata durante le prove di tossicità per ingestione (foto 2) e per contatto indiretto, a intervalli crescenti dall'inizio della prova per i vari prodotti saggiati, sono stati trasformati con la formula Schneider - Orelli e riportati rispettivamente nei grafici 3 e 4).



Le barre verticali indicano intervalli di confidenza al 95%. Lettere diverse indicano una differenza significativa per $p \leq 0,05$ (Test SNK).

GRAFICO 1 - Mortalità a 72 ore di *Calliptamus italicus* nelle tesi a confronto (1ª prova)

Tutte le tesi hanno mostrato efficacia statisticamente maggiore rispetto al testimone.

Impostazione delle prove

EFFICACIA DI AGROFARMACI PER IL CONTROLLO DELLE CAVALLETTE (*CALLIPTAMUS ITALICUS*)

Nel 2007 è stata valutata, attraverso due prove di laboratorio, l'efficacia di alcuni formulati commerciali insetticidi nei confronti di neanidi di cavalletta. La prima prova ha inteso fornire indicazioni sull'efficacia di quattro agrofarmaci (rotenone, rotenone + piretrine, acetamiprid, imidacloprid) (tabella 1). Il disegno sperimentale è stato la randomizzazione semplice con quattro ripetizioni per ogni tesi prevista, più il testimone non trattato. La prova è stata condotta in cella climatizzata (temperatura 28 °C; umidità relativa 75%), utilizzando contenitori di plastica da 575 cc, in cui sono state collocate cinque neanidi di *Calliptamus italicus* (esemplari di 5-8 mm raccolti in campo). Gli ortoteri sono stati alimentati quotidianamente con trifoglio. Gli agrofarmaci sono stati somministrati via spray direttamente sulle cavallette nel vasetto con un piccolo nebulizzatore, simulando un impiego di circa 7 hL/ha. In tabella A sono riportati i parametri di utilizzo dei diversi prodotti. I rilievi sono stati eseguiti contando le cavallette morte a 72 ore dal trattamento. La seconda prova, eseguita con lo stesso impianto sperimentale, ha messo a confronto, in condizioni molto simili a quelle riscontrabili in campo, due degli agrofarmaci sperimentati nella prova 1: rotenone + piretrine, con sostanze attive di origine vegetale, e acetamiprid, neonicotinoide di largo impiego in produzione integrata per la sua bassa tossicità, acuta nei confronti delle api. Venticinque neanidi di circa 10 mm sono state poste in vasetti con piantine di erba medica, ricoperti da rete a maglia fine. Il trattamento è stato eseguito con un nebulizzatore manuale, simulando un impiego di circa 7 hL/ha. Il terreno nei vasi è stato umidificato ogni due giorni. I rilievi sono stati eseguiti contando le cavallette morte a 24 e 72 ore dal trattamento. La sperimentazione è stata condotta nella prima decade di giugno 2007 ed è stata eseguita all'aperto, al riparo da pioggia e irraggiamento diretto del sole.

Al momento del trattamento la temperatura era di 22 °C e l'umidità relativa del 74%. I dati sono stati elaborati eseguendo ANOVA a una via, seguita da test di separazione delle medie SNK con $p \leq 0,05$.

TOSSICITÀ ACUTA DI AGROFARMACI SU APIS MELLIFERA PER INGESTIONE E CONTATTO INDIRECTO. I prodotti testati sulle api sono riportati in tabella B. Ogni tesi è stata ripetuta tre volte. Sono state utilizzate piccole gabbie di plastica (13 x 6 x 11 cm) con due pareti di vetro, dotate di un piccolo foglio cereo e un alimentatore. In ciascuna sono state introdotte 10 api bottinatrici prelevate in uscita da un unico alveare e poste al freddo (circa 2 ore a 4 °C) per poterle facilmente maneggiare. Le gabbiette sono state mantenute per tre giorni in cella oscurata a 25 ± 1 °C e con umidità relativa del 60-70%.

PROVA PER INGESTIONE SU API ADULTE. È stato fornito un alimentatore con 200 µL di soluzione zuccherina al 50% per il controllo negativo, addizionata con il prodotto di studio per le altre tesi, e a un prodotto ritenuto tossico verso le api (dimetoato) nel caso del controllo positivo. Le dosi sono state calcolate in modo da fornire 20 µL di prodotto a ogni ape. Dopo tre ore si è registrato il dato sul consumo di soluzione (completo o parziale) e l'alimentatore è stato sostituito con uno contenente soluzione zuccherina pura.

PROVA PER CONTATTO INDIRECTO SU API ADULTE. Diversamente da quanto previsto dai protocolli Eppo (PP 1/170) per i saggi di contatto dei pesticidi nei confronti delle api (contatto diretto), si è ritenuto opportuno svolgere la prova con la procedura del contatto indiretto, essendo tale modalità maggiormente vicina alla situazione di campo. Sono state utilizzate foglie di melo irrorate fino a gocciolamento con acqua deionizzata, pura per il testimone, addizionata con i prodotti da saggiare per le restanti tesi, lasciandole asciugare all'aperto per quattro ore. Introdotte le foglie nelle gabbiette, le api vi hanno camminato per tre ore, poi le foglie so-

no state tolte. Durante la prova le api erano alimentate con soluzione zuccherina al 50% in tutte le tesi. Il controllo della mortalità è stato effettuato dopo 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 ore. Ogni prodotto è stato classificato secondo la percentuale di mortalità corretta con la formula di Schneider-Orelli, rilevata 12 ore dopo l'inizio della prova: «non tossico» (< 1%), «leggermente tossico» (1-25%), «moderatamente tossico» (26-50%), «notevolmente tossico» (51-75%), «altamente tossico» (76-100%).

Agli stessi intervalli, per acetamiprid e rotenone + piretrine sono state condotte osservazioni visive, registrando aspetti comportamentali come: cammino normale, movimenti incontrollati, cammino scoordinato, tremori e agitazione, rotazioni, immobilità.

EFFETTI SUBLETALI DI ACETAMIPRID SU APPRENDIMENTO E MEMORIA DEGLI ODORI (PER TEST). Nel caso di acetamiprid, in quanto neonicotinoide come imidacloprid, è stato verificato anche l'impatto di dosi subletali sulla capacità di apprendimento e memoria degli odori, secondo il seguente schema (semplificato):

- cattura di api bottinatrici in uscita da un alveare, isolamento in provetta e induzione alla fame per 3-4 ore;
 - somministrazione della dose subletale (1/50 della dose di campo) 30 minuti prima dell'esperimento;
 - addestramento a estendere la lingua in presenza dell'odore (ricompensato con offerta di soluzione zuccherina) e a non estenderla in presenza di una soluzione salina;
 - test sul riflesso di estensione della lingua (PER) a 30, 60, 180 minuti e 24 ore: 10 presentazioni dell'odore (senza fornire la ricompensa) e 10 presentazioni della soluzione salina, regolarmente alternate.
- È stata calcolata la percentuale di risposte pienamente corrette, cioè l'estensione della lingua solo in presenza dell'odore. Sono state testate in questo modo 10 api. Il controllo è stato effettuato sottoponendo un altro gruppo di 10 api non trattate allo stesso protocollo sperimentale. ●

TABELLA A - Agrofarmaci utilizzati nelle prove sulle cavallette

Prodotto commerciale	Sostanza attiva (%)	Dose impiegata
Rotenone	Rotenone 6	400 mL/hL + 40 g/hL di acido citrico
Rotenone + piretrine	Rotenone 2 + piretrine 0,50 + piperonil-butossido 2	600 mL/hL + 40 g/hL di acido citrico
Acetamiprid	Acetamiprid 20%	200 g/hL
Imidacloprid 200 SL	Imidacloprid 17,8	50 mL/hL
Testimone	Acqua	

TABELLA B - Agrofarmaci utilizzati nelle prove sulle api

Prodotto commerciale	Sostanza attiva (%)	Dose impiegata
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i> 10 (100 g/L)	330 mL/hL
Spinosad	Spinosad 44,2 (480 g/L)	30 mL/hL
Rotenone + piretrine	Rotenone 2 (20 g/L) Estratto di piretro al 25 0,5 (5 g/L)	700 mL/hL
Acetamiprid	Acetamiprid 20	375 g/hL
Dimetoato - Controllo positivo	Dimetoato 38 (406 g/L)	140 mL/hL
Testimone	Acqua	

(*) *Metarhizium anisopliae* e spinosad erano stati sperimentati in precedenza sulle cavallette (Ferrari et al., 2006).

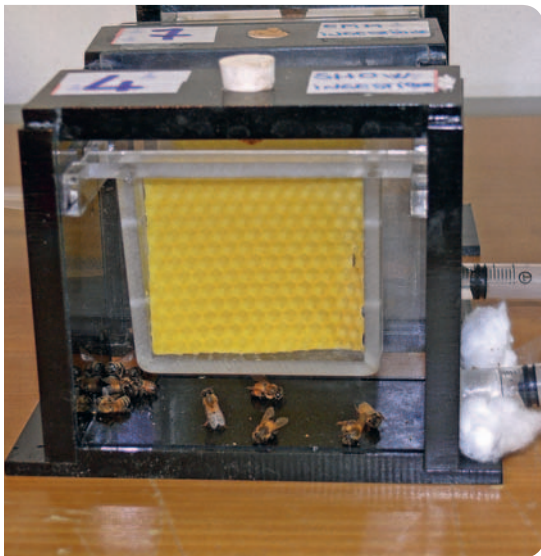
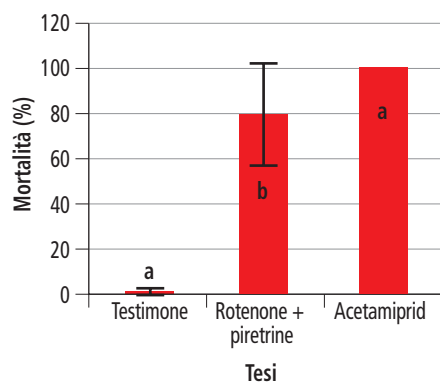


Foto 2 - Gabbietta utilizzata per le prove di tossicità verso le api

Le api trattate con acetamiprid per ingestione sono apparse subito molto agitate, presentando tremori e movimenti ritmici e frenetici dell'addome. Il 90% delle api presentava questo comportamento al controllo dopo tre ore; tale percentuale è scesa all'11% dopo sei ore ed è scomparsa ai controlli successivi. Il 3-7% delle api trattate con Acetaniprid per contatto ha manifestato molto frequentemente movimenti scoordinati o involontari per tutta la durata della prova.

Riguardo alle altre sostanze attive osservate, le api trattate con rotenone + piretrine hanno mostrato soprattutto movimenti involontari o scoordinati a tutti i controlli effettuati, sia quando sono state



Lettere diverse indicano una differenza significativa per $p < 0,05$ (Test SNK).

GRAFICO 2 - Mortalità a 72 ore di *Calliptamus italicus* nelle tesi a confronto (2^a prova)

Si conferma l'efficacia insetticida delle due sostanze attive anche in condizioni più simili a quelle di campo.

TOSSICITÀ SUBLETALE DI AGROFARMACI VERSO LE API

Il PER test

Le prove di tossicità comunemente effettuate, sia da enti indipendenti sia dalle società produttrici al fine di ottenere la registrazione dei prodotti commerciali, sono basate essenzialmente su test di tossicità acuta nei quali il parametro rilevato è la mortalità degli individui esposti all'intossicazione.

Tuttavia, per alcune sostanze attive, in particolare imidacloprid (Decourtye *et al.*, 2004), è stata dimostrata l'interferenza con i meccanismi di formazione e recupero della memoria nelle api, che si manifesta in maniera diversa a seconda del momento dell'assunzione e che sparisce dopo un certo lasso di tempo, durante il quale, però, l'ape non è in grado di approntare comportamenti normali e adeguati.

Oggi sono allo studio nuove modalità per saggiare gli effetti di intossicazioni subletali sul comportamento delle api, verificando l'impatto dei pesticidi su alcuni processi cognitivi come l'apprendimento e la memorizzazione di diversi tipi di stimoli ambientali (Desneux *et al.*, 2007).

Quando un'ape si posa su un fiore, gli odori diffusi in concomitanza con il prelievo del nettare o polline vengono memorizzati e associati alla ricompensa, e giocano un ruolo fondamentale nel riconoscimento dei fiori durante i successivi voli, determinando, per esempio, l'estensione automatica della ligula in presenza del profumo. Riproducendo questa sequenza in laboratorio, con api opportunamente immobilizzate, è possibile studiare le alterazioni delle capacità di apprendimento associativo attraverso l'osservazione delle alterazioni nel riflesso di estensione della ligula (o proboscide), da cui in inglese PER (Proboscis Extension Reflex).

trattate per ingestione (32% e 11%, rispettivamente) sia per contatto (3,4% e 14% rispettivamente); in questo caso i sintomi sono comparsi solo dopo sei ore, più tardi rispetto alla prova per ingestione.

cui molte delle api sono state in grado di rispondere in maniera corretta alla presentazione dell'odore.

Conclusioni

In questi due anni è stata dimostrata l'efficacia di prodotti insetticidi a base di spinosad per il controllo delle cavallette in orti e giardini (Ferrari *et al.*, 2006), mentre la miscela di piretro e rotenone (Rotenone + piretrine) e l'acetamiprid (Acetaniprid) potrebbero, in prospettiva, trovare impiego nei confronti delle forme giovanili di cavallette su erba medica, in agricoltura biologica e integrata. Prodotti a base di *Metarhizium anisopliae*, invece, efficaci in laboratorio contro le cavallet-

Effetti di dosi subletali di acetamiprid sulle api

I risultati della sperimentazione sono riassunti nel grafico 5. Le api trattate con dosi subletali di acetamiprid hanno mostrato una notevole riduzione della capacità di riconoscere l'odore utilizzato durante l'addestramento già dopo 30 minuti e fino almeno a tre ore dopo. La difficoltà diminuisce notevolmente al test effettuato dopo 24 ore, in



Trattamenti insetticidi contro *Calliptamus italicus* possono perturbare il comportamento delle api

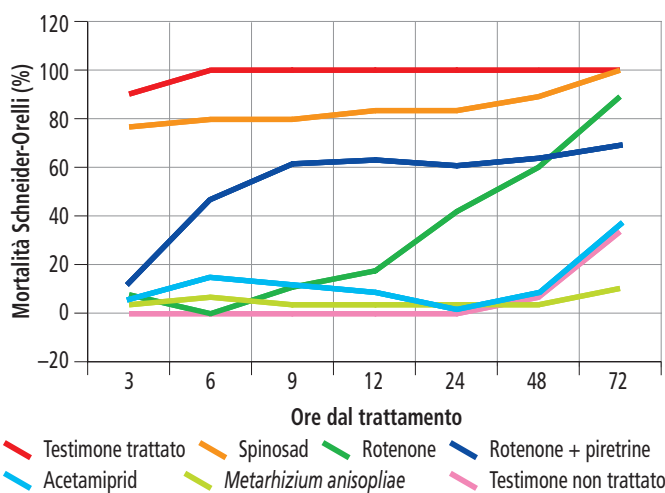


GRAFICO 3 - Mortalità delle api indotta dai diversi agrofarmaci per ingestione

Al rilievo della 12^a ora, spinosad è risultato altamente tossico, mentre la miscela rotenone + piretrine, notevolmente tossica, si è dimostrato più pericolosa del solo rotenone, leggermente tossico come acetamidrid e *Metarhizium anisopliae*.

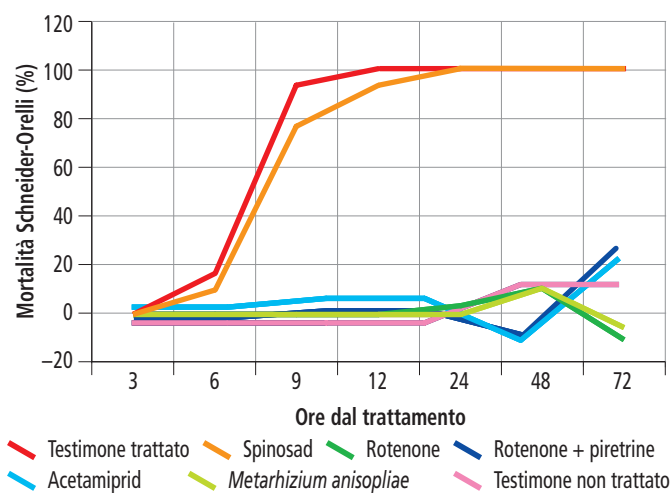


GRAFICO 4 - Mortalità delle api indotta dai diversi agrofarmaci per contatto indiretto

Al rilievo della 12^a ora, spinosad è risultato altamente tossico, anche per contatto indiretto; acetamidrid è stato classificato come leggermente tossico, *Metarhizium anisopliae*, rotenone e rotenone + piretrine sono risultati non tossici.

te e innocui per le api, difficilmente verranno registrati in Italia.

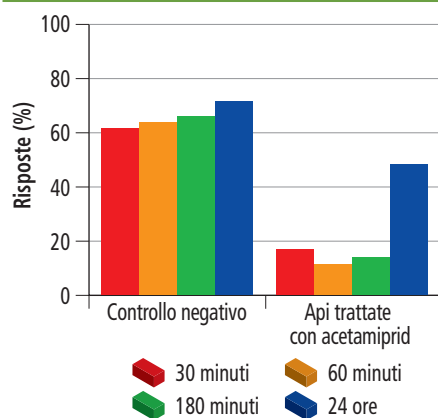
Per quanto riguarda l'impatto di questi agrofarmaci sulle api, tema particolarmente attuale e delicato visti i gravi problemi che questi pronubi vanno manifestando, i dati rilevati utilizzando i test classici per la determinazione della tossicità acuta sono in accordo con quanto trovato da altri ricercatori.

Prodotti a base di spinosad, pur di origine naturale, risultano molto tossici sia per ingestione sia per contatto indiretto e andrebbero quindi impiegati esclusivamente come esche alimentari. Rotenone + piretrine è notevolmente tossico per ingestione e leggermente tossico per contatto indiretto (in questo caso la mortalità raggiunge valori superiori al 40% solo dopo 72 ore). Acetamidrid mostra una bassa tossicità sia per contatto che per ingestione, tanto da poter essere classificato come leggermente tossico in entrambi i casi.

Alla luce di questi risultati, acetamidrid sembrerebbe di minor impatto sulle api rispetto a rotenone + piretrine, quindi preferibile per la lotta alle cavallette su erba medica. Tuttavia, l'osservazione diretta del comportamento delle api nelle gabbiette ha messo in luce comportamenti invalidanti: movimenti involontari e, soprattutto, tremori e agitazione. Tali comportamenti, pur essendo transitori (scompaiono tra la 6^a e la 9^a ora), in campo potrebbero compromettere irreversibilmente la sopravvivenza. Se le api intossicate fossero in grado di tornare alla colonia, dati in

letteratura riportano interferenza con la danza, linguaggio con il quale, attraverso movimenti codificati del corpo, le api sono in grado di comunicare alle compagne dove si trova la fonte di cibo.

Al PER test, inoltre, le api hanno mostrato una notevole riduzione della capacità di riconoscere gli odori ai controlli effettuati a 30, 60 e 180 minuti, non estendendo la ligula in presenza dell'odore, o estendendola anche in presenza di



Le colonne esprimono la percentuale di risposte corrette, cioè l'estensione della ligula in presenza dell'odore.

GRAFICO 5 - Risposte al PER test in api sane

Le api trattate con dosi subletali di acetamidrid hanno mostrato una notevole riduzione della capacità di riconoscere l'odore utilizzato durante l'addestramento già dopo 30 minuti e fino almeno a tre ore dopo. La difficoltà diminuisce notevolmente al test effettuato dopo 24 ore.

una soluzione salina, facendo ritenere che acetamidrid agisca a dosi subletali con perturbazioni delle capacità cognitive tali da comprometterne temporaneamente il comportamento.

Si tratta di dati preliminari che richiedono ulteriori approfondimenti, ma che evidenziano l'importanza di eseguire anche saggi comportamentali, estendendoli ad altre sostanze attive (sia naturali che di altre famiglie chimiche di sintesi). Affiancati ai test classici di tossicità, questi saggi possono fornire ulteriori e determinanti elementi di cui tenere conto al momento della scelta dell'insetticida da impiegare in colture esposte alla visita delle api.

Bettina Maccagnani

Dipartimento di scienze
e tecnologie agroambientali

Università di Bologna

bettina.maccagnani2@unibo.it

Roberto Ferrari, Luca Zucchi

Centro agricoltura e ambiente
Crevalcore (Bologna)

Massimo Bariselli

Servizio fitosanitario
Regione Emilia-Romagna

Si ringraziano Claudio Porrini (Dista - Università di Bologna) e il Cra - Istituto nazionale di apicoltura per la consulenza.

Ricerca finanziata da: Fondazione Cassa di Risparmio in Bologna, Assessorato agricoltura Provincia di Bologna, Servizio fitosanitario Regione Emilia-Romagna.



Per consultare la bibliografia:
www.informatoreagrario.it/rdLia/08ia25_3413_web