

PIETRO RUMINE - JACOPO DE SILVA

Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, via Lanciola 12/A, Cascine del Riccio, 50125 Firenze

Verifica in laboratorio della patogenicità di ceppi di *Bacillus thuringiensis* Berliner nei confronti di *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera Arctiidae)*

ABSTRACT

LABORATORY SCREENING OF THE INSECTICIDAL ACTIVITY OF STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER AGAINST *HYPHANTRIA CUNEA* DRURY (LEPIDOPTERA ARCTIIDAE)

In order to investigate the pathogenicity of some strains of *Bacillus thuringiensis* against larvae of *Hyphantria cunea*, laboratory trials were carried out over three years (1999-2001). The strains belong to an entomopathogenic microorganism collection in our Institute (ISZA) and were isolated from different insect species or from soil samples. The effectiveness of our tested strains was compared both with the control and with a commercial formulate of *B. thuringiensis kurstaki* str. SA 11 (Delfin).

The mortality values of larvae of *H. cunea* treated with some strains of *B. thuringiensis* were significantly higher than those recorded in the control but lower compared with the mortality observed in the commercial formulate tests. Therefore, basing on the results of the trials we can expect prospects in the microbiological control of *Hyphantria cunea* by our strains of *B. thuringiensis*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, bacteria, *Hyphantria cunea*, microbial control.

INTRODUZIONE

Hyphantria cunea Drury è un noto lepidottero Arctiide, di origine Nord-americana (MELIS e ZOCCHI, 1958), diffuso in tutto il Nord e Centro America. Polifago, defogliatore di un numero assai ampio di latifoglie, la sua presenza in Europa, accertata fin dal 1940 in Ungheria, è andata progressivamente estendendosi. In Italia è stato segnalato ufficialmente una ventina di anni fa (CORRADINI *et al.*, 1983) ma si ritiene che sia stato introdotto accidentalmente già negli anni '70. Diffuso ormai ovunque dopo essere rimasto per qualche tempo confinato nelle regioni a nord dell'appennino tosco-emiliano, il fitofago è tuttora in grado di espandere la propria attività a nuove aree su colture di interesse agricolo, in comprensori vivaistici specializzati nella

* P. Rumine ha impostato e svolto la ricerca, J. De Silva ha curato l'elaborazione statistica dei dati.

produzione di latifoglie ornamentali, in appezzamenti forestali, in parchi e ambienti urbani. La sua diffusione sul territorio, la sua biologia, la sintomatologia degli attacchi, la dannosità, costituiscono materia di un'ampia gamma di indagini e ricerche condotte in Italia (ZANGHERI, 1986; VENTURELLI, 1992; MONTERMINI, 1994; PARRINI, 1995; BELFIORI e MAINI, 1996; NARDI, 1996). Strategie di difesa microbiologica dagli attacchi di *Hyphantria cunea* con l'impiego di ceppi di *B. thuringiensis* sono state studiate ed applicate in Italia e in numerosi Paesi del mondo (DESEÖ *et al.*, 1986; WILLIAMS *et al.*, 1987; SIKURA *et al.*, 1988; MONTERMINI, 1990; TANG *et al.*, 1991; ROVESTI, 1992; ZHIMERKIN, 1992; NANNI *et al.*, 1994 DESEÖ KOVÁCS; JUNG YONGCHUL *et al.*, 1998; SZEÖKE, 2000).

Con l'intento di verificare capacità e limiti di ceppi di *B. thuringiensis* nel controllo di *Hyphantria cunea*, negli anni 1999 - 2001 sono state realizzate, presso le strutture dell'ISZA di Firenze, prove di laboratorio su larve delle due principali generazioni del fitofago.

MATERIALI E METODI

SCELTA DEI CEPPI BATTERICI

Sono stati presi in esame alcuni ceppi di *B. thuringiensis* conservati in collezione presso questo Istituto. I ceppi sono stati scelti a seguito di saggi preliminari svolti negli ultimi anni sul materiale microbiologico presente, al momento, in laboratorio. Gli isolati hanno varia provenienza e sono stati ottenuti nel corso di precedenti ricerche.

In tutti e tre gli anni sono state messe a confronto sette tesi: un testimone non trattato, un formulato commerciale a base di *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ceppo SA 11 (Delfin) e cinque ceppi di *B. thuringiensis* isolati da matrici diverse (da insetti e da terreno) seguendo i metodi suggeriti da Poinar e Thomas (1982) e conservati in vitro su substrato agarizzato (Nutrient Agar - Difco) (tab. 1).

PREPARAZIONE DELLE SOSPENSIONI BATTERICHE

Il materiale batterico necessario alla preparazione delle sospensioni da impiegare nei trattamenti è stato prelevato dalle colture dei diversi ceppi di *B. thuringiensis* conservati in vitro su N.A. (Nutrient Agar). Gli isolati batterici sono stati fatti sviluppare in coltura liquida (100 ml) di N.B. (Nutrient Broth - Difco) in beute da 300 ml tenute in agitatore termostato a 100 rpm ad una temperatura di 28°C ± 1°C per 7 gg. Quindi le sospensioni sono state centrifugate due volte per 5 minuti a 6.000 rpm e le biomasse batteriche,

Tab. 1 - Prove 1999-2001: prospetto riassuntivo delle tesi a confronto.

Tesi	P. A.	Formulazione
Test. non trattato	-	-
Formulato commerc. Delfin	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> SA 11 (6,4%)	Granuli idrodispersibili 53.000 US/mg
BT-ISZA/TA1	<i>B. thuringiensis</i> isolato da <i>Zygaena</i> sp.	Isol. su substrato agarizzato (NA)
BT-ISZA/TA4	<i>B. thuringiensis</i> isolato da terreno forestale	Isol. su substrato agarizzato (NA)
BT-ISZA/LB5	<i>B. thuringiensis</i> isolato da terreno forestale	Isol. su substrato agarizzato (NA)
BT-ISZA/LB6	<i>B. thuringiensis</i> isolato da terreno forestale	Isol. su substrato agarizzato (NA)
BT-ISZA/LB7	<i>B. thuringiensis</i> isolato da <i>T. pityocampa</i>	Isol. su substrato agarizzato (NA)

dopo lavaggi ripetuti con acqua sterile, sono state nuovamente sospese in acqua (PELAGATTI e ROVERSI, 1991). La valutazione delle concentrazioni è stata fatta sia mediante conteggio delle cellule con cella conta-globuli Thoma che mediante conteggio degli organismi vitali sviluppatasi in piastre Petri su N.A. a seguito di inoculazione delle sospensioni batteriche a diversa diluizione. Le concentrazioni delle sospensioni batteriche sono state portate su valori di 100-200 x 10⁶ cell./ml.

Per quanto riguarda il prodotto commerciale di confronto, si è proceduto alla preparazione della sospensione acquosa partendo dalla formulazione granulare secondo le dosi fornite in etichetta (100 g/hl) e seguendo poi lo stesso procedimento adottato per i ceppi conservati su substrato agarizzato.

SAGGI SU LARVE DI *H. CUNEA*

Per l'allevamento in laboratorio delle larve di *Hyphantria cunea* sono stati utilizzati contenitori in plexiglas areati. Nel 1999 e nel 2000 le prove sono state condotte su larve della prima e della seconda generazione mentre nel 2001, vista la scarsità del materiale di prima generazione, ci si è limitati a sperimentare su larve della seconda generazione. In tutti i casi sono state utilizzate larve giovani, di prima e seconda età, evitando il ricorso a esemplari prossimi alla maturità, notoriamente più resistenti ai trattamenti. Tutte le larve di *H. cunea*, sia di prima che di seconda generazione, sono state raccolte da

piante infestate del comprensorio vivaistico pistoiese (PT). Per ogni tesi si sono impiegate, per la prima generazione, 10 larve per 4 ripetizioni e, per la seconda generazione, 5 larve per 4 ripetizioni. Alle larve sono state somministrate quotidianamente foglie fresche di gelso a scopo alimentare.

I trattamenti sono stati fatti per irrorazione delle sospensioni batteriche su ambedue le pagine fogliari mediante un microspruzzatore manuale. Il trattamento è stato ripetuto per due giorni consecutivi su foglie nuove. Nelle tesi testimoni, le foglie sono state irrorate con sola acqua. Nelle prove del 1999 i trattamenti relativi alla prima generazione sono stati effettuati il 30 giugno e 1 luglio mentre quelli relativi alla seconda generazione il 31 agosto e 1 settembre. Nel 2000 i trattamenti su larve della prima e della seconda generazione sono stati fatti, rispettivamente, il 6 e 7 luglio e il 31 agosto e 1 settembre. Nel 2001 i trattamenti sulla seconda generazione larvale sono stati fatti il 4 e 5 settembre.

Le prove sono state realizzate in ambiente controllato a temperatura di $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e ad un fotoperiodo naturale relativo al momento di svolgimento delle prove stesse.

ANALISI STATISTICA

I rilievi sull'andamento delle prove sono stati fatti mediante conteggio giornaliero delle larve vive e morte a partire dalla data del trattamento fino a stabilizzazione della situazione (1999: situazione al 9/07 e al 10/09; 2000: al 14/07 e al 15/09; 2001: al 14/09). Le percentuali di mortalità a quelle date sono state analizzate tramite analisi della varianza (Anova), previa trasformazione angolare per n non costante (JOHNSON e KOTZ, 1969 in: SOKAL e ROHLF, 1981), e successivo test HSD di Tukey per il raggruppamento in sottoinsiemi omogenei.

RISULTATI

Nel corso delle cinque prove condotte negli anni 1999-2001, nelle parcelle delle tesi sottoposte a trattamento l'efficacia dei prodotti si è resa precocemente evidente con l'interruzione dell'alimentazione da parte delle larve. Nel caso delle parcelle testimoni, come pure in quelle relative a prodotti risultati poco attivi, le larve hanno invece evidenziato una spiccata attività trofica a carico delle foglie. La mortalità, sia nella prima che nella seconda generazione, si è manifestata, in tutti i casi a partire dal secondo/terzo giorno dopo il trattamento. La situazione poteva considerarsi stabilizzata a distanza di una decina di giorni.

Nell'analisi statistica la correlazione fra concentrazione dei prodotti e mortalità delle larve è risultata del tutto trascurabile (R quadrato = 0,14) per cui si è preferito non includerla tra le sorgenti di variabilità. I dati sono stati dunque analizzati tramite analisi della varianza sulle percentuali (trasformate) di mortalità delle larve. Sono state prese in considerazione le sorgenti di variabilità: "anno" delle prove, "generazione" larvale, "prodotto" e le relative interazioni. Non si sono verificate differenze significative fra le due generazioni relativamente alle mortalità larvali mentre sono risultate altamente significative le variabili anno e prodotto. In tutti i casi, la mortalità larvale nelle tesi trattate con *B. thuringiensis* è risultata significativamente superiore a quella delle tesi testimoni. Il formulato commerciale Delfin è risultato significativamente più efficace di tutti gli altri prodotti. Fra i ceppi di *B. thuringiensis* facenti parte della collezione dell'ISZA, LB5 e LB7 sono stati i più attivi, in particolare nelle prove del 1999 verso larve di prima generazione. Tale attività è stata nuovamente manifestata dall'isolato LB7 nelle prove del 2000 contro larve di prima generazione mentre l'isolato LB5 ha evidenziato una patogenicità interessante nelle prove 1999 e 2000 contro larve di seconda generazione. Anche gli isolati TA1 e TA4, sebbene in misura variabile negli anni, hanno mostrato una certa attività entomopatogena (seconda generazione del 1999, 2000 e 2001).

Il test HSD di Tukey per il raggruppamento in sottoinsiemi omogenei ribadisce quanto evidenziato dall'analisi della varianza.

La figura I sintetizza graficamente i risultati delle prove.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le sperimentazioni triennali condotte in laboratorio sull'attività entomopatogena di ceppi di *Bacillus thuringiensis*, facenti parte di una collezione di microrganismi esistente presso questo Istituto, hanno permesso di verificare, relativamente ad alcuni di loro (TA1, TA4, LB5, LB7), una certa attività nei confronti del Lepidottero *Hyphantria cunea*. Particolarmente evidente è risultata l'efficacia del formulato commerciale Delfin a base di *B. thuringiensis* var *kurstaki* ceppo SA 11 che è stato in grado di causare livelli di mortalità in vitro del fitofago vicini al 100%.

Come è noto, nelle applicazioni di campo molti sono i fattori che possono influenzare l'attività degli insetticidi microbiologici. Fra essi, i parametri ambientali, temperatura, umidità e radiazione solare, risultano determinanti. Nel caso specifico delle sperimentazioni di laboratorio, come la nostra, i cui parametri ambientali risultano praticamente ininfluenti in quanto controllati

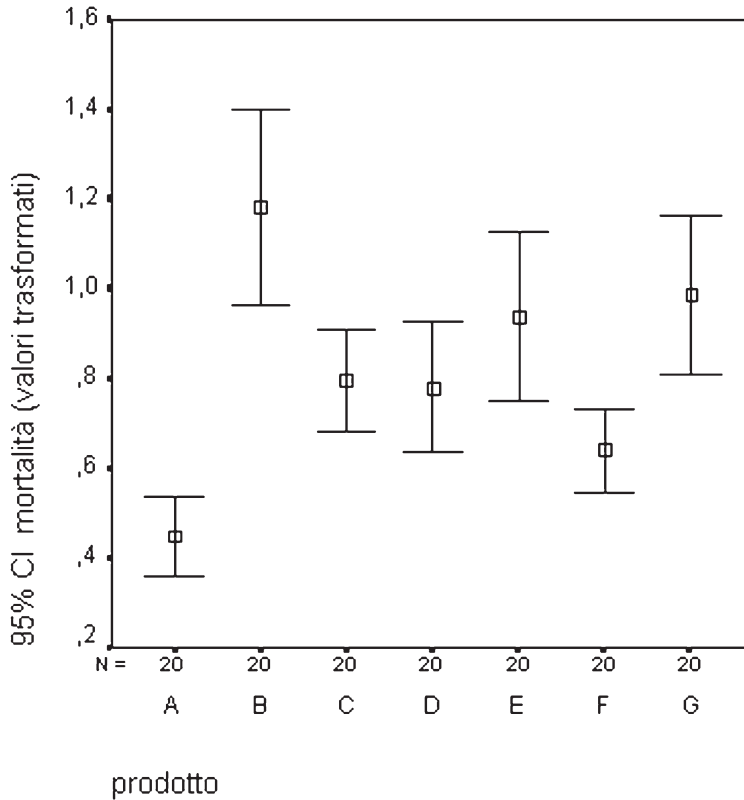


Fig. I - Prove 1999-2001: mortalità larvale. A = testimone non trattato; B = formulato commerciale; C = *B. thuringiensis* ceppo TA1; D = *B. t.* ceppo TA4; E = *B. t.* ceppo LB5; F = *B. t.* ceppo LB6; G = *B. t.* ceppo LB7.

secondo l'impostazione del programma, va invece tenuto in particolare considerazione, nei raffronti di efficacia, il divario esistente tra formulati commerciali, le cui caratteristiche risultano oramai collaudate e standardizzate, ed isolati batterici (come quelli da noi impiegati) dei quali molto resta ancora da testare. In linea generale non vanno neppure trascurati quegli aspetti che sono legati alla stabilità della formulazione, alla suscettibilità genetica dell'ospite, al suo stadio di sviluppo larvale, al suo stadio fisiologico, ecc. Ciò detto, pur con i limiti e le cautele dovute alle condizioni di artificialità di svolgimento delle prove, resta comunque possibile intravedere, per alcuni dei ceppi di *B. thuringiensis* da noi collezionati, uno spazio nel controllo del fitofago. La validità dei dati è stata, d'altronde,

confermata dalla trascurabile mortalità larvale nella tesi testimone. I riferimenti bibliografici indicati nella parte introduttiva di questo lavoro, del resto, inducono a considerazioni ottimistiche sull'impiego di formulati a base di *B. thuringiensis* nella lotta microbiologica contro fitofagi dannosi e spingono alla ricerca e caratterizzazione di nuovi ceppi potenzialmente utili.

RINGRAZIAMENTI

Si desidera ringraziare il collega Dr. Carlo Parrini per la preziosa collaborazione prestata nel fornire indicazioni sullo sviluppo e diffusione del Lepidottero *Hyphantria cunea* nonché nel reperimento del materiale entomologico necessario allo svolgimento della presente ricerca.

RIASSUNTO

Nel corso del 1999-2001 sono state condotte prove di laboratorio con lo scopo di saggiare l'attività entomopatogena di ceppi di *Bacillus thuringiensis* nei confronti di larve di *Hyphantria cunea*. I ceppi, isolati da insetti e terreno e facenti parte di una collezione di microrganismi entomopatogeni di questo Istituto, sono stati messi a confronto con un testimone non trattato e con un formulato commerciale a base di *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ceppo SA 11 (Delfin).

I dati ottenuti hanno evidenziato che i livelli di mortalità larvale riscontrati in alcune tesi con trattamento sono risultati significativamente più alti rispetto a quelli della tesi testimone anche se inferiori alla tesi con il formulato commerciale di riferimento. I ceppi di *B. thuringiensis* saggiati, pur con i limiti riscontrati, lasciano pertanto intravedere prospettive d'impiego nella lotta al fitofago.

Parole chiave: *Bacillus thuringiensis*, batteri, *Hyphantria cunea*, controllo microbiologico.

BIBLIOGRAFIA

- BELFIORI D., MAINI S., 1996 - *Hyphantria cunea*: ciclo biologico nelle Marche. Atti *Giornate Fitopatologiche*, I: 207-214.
- CORRADINI L., OLIVA G., MONTERMINI A., 1983 - Più approfondite conoscenze sui bruchi defogliatori della zona di Cadé, Cella, Pratofontana. *Not. Fitop. Cons. Fitosan.* Reggio Emilia, 8, 2.
- DESEÖ KOVÁCS K.V., ROVESTI L., 1992 - Lotta microbiologica contro i fitofagi. Teoria e pratica. *Edagricole*, Bologna, 296 pp.
- DESEÖ K.V., ROVESTI L., MONTERMINI A., CORTELLINI W., 1986 - Prime esperienze di lotta microbiologica su *Ifantria* americana. *Inf. Fit.*, 2: 17-22.
- JUNG YONGCHUL, KIM SUNGUK, COTE' J.C., LECADET M.M., CHUNG YOUNGSUP, BOK SONGHAE, 1998 - Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. higo strain isolated from rice bran in Korea. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 95-96.
- MELIS A., ZOCCHI R., 1958 - Contributo alla conoscenza morfologica ed etologica dell'*Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera, Arctiidae). *Redia*, 18: 451-518.
- MONTERMINI A., 1990 - Strategie possibili sul contenimento dell'*Ifantria*. *L'Informatore Agrario*, 46: 61-64.
- MONTERMINI A., 1994 - L'*Ifantria* in Italia. *Edagricole* Bologna, pp. 227.
- NANNI C., PICCARI RICCI P.P., BOSELLI M., MONTERMINI A., 1994 - *Hyphantria cunea*: prove

- di lotta microbiologica. *Atti Giornate Fitopatologiche*, II: 161-166.
- NARDI S., 1996 - Rete di avvistamento della presenza di *Ifantria americana* nelle Marche nel biennio 1993-1994. *Atti Giornate Fitopatologiche*, I: 497-504.
- PARRINI C., 1995 - Sviluppi dell'*Ifantria americana* (*Hyphantria cunea* Drury) nel vivaismo ornamentale pistoiese. *Floricoltura*, 5: 5-12.
- PELAGATTI O., ROVERSI P.F., 1991 - Note preliminari su un ceppo di *Bacillus thuringiensis* Berliner isolato da larve di *Elkeneria pudibunda* (L.) (Lepidoptera Lymantriidae). *MAF -Convegno Lotta Biologica*, Acireale, Ed. Ist. Sper. Pat. Veg., Roma: 69-75.
- POINAR G.O.JR, THOMAS G.M., 1982 - Diagnostic Manual for the Identification of Insect Pathogens. Plenum Press - New York and London, 218 pp.
- SIKURA A.I., KHIMERIKIN V.N., CHIRKOV M.V., SIMCHUK P.A., 1988 - Bacterial preparation against the Fall webworm. *Zashchita Rastenii*, 12: 38-39.
- SOKAL R.R., ROHLF F.J., 1981 - Biometry, The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. Second edition. W. H. Freeman and Company, New York, XIII + 859 pp.
- SZEOKE K., 2000 - Control of the second generation of the American fall webworm is necessary. *Novényvédelem*, (Hungary) 36: 430-431.
- TANG Q.Z., PAN H.S., ZHAO H.L., QI K., YE W.Q., 1991 - Study on control of *Hyphantria cunea* using *Bacillus thuringiensis* strain 869. *Forest Pests and Diseases*, 1: 16-19.
- VENTURELLI C., 1992 - L'*Ifantria* è arrivata nell'Italia centrale. *Terra e Vita*, 40: 57-58.
- WILLIAMS M.L., SHEFFER B.J., MILLER G.L., HENDRICKS H.J., 1987 - Control of fall webworm. *Research Report Series*, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 5: 17-24.
- ZANGHERI S., 1986 - Note sulla distribuzione geografica, la biologia, l'etologia dell'*Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera, Arctiidae). *Atti: "L'Ifantria americana nella realtà padana"*, Cons. Fitosan. Obblig. Reggio Emilia, 1-8.
- ZHIMERIKIN V.N., 1992 - The fall webworm. *Zashchita Rastenii*, 2: 29-32.