

STEFANO MAINI, ANDREA CAPPAL, GIOVANNI BURGIO
Istituto di Entomologia «Guido Grandi» dell'Università degli Studi di Bologna

Esperienze di laboratorio con diverse sottospecie di *Bacillus thuringiensis* Berl. nei confronti di *Ostrinia nubilalis* (Hb.).

(Ricerche eseguite col contributo M.P.I. 40%)

PREMESSA

Da tempo è noto come il *Bacillus thuringiensis* Berl. (*B.t.*) svolga un'attività insetticida su larve di *Ostrinia nubilalis* (Hb.) (Lepidoptera, Pyralidae); questa attività biologica è stata studiata in modo approfondito principalmente su *B.t.* sottospecie (ssp.) *kurstaki* e *thuringiensis*.

Con la presente ricerca, si è inteso studiare l'attività insetticida svolta da *B.t.* ssp. *sotto*, *kenyae* e *galleriae*, confrontati con lo standard internazionale *B.t.* E61.

MATERIALI E METODI

Allevamento di *Ostrinia nubilalis*

L'allevamento di *O. nubilalis* nell'Istituto di Entomologia dell'Università di Bologna fu avviato nel 1977, in occasione di studi su feromoni sessuali (Maini *et al.* 1978).

In un primo locale, climatizzato a temperatura costante di $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e U.R. 60-70%, a luce continuata, vengono poste le ovature prossime alla schiusura assieme alla dieta agarizzata per la nutrizione e lo sviluppo delle larve, dentro scatole cilindriche in resina termoplastica (diam. 18x18 cm di altezza) con coperchio a tenuta e provvisto di un foro di aerazione chiuso da una maglia metallica finissima.

Dopo circa 20-25 giorni si ha l'incrisalidamento e sfarfallamento dei primi adulti.

Questi vengono raccolti con aspiratore e trasferiti in gabbie di legno e rete metallica in una seconda cella con un termoperiodo di 16 ore a 27°C e 8 ore a 20°C , U.R. 75-85% e un corrispondente fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Sulle gabbie viene nebulizzata acqua 2 volte al giorno e le femmine depongono le uova su fogli di carta cerata, che vengono sostituiti ogni giorno e quindi posti in frigorifero a temperatura di circa 6°C.

Preparazione del *Bacillus thuringiensis*

Una collezione di 22 ssp. di *B.t.* è conservata presso l'Istituto di Microbiologia della Facoltà di Agraria (Università di Bologna), recentemente inviata dall'Istituto di Genetica dell'Università di Pavia.

La collezione originale, giunta in Italia nel 1984, proviene dal *Bacillus Genetics Stock Center* (BGSC), dell'Ohio State University of Columbus (USA).

I *B.t.* utilizzati sono stati prescelti sulla base della sperimentazione condotta presso l'Istituto di Genetica dell'Università Cattolica di Milano - Piacenza.

Sono state individuate le ssp. *sotto*, *kenyae*, *galleriae*, che determinarono, secondo quanto comunicato da C. Fogher (dati non pubblicati) su *Ephestia kuehniella* Zell., una mortalità rispettivamente dell'86%, del 93% e del 90%; si è così voluta verificare l'efficacia di questi *B.t.* anche sulle larve di *O. nubilalis*.

Le caratteristiche dei *B.t.* utilizzati sono riportate in tabella 1.

Per quel che riguarda la scelta delle concentrazioni su cui porre maggiormente l'attenzione, sono state eseguite prove preliminari, utilizzando concentrazioni assai diverse dei preparati, in modo da stabilire quali fossero quelle minime, alle quali si determinava mortalità delle larve di *O. nubilalis*. Si è dunque ottenuto un intervallo, variante da 0,1 a 0,3 g/100 ml di sospensione, all'interno del quale sono state eseguite le repliche.

Successivamente sono state avviate le due prove che stanno alla base di questa ricerca.

Nella prima la sperimentazione è avvenuta su larve neonate, nella seconda su larve di 10 giorni (terza età).

Ogni prova ha compreso quattro repliche.

Per ogni replica sono state utilizzate cinque concentrazioni di preparati a base di *B.t.* (0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 g/100 ml) di centrifugato fresco per ciascuna ssp. (*sotto*, *kenyae*, *galleriae*, *standard* E61).

Per ogni concentrazione e per ogni ssp. di *B.t.* sono state utilizzate, in ogni replica, dieci larve.

Le larve di *O. nubilalis* sono state raccolte con un pennellino dalle scatole di allevamento e poste singolarmente in altri contenitori (diam. 3,5x4 cm di altez-

Tabella 1 - Caratteristiche delle ssp. di *Bacillus thuringiensis* Berl. utilizzate nella ricerca.

Sierotipo	Codice BGSC	ssp.	N. spore/g
4A/B	4E1	<i>sotto</i>	2,5x10 ⁹
4A/C	4F1	<i>kenyae</i>	7,0x10 ⁶
5A/B	4G2	<i>galleriae</i>	2,7x10 ⁸
	E61	<i>standard int.</i>	5,8x10 ⁷

za) cilindrici, con tappo preparato con fori tali da lasciar passare l'aria ma non le larve.

In ciascuno dei contenitori è stato poi introdotto un cilindretto di dieta, di dimensioni costanti e peso di 4,5-5 g, preventivamente immerso e sgocciolato in una delle sospensioni a diversa concentrazione di *B.t.*. In seguito all'immersione venivano trattenuti dai cilindretti di dieta in media 0,2 ml di sospensione. La dieta destinata al testimone è stata immersa in acqua.

I contenitori così preparati, suddivisi in base alle diverse tesi a confronto e alle diverse concentrazioni di *B.t.*, sono stati posti nel locale climatizzato per l'allevamento delle larve descritto in precedenza.

Le osservazioni per il calcolo della mortalità, sono state effettuate a 2 e 7 giorni dal trattamento.

Nella prova su larve di terza età è stato osservato l'eventuale accrescimento delle larve sopravvissute.

Al termine delle osservazioni, il materiale utilizzato per ogni replica è stato eliminato e i contenitori sostituiti.

Analisi statistica dei dati

È stata effettuata l'analisi della varianza, preliminare al test di Duncan, con il quale sono stati confrontati tra loro i risultati ottenuti nelle diverse tesi e, nell'ambito di ciascuna ssp., la mortalità determinata dalle diverse concentrazioni.

Una seconda elaborazione è stata effettuata con l'uso di un programma grafico al fine di ottenere rette di regressione lineare tra mortalità e concentrazione.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Durante le prove non si è riscontrata mortalità nel testimone.

Ciò ha costituito un notevole vantaggio nella valutazione dell'efficacia dei diversi *B.t.*, evitando di dover considerare una eventuale variabile dovuta alla mortalità non causata dal batterio.

L'analisi della varianza, relativa alle concentrazioni usate nell'ambito di ogni tesi, ha rilevato significative differenze tra quelle alte e le basse. La mortalità delle larve ha avuto, generalmente, una tendenza ad aumentare all'aumento della concentrazione, registrando, in entrambe le prove, dei minimi per le concentrazioni 0,10 g/100 ml e dei massimi per le concentrazioni 0,25-0,30 g/100 ml (tabb. 2 e 3).

Questo risultato è messo in evidenza nel grafico (fig. I) riportato quale esempio relativo a *B.t. ssp. galleriae*.

Anche in tutte le altre prove vi è correlazione lineare significativa tra incremento della mortalità in rapporto alla crescita di concentrazione utilizzata. Solamente per quanto riguarda le larve di prima età (osservazione dopo 7 giorni) e con *B.t. sotto* e *B.t. galleriae* non vi è stata correlazione, probabilmente perché le concentrazioni usate sono state troppo alte (tab. 2).

Tabella 2 - Percentuale di mortalità delle larve neonate di *Ostrinia nubilalis* (Hb.). Le lettere diverse, nell'ambito di ciascuna colonna, indicano differenze statisticamente significative (test di Duncan).

Esito dopo 48 ore					
ssp. di <i>B. thuringiensis</i>	concentrazione g/100 ml				
	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
<i>sotto</i>	12,5a	15,0a	30,0b	30,0a	40,0b
<i>kenyae</i>	12,5a	10,0a	37,5b	60,0b	57,5c
<i>galleriae</i>	17,5a	30,0a	60,5c	52,5b	62,5c
E61	7,5a	12,5a	12,5a	17,5a	15,0a

Esito dopo 7 giorni					
ssp. di <i>B. thuringiensis</i>	concentrazione g/100 ml				
	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
<i>sotto</i>	67,5b	62,5a	62,5a	65,0a	67,5a
<i>kenyae</i>	85,0c	87,5a	90,0b	95,0a	95,0a
<i>galleriae</i>	97,5c	90,0a	90,0b	92,5a	97,5a
E61	47,5a	50,0a	52,5a	60,0a	55,0a

L'analisi della varianza relativa al confronto tra i *B.t.* ha altresì evidenziato una significativa differenza tra le percentuali di mortalità, relativamente alla prova su larve neonate (tab. 2), e differenze non significative tra le percentuali di mortalità nella prova su larve di terza età (tab. 3).

Si osserva, generalmente, una maggiore efficacia dei preparati di *B.t. kenyae* e *B.t. galleriae*, con un maggiore divario rilevabile su larve neonate (osservazione dopo 48 ore) alle concentrazioni di 0,20, 0,25 e 0,30 g/100 ml.

Tabella 3 - Percentuale di mortalità delle larve di terza età di *Ostrinia nubilalis* (Hb.) Nell'elaborazione dei dati ottenuti in questa prova, la varianza non è risultata significativa; non è stato quindi possibile eseguire il test di Duncan.

Esito dopo 48 ore					
ssp. di <i>B. thuringiensis</i>	concentrazione g/100 ml				
	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
<i>sotto</i>					mortalità nulla
<i>kenyae</i>					mortalità nulla
<i>galleriae</i>					mortalità nulla
E61					mortalità nulla

Esito dopo 7 giorni					
ssp. di <i>B. thuringiensis</i>	concentrazione g/100 ml				
	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
<i>sotto</i>	0,0	2,5	12,5	20,0	17,5
<i>kenyae</i>	5,0	10,0	15,0	32,5	30,0
<i>galleriae</i>	5,0	12,5	32,5	32,5	37,5
E61					mortalità nulla

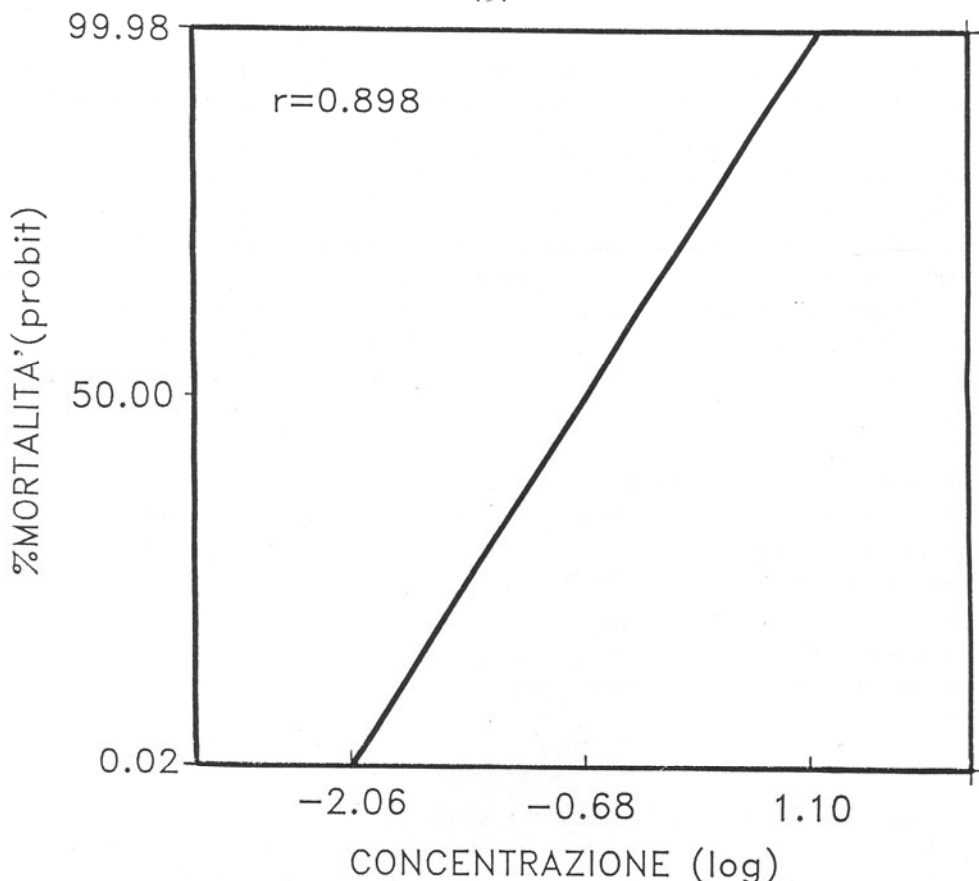


Fig. 1 - Retta di regressione lineare relativa all'attività di *B. thuringiensis* ssp. *galleriae* su larve di prima età dopo 48 h.

Nella prova su larve di prima età non è stato osservato alcun accrescimento delle larve sopravvissute dopo 7 giorni (osservazioni qualitative). Nella prova su larve di terza età, queste, hanno evidenziato un accrescimento tanto maggiore quanto minori erano le concentrazioni di *B.t.* utilizzate, più accentuato per le larve trattate con *B.t. sotto*, molto minore per le larve trattate con *B.t. kenya*e e *galleriae*. In particolare, le concentrazioni 0,25 e 0,30 g/100 ml di questi ultimi due *B.t.* non hanno fatto registrare alcun accrescimento delle larve sopravvissute, evidenziando così la sospensione dell'attività alimentare.

La diversa efficacia tra i *B.t.* sperimentati è ulteriormente rilevabile tenendo conto dei risultati del conteggio delle spore, riportati nella tab. 1.

Il numero di spore/g di *B.t. sotto* è di 1 ordine di grandezza superiore ai *B.t. galleriae* e di 3 rispetto a *B.t. kenya*e, che tuttavia hanno fatto registrare mortalità assai superiori.

Si può dunque ipotizzare che, a parità di numero di spore di *B.t.*, le differenze osservate sarebbero state ancora più evidenti.

Nel confronto con lo *standard* internazionale E61, gli altri *B.t.* sperimentati hanno evidenziato una maggiore efficacia insetticida (tabb. 2 e 3).

In conclusione, quindi, tenendo conto di tutti i fattori intervenuti nelle prove eseguite, si rileva che *B.t. kenyae* ha dimostrato una buona attività insetticida, seguita da *B.t. galleriae* e, con più scarsi risultati, da *B.t. sotto*. A conferma della buona efficacia di *B.t. kenyae* e *galleriae*, anche Mohd-Salleh e Lewis (1982) evidenziarono le positive caratteristiche insetticide a confronto con *B.t. kurstaki*. Navon e Melamed-Madjar (1986) riportano una minore attività di *B.t. ssp. aizawai* rispetto a *B.t. ssp. kurstaki*.

Effettivamente risultano pochi i lavori condotti su *O. nubilalis* con ssp. diverse di *B.t.* e, come risulta anche da prove di pieno campo, il maggiore interesse, riferendosi ai lavori più recenti, è sempre stato rivolto a *B.t. kurstaki* (Lynch *et al.*, 1977, 1980; Coppolino *et al.*, 1984).

Si è voluto quindi dare un contributo saggiando in laboratorio ssp. di *B.t.* che potrebbero essere impiegate in campo in alternativa alla lotta chimica contro *O. nubilalis*. La lotta microbiologica, anche alla luce di nuove acquisizioni riguardo alla formulazione che consentirebbero ai preparati maggiore efficacia e persistenza (Dunkle e Shasha, 1988), è compatibile con lanci di parassitoidi oofagi (Franz *et al.*, 1980; Maini *et al.*, 1986). Inoltre, non interferendo con altri organismi utili presenti nell'agroecosistema, è senza dubbio la strategia migliore per la difesa del mais o di altre colture danneggiate da questo Lepidottero polifago.

RIASSUNTO

Quattro sottospecie (ssp.) di *Bacillus thuringiensis* Berl. (*B.t.*): *B.t. sotto*, *B.t. kenyae*, *B.t. galleriae*, *B.t. E61 (standard)* sono state confrontate a diverse concentrazioni su larve di prima e terza età di *Ostrinia nubilalis* (Hb.). Le larve neonate sono risultate più suscettibili all'azione dei vari *B.t.* e, come per le larve di terza età, si è notata maggiore mortalità all'aumentare della concentrazione.

La ssp. più attiva nei riguardi di *O. nubilalis* è stata *B.t. kenyae* seguita da *B.t. galleriae* e *B.t. sotto*.

Laboratory Trials Employing *Bacillus thuringiensis* Berl. Subspecies Against *Ostrinia nubilalis* (Hb.)

SUMMARY

Four subspecies (subs.) of *Bacillus thuringiensis* (*B.t. sotto*, *B.t. kenyae*, *B.t. galleriae*, *B.t. standard E61*) at different concentrations were tested on first and third instar larvae of European corn borer. It was found that the newly hatched larvae were more susceptible to these *B.t.* subs. than the third instar larvae, and that the mortality of the first and third instar larvae increased as did the concentration of the *B.t.* subs.

The most effective was *B.t. kenyae*, followed by *B.t. galleriae* and *B.t. sotto*.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- COPPOLINO F., BURI G., FONTANA G., 1984 - An experiment on the biological control of *Ostrinia nubilalis* Hb. by *Bacillus thuringiensis* Berliner. - *Redia*, 47:235-246.
DUNKLE R.L., SHASHA B.S., 1988. - Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. - *Environ. Entomol.*, 17:120-126.

- FRANZ J.M., BOGENSCHUTZ H., HASSAN S.A., HUANG P., NATON E., SUTER H., VIGGIANI G., 1980. - Results of joint pesticide test programme by the Working Group: Pesticides and Beneficial Arthropods. - *Entomophaga*, 25:231-236.
- LYNCH R.E., LEWIS L.C., BERRY E.C., ROBINSON J.F., 1977. - European corn borer: granular formulations of *Bacillus thuringiensis* for control. - *J. Econ. Entomol.*, 70:389-391.
- LYNCH R.E., LEWIS L.C., BERRY E.C., 1980. - Application efficacy and field persistence of *Bacillus thuringiensis* when applied to corn for European corn borer control. - *J. Econ. Entomol.*, 73:4-7.
- MAINI S., PALLOTTI G., PLATIA G., 1978. - Ricerche sull'identificazione del feromone sessuale in popolazioni bolognesi di *Ostrinia nubilalis* Hb. (Lepidoptera, Pyralidae) e relative prove di campo. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 34:15-25.
- MAINI S., BURCHI C., BOTTEGHI P., 1986. - Effetti collaterali di un piretroide e del *Bacillus thuringiensis* Berliner in rapporto a *Trichogramma maidis* Pint. e Voeg.: osservazioni di laboratorio. - *Atti Giorn. Fitopat.*, 3:507-518.
- MOHD-SALLEH M.B., LEWIS L.C., 1982. - Toxic effects of spore/cristal ratios of *Bacillus thuringiensis* of European corn borer larvae. - *J. Inv. Pathol.*, 39:290-297.
- NAVON A., MELAMED-MADJAR V., 1986 - Screening of *Bacillus thuringiensis* preparations for microbial control of *Ostrinia nubilalis* in sweet corn. - *Phytoparasitica*, 14:111-117.