POPILLIA JAPONICA: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DUE STRATEGIE DI CONTROLLO BIOLOGICO IN CONDIZONI CONTROLLATE

M. BERTOGLIO[1], F. CERIANI[1], A. ABELLI[2], R. KRON MORELLI[2]
S. CASSANI[1], L. SUSS[3]
[1] Agroblu S.r.l. - Via San Bernardo, 35, 20017 Rho (MI)
[2] Agrifutur S.r.l. - Via Campagnole, 8, 25020 Alfianello (BS)
[3] già prof. Ord. Entomologia Agraria – Università degli Studi di Milano
info@agroblu.it

RIASSUNTO

L'efficacia di due strategie di controllo biologico è stata saggiata in condizioni controllate con un'infestazione artificiale di larve di *Popillia japonica*. Granmet gr (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5, 8.88 x10^7 CFU/g) è stato applicato alla dose di 50 kg/ha singolarmente e seguito da un'applicazione di Optinem H (*Heterorhabditis bacteriophora*) alla dose di 5x10^7 nem/100 m^2 comparato con una tesi non trattata con alcun prodotto. Venti e quaranta giorni dopo l'applicazione è stato effettuato il conteggio delle larve sopravvissute nelle unità sperimentali definendo l'efficacia come riduzione della popolazione larvale rispetto al testimone non trattato. L'applicazione combinata di Granmet gr e Optinem H è risultata la più efficace sia nel primo che nel secondo rilevamento. L'attività combinata dei due prodotti in condizioni ambientali ed edafiche ottimali per l'azione dei nematodi e del *Metarhizium anisopliae* (temperature moderate e buona umidità del suolo) si è rivelata un'ottima strategia nel controllo delle larve di *P. japonica.*

Parole chiave*:* *Metarhizium anisopliae, Heterorhabditis bacteriophora*, nematodi entomoparassiti, funghi entomopatogeni

SUMMARY

POPILLIA JAPONICA: EFFICACY EVALUATION OF TWO BIOLOGICAL CONTROL STRATEGIES IN CONTROLLED CONDITIONS

The efficacy of two biological control strategies was evaluated in controlled conditions with an artificial infestation of *Popillia japonica*. Granmet gr (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* BIPESCO 5, 8.88 x10^7 CFU/g) was applied at 50 kg/ha alone and followed by an application of Optinem H (*Heterorhabditis bacteriophora*) at 5x10^7 nem/100 m^2 compared to an infested untreated check. The count of the living larvae was carried out 20 and 40 days after the application. The efficacy was statistically calculated as reduction of the number of larvae in comparison to the untreated control check. The application of Granmet gr and Optinem H achieved the best efficacy level both in the first assessment (55% vs 12.1% achieved when Granmet gr was applied alone) and in the second assessment (98% vs 46.9%). The combined activity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5 and nematodes with optimal soil and environmental condition (high soil humidity and moderate air temperature) resulted in an excellent strategy for the control of the larvae of *Popillia japonica*.

Keywords: *Metarhizium anisopliae, Heterorhabditis bacteriophora*, entomoparasitic nematodes, entomopathogenic fungi

INTRODUZIONE

Popillia japonica Newman (Coleoptera: Rutelidae) è un insetto originario del Giappone. In Europa la sua presenza era nota nelle sole Isole Azzorre (Portogallo). Arrivato mediante traffico aereo dagli USA nei primi anni '70, nell'estate del 2014 fu segnalato il primo esemplare in Italia nel Parco del Ticino, fra Lombardia e Piemonte, (EPPO, 2014). *P. japonica* è inserita tra le specie da quarantena nella direttiva 2000/29/CE a causa degli ingenti danni che è in grado di provocare a più di 100 specie vegetali ospiti.

P. japonica alle nostre latitudini compie una generazione all'anno. Gli adulti compaiono agli inizi di giugno, vivono in media quattro-sei settimane, ovidepongono fino a 60 uova per stagione preferibilmente in prati permanenti con buone condizioni di umidità, fino a fine settembre. La larva si nutre delle radici e sverna come larva di terza età in una cella a 10-20 cm di profondità dalla quale in primavera, spostandosi verso gli strati più superficiali del terreno, riprende la sua attività trofica per poi sfarfallare dopo una-due settimane con un'impupamento della durata di uno-tre settimane.

E' specie estremamente polifaga: negli Stati Uniti è segnalata su circa 300 specie vegetali ed è considerata dannosa su oltre 100 piante, sia spontanee che coltivate. In Italia è stata osservata tra le altre su vite, nocciolo, pesco, ciliegio, mais e numerose specie ornamentali. Gli adulti che presentano un comportamento gregario, scheletrizzano le foglie delle piante ospiti risparmiandone solo le nervature mentre le larve sono radicicole, attaccano prevalentemente tappeti erbosi e prati, preferiscono le graminacee e i danni sono riconducibili a estesi disseccamenti aspecifici della vegetazione.

Dal 2015 la Regione Lombardia e la Regione Piemonte sono impegnate in costanti attività di monitoraggio dell'insetto (sia in fase larvale che adulta) per la definizione delle zone focolaio e di cuscinetto nel quale applicare misure di lotta obbligatoria (cattura massale degli adulti e interventi larvicidi a base di *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5).

La distribuzione iniziale dell'insetto nell'areale protetto del Parco del Ticino ha imposto la ricerca di soluzioni per un controllo di tipo non chimico. Numerosi studi in letteratura hanno dimostrato l'efficacia del *M. anisopliae* nel controllo di larve di scarabeidi inclusa *P. japonica* (Krueger et al., 1991, Krueger et al., 1992) e di nematodi entomoparassiti (Shetlar et al., 1988; Villani & Wright, 1988)

L'obiettivo del presente studio è stato di indagare in via preliminare l'efficacia di due strategie di controllo biologico comprendenti sia *Heterorhabditis bacteriophora* che *M. anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta in condizioni controllate nel "Laboratorio di Entomologia Applicata" sito a Rozzano (MI) tra l'11 febbraio e il 21 marzo 2016. La temperatura e l'umidità dell'aria sono state monitorate e controllate affinché venissero replicate le condizioni ambientali tardo-primaverili: le temperature ambientali misurate si sono attestate tra i 18° e i 26°C.

L'unità sperimentale (figura 1), rappresentata da un contenitore plastico del volume di circa 30 litri, è costituita da un fondo riempito con 1 kg di lapillo vulcanico per favorire il drenaggio e non creare condizioni di ristagno idrico, sopra il quale sono stati deposti circa 6 kg di suolo prelevato a Oleggio (NO), località focolaio dell'infestazione italiana di *P. japonica*, previa setacciatura grossolana per l'eliminazione dello scheletro. A chiusura dell'unità è stato posizionato uno strato di tappeto erboso prelevato nella medesima località. Utilizzando materiale originario della zona focolaio si è cercato di mantenere una continuità nell'attività trofica della larva.

Le larve per l'infestazione artificiale delle unità sperimentali sono state raccolte il 5 febbraio nella località citata e sono state mantenute a 6-7°C fino al giorno precedente la distribuzione quando, per facilitarne l'ambientamento, sono state portate per 24 ore a 20°C. L'8 febbraio quindici larve per unità sperimentale sono state posizionate sopra il tappeto erboso; le larve che in 30 minuti non si sono approfondite nel suolo attraversando il cotico erboso sono state rimpiazzate con esemplari vitali.

Le tesi in prova, replicate quattro volte, sono state tre: un testimone non trattato infestato (TNT), una tesi trattata solo con Granmet gr alla dose di 50 kg/ha e una tesi comprendente un'applicazione di Granmet gr a 50 kg/ha seguita da un'applicazione di Optinem H. bacteriofora a $5x10^7$ nem/100 m^2.

Granmet gr è un formulato granulare composto da cariossidi devitalizzate di orzo micotizzate con spore e micelio di *M. anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5. Le cariossidi vengono inserite all'interno di fratture create nel cotico a simulare un'applicazione in pieno campo mediante una seminatrice su sodo. Optinem H viene diluito in acqua e spruzzato sulla vegetazione. L'applicazione viene poi seguita da un'irrigazione per permettere ai nematodi la penetrazione nel suolo.

I rilevamenti sono stati effettuati il 2 e il 22 marzo 2016, venti e quaranta giorni dopo l'applicazione. Le unità sperimentali sono state distrutte per poter valutare quantitativamente le larve sopravvissute al trattamento (figura 2). La presenza delle larve vive è stata definita in funzione della localizzazione all'interno dell'unità sperimentale (zona radicale oppure suolo sottostante).

L'efficacia nel controllo delle larve viene definita come riduzione del numero di larve vive di ogni trattamento confrontato con la popolazione larvale presente nella tesi non trattata (trasformazione Abbott) considerando zona per zona (zona radicale e suolo sottostante) e la totalità delle larve presenti nell'intera unità sperimentale.

Figura 1. Unità sperimentali (visione d'insieme e particolare)

Figura 2. Particolari di un rilevamento

RISULTATI

Al primo rilevamento si evidenzia una tendenza delle larve nello stanziarsi prevalentemente nella zona inferiore delle unità sperimentali: circa il doppio delle larve predilige stazionare in profondità nella tesi non trattata. La mortalità naturale rilevata a venti giorni dall'applicazione è trascurabile: solo 0,5 larve su 15 sono decedute.

Nella tesi con l'applicazione singola di Granmet gr si manifesta un'efficacia di circa il 12% nel controllo delle larve di *P. japonica*. Inoltre risulta evidente e amplificato il comportamento delle larve che si dirigono verso il fondo dell'unità sperimentale (12 esemplari contro 0,8 larve rilevate nella zona radicale). Nella tesi con l'applicazione combinata dei nematodi e del *M. anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5 l'efficacia aumenta al 55,2%.

Al secondo rilievo la mortalità naturale è maggiore: mediamente il 18% delle larve non è sopravvissuto ai primi 40 giorni. Quando Granmet gr è applicato da solo raggiunge il 46,9% dell'efficacia, mentre in combinazione con Optinem H raggiunge il 98% calcolato sulle larve rinvenute nell'intera unità sperimentale.

Per entrambi i trattamenti il controllo nella zona radicale è eccellente: nessun individuo e 0,5 larve sono state rinvenute rispettivamente nella tesi 2 e nella tesi 3. Granmet gr applicato da solo invece evidenzia un controllo inferiore nella zona sotto le radici: 6 larve su 9,8 sono sopravvissute al trattamento contro le 0,3 del trattamento combinato (tabella 1).

Tabella 1. Numero medio delle larve vive rinvenute per ogni tesi - % efficacia su Abbott

N.	Tesi	Formulato	Dose formulato	Rilievo del 2/3			Rilievo del 22/3		
				Zona radicale	Suolo sottostante	Totale	Zona radicale	Suolo sottostante	Totale
1	TNT	-	-	4,8	9,7	14,5	2,5	9,8	12,3
2	*M. anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5 + *H. bacteriophora*	Granmet gr + Optinem H	50 kg/ha + $5x10^7$ nem/100 m^2	1	5,5	6,5 (55,2%)	0	0,3	0,3 (98%)
3	*M. anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5	Granmet gr	50 kg/ha	0,8	12	12,8 (12,1%)	0,5	6	6,5 (46,9%)

Tra parentesi l'efficacia calcolata con la trasformazione Abbott

DISCUSSIONE

La riduzione del numero di esemplari nel testimone non trattato durante il periodo di prova è causata da una mortalità naturale indotta da cannibalismo, abbastanza comune tra le larve di *P. japonica,* e dallo stress procurato dalle condizioni imposte di "cattività".

L'efficacia del fungo *M. anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5 (Granmet gr) sulle larve terricole avviene per contatto e/o per ingestione. Di conseguenza la maggior probabilità di successo dipende dal grado di colonizzazione del suolo soprattutto nei primi 10-15 cm. All'aumentare della consistenza della popolazione fungina aumentano conseguentemente le possibilità di contatto con l'insetto.

Dopo venti giorni, quando *H. bacteriopfhora* viene applicato in combinazione col fungo *M. anisopliae*, l'efficacia viene incrementata al 55,2%; la rapidità d'azione dei nematodi entomoparassiti si esplica con un aumento dell'efficacia tra la tesi 3 e la tesi 2 del 43% circa.

Al secondo rilievo, dopo quaranta giorni, l'efficacia di tutti i trattamenti sale significativamente raggiungendo il 46,9% (Granmet gr) e il 98% (Granmet gr + Optinem H). E' evidente il significativo contributo nel medio periodo di *M. anisopliae* var. *anisopliae* bipesco 5 nel controllo delle larve. La tesi 3 quadruplica l'efficacia rispetto al primo rilevamento. L'applicazione combinata dei due prodotti determina un controllo pressoché totale delle larve di *P. japonica.*

CONCLUSIONI

M. anisopliae var. *anisopliae* bipesco 5 applicato da solo manifesta una buona efficacia nel periodo di prova (quaranta giorni) considerando che il fungo esplica appieno la sua attività nel medio - lungo periodo. Infatti le larve infettate diventano a loro volta vettori del fungo distribuendo potenzialmente in misura esponenziale le spore e il micelio.

L'attività di Granmet gr e Optinem H ha mostrato ottimi risultati nel breve – medio periodo combinando la rapidità di efficacia del nematode e la persistenza del fungo, configurandosi come una possibile concreta strategia di controllo della larva.

Possibili sviluppi futuri consisteranno in una valutazione dell'efficacia in pieno campo dei prodotti tenendo in considerazione anche le criticità di ambientamento del fungo e dei nematodi a condizioni ambientali sub ottimali (scarsa umidità del terreno e temperature eccessive).

Ringraziamenti
Si ringraziano ERSAF, Regione Lombardia e Regione Piemonte nelle persone di Mariangela Ciampitti, Beniamino Cavagna, Alessandro Bianchi e tutti i tecnici coinvolti a vario titolo senza i quali non sarebbe stata possibile l'esecuzione di questo lavoro.

LAVORI CITATI

EPPO, 2014. First report of Popillia japonica in Italy. *EPPO Reporting* Service, 10, 2.

Krueger S., M. G. Villani, J. P. Nyrop, D. W. Roberts., 1991. Effect of soil environment on the efficacy of fungal pathogens against scarab grubs in laboratory bioassays. *J. BioI. Control*, 1, 203-209.

Krueger S., M. G. Villani A. S. Martins D. W. Roberts, 1992. Efficacy of soil applications of Metarhizium anisopliae conidia, and standard and lyophilized mycelium particles against scarab grubs. *J. Invertebr. Pathol*, 59, 54-60.

Shetlar D.J., Suleman P.E., Georgis R., 1988. Irrigation and use of entomogenous nematodes, Neoaplectana spp. and Heterorhabditis heliothidis (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 81, 1318-1322.

Villani M.G., Wright R.J., 1988. Entomogenous nematodes as biological control agents of European chafer and Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae infesting turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 81, 484-487.