S.GRASSI, K.V.DESEO¹¹

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-Alimentare -
Centro di Fitofarmacia - Università degli Studi - Bologna

DIFFUSIONE DI Bacillus thuringiensis BERL. E PROSPETTIVE D'IMPIE-
GO NELLA DIFESA DELLE PIANTE.*

La diffusione di B.thuringiensis nell'ambiente naturale ed in particolare in popolazioni di Lepidotteri fitofagi, è stato finora oggetto di numerose ricerche condotte in diversi paesi allo scopo di isolare prima e moltiplicare poi, tale microrganismo e di usarlo come mezzo di lotta specifica e innocua per l'uomo e per l'ambiente.

Infatti i 19 serotipi di questo batterio finora identificati, sono stati isolati da insetti con i quali l'uomo è in continuo contatto; questi insetti si possono trovare in colture agricole, forestali e persino sui frutti e sulle verdure in commercio (Burges e Hussey, 1971; Burges, 1981).

La frequente presenza riscontrata di questo batterio ha suggerito approfondite ricerche sulla sua diffusione e sul suo comportamento negli ambienti naturali (Dulmage e Aizawa, 1982) e così si è potuto accertare che solo in tre specie di insetti B.thuringiensis aveva provocato, nell'ambito delle popolazioni, infezioni di carattere epidemico (Kurstak, 1962; Kulagin, in Talalaeva 1967; Burges e Hurst, 1977)

Un altro settore della ricerca condotta su B.thuringiensis è stato dedicato allo studio e all'identificazione delle varietà e dei serotipi isolati dai diversi ambienti naturali per verificare quali fossero quelle rispondenti alle esigenze fitoiatriche. Questa

* Ricerca finanziata in parte dalla Regione Emilia-Romagna - II Dipartimento Attività Produttive Agricoltura e Alimentazione.

continua ricerca ha permesso di scoprire nuovi ceppi e varietà che possono essere impiegati contro altri insetti (per es. B.thuringiensis var. israelensis contro le zanzare) oppure che presentano una specificità tale da garantire più sicurezza per l'uomo e per l'ambiente e maggiore efficacia nei confronti del fitofago anche riducendo il numero dei trattamenti.

Tutte queste considerazioni ci hanno indotto ad iniziare una indagine in Emilia-Romagna e in parte del Veneto allo scopo di accertare la diffusione di B.thuringiensis nelle popolazioni di alcuni importanti fitofagi come Ostrinia nubilalis Hbn. (Lepidoptera; Pyralidae), Lobesia botrana Den. e Schiff. (Lepidoptera; Tortricidae) ecc. e di isolare ceppi indigeni da moltiplicare e da sperimentare nei luoghi e contro le stesse specie fitofaghe da cui erano stati isolati.

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta su popolazioni di O.nubilalis, L.botrana, Cossus cossus L. (Lepidopt.; Cossidae) e Laspeyresia molesta Buck (Lepidopt.; Tortricidae).

1. Reperimento del materiale

I campioni raccolti in campo in diverse località, (tab.1) erano costituiti da stocchi di mais, grappoli d'uva, rami di melo e di pesco*. Si sono prelevate le larve che sono state allevate su dieta artificiale e tenute in costante osservazione. Man mano che morivano, sia le larve che le pupe venivano prelevate dai vasi di allevamento e conservate in frigorifero.

Si sono esaminati complessivamente 11 campioni di O.nubilalis, 12 di L.botrana, 1 di C.cossus e 1 di L.molesta.

2. Isolamento di B.thuringiensis

Le larve e le pupe sono state trattate con la tecnica di Weiser (1977): sono state disinfettate in superficie mediante immersione in soluzione acquosa di aldeide formica allo 0,5% per 5 minuti e poi sciacquate tre volte in acqua sterile. E' stata quindi asportata la zona situata dietro la capsula cefalica così da prelevare anche negli esemplari già secchi, l'intestino anteriore e medio.

* Si ringraziano il Dr R.Barbieri (Consorzio Fitosanitario di Modena) per i campioni di uva, il Prof.P. Baronio (Istituto di Entomologia Agraria - Bologna) per le larve di Rodilegno rosso e il C.E.R. - SIAPA (Galliera-BO) per i campioni di mais.

Tab. 1 - Fitofago, epoca di raccolta e provenienza dei campioni esaminati.

Campione	Fitofago	Epoca di raccolta	Provenienza
O-1	<u>Ostrinia nubilalis</u>	9/82	Cà Morosini (PD)
O-2	"	"	Bondeno (FE)
O-4	"	"	Vescovana (PD)
O-5	"	"	Polesella (RO)
O-6	"	"	Galliera (BO)
O-7	"	"	Polesella (RO)
O-8	"	"	Galliera (BO)
O-9	"	"	Polesella (RO)
O-10	"	"	Cantone (BO)
O-11	"	"	Cantone (BO)
O-20	"	"	Galliera (BO)
CC-1	<u>Cossus cossus</u>	5/82-6/83	Lugo (RA)
LM-1	<u>Laspeyresia molesta</u>	7/83	Galliera (BO)
L-1	<u>Lobesia botrana</u>	5/83	Rimini (FO)
L-3	"	"	Roncadello (FO)
L-4	"	"	Castel d'Argile (BO)
L-12	"	6/83	Gavasseto (RE)
L-13	"	"	Rimini (FO)
L-15	"	"	Rimini (FO)
L-16	"	"	Modena
L-17	"	"	Molinella (BO)
L-19	"	"	Carpi (MO)
L-21	"	"	Nonantola (MO)
L-24	"	"	Carpi (MO)
L-37	"	7/83	S.Cesario (MO)

Queste sezioni, che avevano uno spessore variabile, a seconda delle dimensioni dell'insetto, da 0,5 mm a 1,5 mm, sono state appoggiate su Nutrient Agar (Merck) precedentemente versato in scatole Petri sterili.

Le piastre sono state mantenute a 28-30°C per 2-3 giorni e dalle colonie batteriche che si sono sviluppate sull'agar, sono stati prelevati i batteri che sono stati esaminati al microscopio ottico per individuarne la natura. Le colonie di B.thuringiensis così identificate sono state purificate con tre successivi trapianti e conservate in frigorifero a 5-6°C.

Risultati

I risultati della nostra indagine sono riportati in tab.2.

La presenza di B.thuringiensis è stata appurata osservando al microscopio ottico i bastoncelli che avevano lunghezza variabile da 3 a 6 micron. All'interno del bastoncello si potevano notare la spora ovale e l'endotossina dalla caratteristica forma bipiramidale, lunga circa quanto la spora: da 0,8-1 μ fino a 1,8-2 μ .

E' stato appurato che inizialmente la produzione di spore e di endotossine era molto scarsa e solo dopo diversi giorni aumentava fino a prevalere decisamente sul numero delle cellule vegetative.

La sintomatologia degli individui infetti è stata variabile, ma alcune caratteristiche fisiologiche e istologiche sono risultate comuni a tutte le specie: le larve malate cessavano di nutrirsi e mostravano un rallentamento dei movimenti. Successivamente subentrava la paralisi completa dell'apparato digerente e di quello locomotorio cui seguiva la morte.

I tessuti risultavano inflacciditi ed il corpo assumeva una colorazione grigiastrea. In alcune specie (O.nubilalis, C.cossus) la cuticola risultava indenne quindi non c'era fuoriuscita dei liquidi risultanti dal disfacimento delle cellule dell'epitelio intestinale. In L.botrana invece anche la cuticola è risultata danneggiata e spesso le larve sono andate incontro a disfacimento quasi completo.

Spesso, accanto a questa sintomatologia generale, si sono potuti osservare sintomi particolari come per esempio alterazioni dello spessore corporeo (ingrossamenti o strozzamenti) a livello dell'intestino medio.

Tab. 2 - Campioni esaminati e numero delle larve e delle pupe contenenti B. thuringiensis

Campione	Esemplari esaminati		Esemplari contenenti <u>B. thuringiensis</u>	
	Larve	Pupe	Larve	Pupe
O-1	11	4	-	2
O-2	6	1	-	-
O-4	-	2	-	-
O-5	3	-	-	-
O-6	8	3	-	-
O-7	1	-	-	-
O-8	8	4	2	-
O-9	1	-	-	-
O-10	2	1	-	-
O-11	5	-	1	-
O-20	-	4	-	2
CC-1	10	-	2	-
LM-1	1	-	1	-
L-1	-	1	-	1
L-3	-	1	-	-
L-4	-	2	-	1
L-12	-	1	-	1
L-13	-	1	-	1
L-15	-	2	-	2
L-16	1	-	1	-
L-17	4	-	-	-
L-19	-	2	-	2
L-21	-	1	-	1
L-24	-	2	-	2
L-37	-	3	-	-

O = Ostrinia nubilalis
 CC= Cossus cossus
 LM= Laspeyresia molesta
 L = Lobesia botrana

Accanto a B.thuringiensis spesso si è osservata la presenza di altri microrganismi: funghi, virus, microsporidi. In particolare quasi tutti i campioni di L.botrana con B.thuringiensis contenevano anche il virus della poliedrosi citoplasmatica (CPV).

Discussione

Attualmente sono in corso prove sierologiche in collaborazione con il Prof. K.Aizawa, per l'identificazione dei serotipi da noi isolati. L'identificazione dei serotipi costituisce una tappa fondamentale poichè con tale diagnosi è possibile individuare le caratteristiche tossicologiche del ceppo isolato, ed in particolare se esso produca o meno la pericolosa β -exotossina al fine di valutare l'eventuale importanza fitoiatrica.

Il B.thuringiensis var. Kurstaki serotipo 3a : 3b che, secondo le prime indicazioni, è stato rinvenuto nei campioni O-1 e O-11, è quello che oggi si produce per le formulazioni che si trovano in commercio, in quanto oltre a manifestare vasta gamma d'azione nei confronti delle larve di lepidotteri, contiene esclusivamente δ -endotossina ed è quindi innocuo per l'uomo e per l'ambiente.

La frequenza di B.thuringiensis nei campioni esaminati, conferma l'idea generale del suo ruolo di malattia cronica e non epidemica. La spiegazione va ricercata nella scarsissima produzione di spore a cristalli proteici (δ -endotossina), che sono responsabili dell'azione tossica del batterio, da parte dei bacilli presenti nel terreno e nei cadaveri degli insetti colpiti, che non permette l'accumulo di un potenziale d'inoculo sufficiente a scatenare un'epidemia (Faust e Bulla, 1983).

L'isolamento e la produzione di ceppi indigeni potrebbe aumentare questo potenziale d'inoculo, così da controllare efficacemente la specie da colpire, senza però introdurre nell'ambiente agenti estranei.

Il rinvenimento di altri microrganismi contemporaneamente a B.thuringiensis può essere stato concausa della morte degli insetti ed essere in parte responsabile della variabilità dei sintomi osservati.

Questa eventualità è già stata segnalata da altri autori e in

* Si ringraziano il Prof. K.Aizawa e il Dr M.Ohba (Kyushu University, Fukuoka, Giappone) per la conferma di B.thuringiensis e l'identificazione dei serotipi.

pratica riguarda un effetto sinergico dovuto al fatto che quando gli insetti sono già indeboliti da fattori di stress, sia di natura chimica che biologica, diventano più sensibili all'azione patogena di B.thuringiensis.

In pratica questo fenomeno viene sfruttato miscelando B.thuringiensis con piccole dosi di insetticida (Benz, 1971) che serve a indebolire l'insetto e a renderlo più vulnerabile.

Questo microrganismo oggi è impiegato in USA, URSS, Asia, Australia e nella maggior parte dei paesi europei, sia su essenze forestali e ornamentali sia su colture eduli e in alcuni di questi paesi senza periodo di carenza. Attualmente (gennaio 1984) in Italia è in corso di registrazione.

I formulati a base di spore e di cristalli proteici sono stati oggetto di rigorose prove tossicologiche da cui è risultato che i preparati a base di δ -endotossina (non contenenti β -exotossina) che sono quelli prodotti e impiegati in Occidente, sono innocui per l'uomo, gli animali a sangue caldo, le api (Celli e Giordani, 1966) e altri insetti utili (Dulmage e Aizawa, 1983).

Le prospettive d'impiego di B.thuringiensis ed i suoi campi d'applicazione sono senz'altro destinati ad aumentare e ciò comporterà un miglioramento delle formulazioni, una maggior prontezza d'azione e riduzione dei costi.

Conclusioni

I reperimenti ed isolamenti da noi effettuati su materiale proveniente da ambienti naturali dell'Emilia-Romagna e del Veneto, ci consentono di affermare che B.thuringiensis è diffuso in natura nel nostro Paese. Oltre a confermarne la presenza in O.nubilalis possiamo citare come ospiti nuovi L.botrana, C.cossus e L.molesta.

E' possibile dunque prevedere un impiego mirato con ceppi di B.thuringiensis già presenti negli ambienti dove verranno distribuiti. Ciò lascia presupporre senz'altro una buona efficacia della lotta e una maggiore salvaguardia dell'ambiente e dell'uomo.

Riassunto

Nell'autunno-inverno 1982 e nella primavera-estate 1983 sono stati raccolti campioni di stocchi di mais e grappoli d'uva allo scopo di prelevare larve e pupe malate di Ostrinia nubilalis Hbn. (Lepidopt.; Pyralidae) e di Lobesia botrana Den. e Schiff. (Lepidopt.; Tortricidae) (tab.1). L'intestino anteriore e medio degli esemplari

malati è stato appoggiato su Nutrient Agar Merck e, quando presente, è stato isolato Bacillus thuringiensis Berl.. Questo microrganismo è stato rinvenuto in 4 campioni di O.nubilalis e in 9 di L.botrana. B.thuringiensis era presente inoltre negli unici campioni di Cossus cossus L. (Lepidopt.;Cossidae) e di Laspeyresia molesta Buck (Lepidopt.;Tortricidae) osservati.

Nelle larve di O.nubilalis uccise da B.thuringiensis la cuticola si è presentata intatta, mentre in quelle di L.botrana il dissefacimento ha coinvolto anche i tessuti epidermici e B.thuringiensis è stato rinvenuto anche esternamente alle larve distrutte.

La diffusione di B.thuringiensis negli ambienti naturali del nostro Paese acquista oggi importanza ancora maggiore poichè nel nostro Paese attualmente (gennaio 1984) è in corso di registrazione il primo preparato a base di questo microrganismo.

Summary

THE NATURAL OCCURRENCE OF Bacillus thuringiensis BERL. AND ITS IMPORTANCE IN THE PLANT PROTECTION.

In the autumn-winter 1982 and in the spring-summer 1983 samples of maize stocks and grapes have been checked for ill larvae and pupae of Ostrinia nubilalis Hbn. (Lepidopt.;Pyralidae) and Lobesia botrana Den. e Schiff. (Lepidopt.;Tortricidae) (table 1).

The anterior and midgut of the diseased specimens have been put on Merck's Nutrient Agar and the B.thuringiensis, if present, was isolated. In 4 of the 11 maize samples B.thuringiensis was detected; the 12 samples of grapes were all but three with B.thuringiensis.

Furthermore 2 young larvae of Cossus cossus L. (Lepidopt.;Cossidae) of the 10 specimens originating from one place and the only larva of Laspeyresia molesta Buck (Lepidopt.;Tortricidae) resulted to be infected by B.thuringiensis (table 2).

Symptoms of the disease caused by B.thuringiensis are described. Whereas dead larvae of O.nubilalis have an intact cuticle; those of L.botrana usually are damaged and B.thuringiensis may be found near the destroyed larvae.

The importance of the natural occurrence of B.thuringiensis is discussed, since in Italy, by the time being (January, 1984), the use of this product is not allowed, however its authorisation is under examination.

Bibliografia

- BENZ G. (1971). Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In Burges H.D. and Hussey N.W.: "Microbial control..." 327-353.
- BURGES H.D. (1981). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press London-New York, 949.
- BURGES H.D. and HURST J.A. (1977). Ecology of Bacillus thuringiensis in storage moths. J. Invertebr. Pathol. 30: 131-139.
- BURGES H.D. and HUSSEY N.W. (1971). Microbial control of Insects and Mites. Academic Press London-N.Y., 861.
- CELLI G. e GIORDANI G. (1966). Ricerche sull'attività del B. thuringiensis Berl. in riguardo all'Apis mellifera L.. Boll. Entomol., 28, Bologna, 141-175.
- DULMAGE H.T. and AIZAWA K. (1983). Distribution of Bacillus thuringiensis in nature. In Kurstak E. 1983, "Microbial and viral..." 209-237.
- FAUST R.M. and BULLA L.A. Jr. (1983). Bacteria and their toxins as insecticides. In Kurstak E. 1983, "Microbial and viral..." 74-208.
- KURSTAK E. (1962). Donnée sur l'épizootie bacterienne naturelle provoquée par un Bacillus du type thuringiensis sur Ephestia kuehniella Zeller. Entomophaga, Mem. Hors. Ser. 2, 245-257.
- KURSTAK E. (1983). "Microbial and viral pesticides", Marcel Dekker Inc.. New York and Basel, 720.
- WEISER G. (1977). An atlas of insect diseases. II^e Edition. D.W. Junk. publ., the Hague + Academia Publ. of CSAV, Prague, 240.