

DELFIN^(R) : UN NUOVO CEPPLO DI Bacillus thuringiensis var.
kurstaki ATTIVO SUI LEPIDOTTERI NOTTUIDI

BRUNO SGARZI - ANGELO BERTONA
Sandoz Prodotti Chimici S.p.A.

RIASSUNTO

Delfin^(R) è un nuovo insetticida biologico a base di Bacillus thuringiensis Berliner var. kurstaki serotipo 3a, 3b, ceppo SA 11 (Btk-SA11) che agisce per ingestione sulle larve dei Lepidotteri. A differenza di Btk-HD1, Delfin risulta attivo anche sulle larve dei Lepidotteri Nottuidi. L'efficacia insetticida di Btk-SA11 viene fornita dal cristallo proteico prodotto dalla cellula durante la fase di sporulazione. Dopo l'ingestione, il cristallo viene attivato dalle proteasi presenti nell'intestino medio della larva e trasformato in tossina la quale agisce sulle cellule dell'epitelio intestinale provocando dapprima la paralisi e la rottura del tratto intestinale, in seguito la morte della larva. Nel presente lavoro si riportano le prove di pieno campo eseguite contro la Tignoletta della vite su uva da tavola, contro il Tortricide ricamatore Pandemis cerasana su melo e pero e contro la Nottua del cavolo su cavolo e cavolfiore.

SUMMARY

DELFIN^(R) : A NEW STRAIN OF Bacillus thuringiensis var. kurstaki ACTIVE AGAINST LEPIDOPTERA NOCTUIDAE

Delfin^(R) is a new biological insecticide containing Bacillus thuringiensis Berliner var. kurstaki serotype 3a, 3b, strain SA 11 (Btk-SA11) and active upon ingestion on lepidopterous larvae. Unlike Btk-HD1, Delfin proves to be active also against Lepidoptera Noctuidae larvae. The insecticide efficacy of Btk-SA11 is provided by the protein crystal which the cell produces during sporulation. After

ingestion, the crystal is activated by the protease enzymes present in the midgut of the larvae and is transformed into a toxin. The toxin acts on the cells of the gut epithelium, causing at first the paralysis and the break of the gut, and then the death of the larvae. This work reports the field trials carried out against the 'Tignoletta della vite' (Grape berry moth) on table grapes, against the 'Tortrice ricamatore Pandemis cerasana' (Tortrix moth) on apples and pears and against the 'Nottua del cavolo e del cavolfiore' (Cabbage moth).

INTRODUZIONE

Tra i microrganismi di origine naturale che dispongono di attività patogena il più noto è Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Btk). Btk è un batterio sporigeno la cui attività insetticida viene fornita dal cristallo proteico deposto a lato della spora durante il processo di sporulazione. Dopo l'ingestione il cristallo viene trasformato in delta-endo-tossina, una tossina letale per le larve dei Lepidotteri. I formulati a base di Btk attualmente impiegati in agricoltura, come ad esempio Thuricide Hp, contengono il ceppo HD1 scoperto nel 1969 da H. T. Dulmage. Tale ceppo è attivo contro le larve di molte specie di Lepidotteri ad eccezione di quelle appartenenti alla famiglia dei Nottuidi. Recentemente, i ricercatori della Sandoz hanno selezionato un nuovo ceppo di Btk denominato SA 11 efficace anche contro le larve dei Nottuidi. Btk-SA11 verrà posto in commercio con il marchio Delfin (R) .

CARATTERISTICHE GENERALI DI Btk-SA11

Classificazione tassonomica

Btk-SA11 è un batterio Gram-positivo appartenente al serotipo 3a, 3b.

Morfologia e struttura

Le cellule di Btk-SAll sono a forma di bastoncino, flagellate e contengono a lato dell'esosporio, un cristallo parasporale bipiramidale della lunghezza di 1-1,5 μ e composto in gran parte da proteine. La sintesi del cristallo inizia tra la fase seconda e terza del processo di sporulazione e raggiunge il suo apice nella fase quinta in concomitanza con la massima dimensione del cristallo. (Bechtel et al., 1976; Lecaded et al., 1971). Come per la maggior parte dei ceppi di Btk, anche per SAll le informazioni genetiche che codificano la produzione del cristallo sono contenute nei plasmidi. In Btk HD1 esistono 12 plasmidi di dimensioni variabili tra 1,9 e 120 M Da ed il gene che codifica la produzione della delta-endotossina è inserito in un plasmidio di 44 M Da (Carlton et al., 1984; Kronstad et al., 1983). Anche per Btk-SAll, recentemente, è stata determinata la composizione del complesso plasmidico mediante il plasmidiogramma. Le dimensioni di questi plasmidi non sembrano molto diverse da quelle di Btk-HD1. Tuttavia, l'elevata attività dimostrata da Btk-SAll contro i Nottuidi fa presumere che esistano delle differenze nella composizione e nella funzionalità dei plasmidi, nel peso molecolare e nella sequenza degli aminoacidi che compongono la tossina. Alcuni plasmidi, infatti, pur non disponendo del gene della delta-endotossina sono preposti alla regolazione della quantità di tossina prodotta (Minnich et al., 1984). La produzione di tali plasmidi da parte della cellula avviene in condizioni particolari e solo una elevata tecnologia della fermentazione ne rende possibile la comparsa.

IL FORMULATO

Delfin è un formulato in granuli disperdibili contenente Btk-SAll. Le caratteristiche del formulato sono le seguenti:

-Numero di spore vitali: almeno 60×10^6 spore/mg formulato

-Attività insetticida : 32.000 U.I./mg formulato

-Peso specifico: 0,42-0,46 kg/l

-pH: 5,5 - 6,0 (calcolato su una sospensione al 10%)

-Bagnabilità: < 30 sec

-Stabilità: Delfin è stabile a temperatura ambiente (20-24 °C) e mantiene inalterata la sua efficacia insetticida per almeno due-tre anni.

U.I./mg = unità di attività determinate con prove biologiche sulle larve dell'insetto test Trichoplusia ni.

MODO DI AZIONE

Delfin agisce esclusivamente per ingestione. I primi sintomi dell'intossicazione compaiono poco dopo l'ingestione del complesso spora-cristallo parasporale e si manifestano, dapprima, con l'arresto dell'alimentazione per la paralisi dell'apparato boccale e dell'intestino medio, in seguito con la paralisi generale. La morte della larva sopraggiunge due o tre giorni più tardi. Il cristallo proteico, nell'intestino medio della larva, in ambiente alcalino ($\text{pH} > 9$) e sotto l'azione degli enzimi proteolitici, libera la delta-endotossina, una protossina formata da polipeptidi del peso molecolare di 130-140 K Da (Luethy et al., 1981). Dalla delta-endotossina, per ulteriore scissione enzimatica, si ottiene la tossina, un composto a base di polipeptidi attivi con un peso molecolare di circa 62 K Da (Yamamoto et al., 1983). Nell'intestino medio della larva, la tossina agisce sulle cellule dell'epitelio intestinale provocandone il rigonfiamento, la vacuolizzazione, la lisi e la sfaldatura; segue la paralisi del tratto intestinale e la rottura della parete dell'intestino. La tossina interagisce con la

membrana cellulare ed induce la formazione di microscopici pori delle dimensioni di 0,5-1 nm. Questi alterano la permeabilità della membrana e consentono l'afflusso di ioni e di acqua nella cellula che, di conseguenza, subisce la lisi e la rottura (Knowles et al., 1987). Nelle specie più sensibili la tossina è la vera responsabile della morte della larva e l'infezione setticemica avviene quando l'intossicazione ha raggiunto uno stadio irreversibile. Nelle specie meno sensibili la morte della larva è la conseguenza dell'azione congiunta tra la spora e la tossina.

SPETTRO DI AZIONE

Le numerose prove eseguite in laboratorio ed in pieno campo dimostrano che Delfin è attivo sia contro le larve dei Lepidotteri sensibili a Btk-HD1 sia contro quelle resistenti. Alcune specie di Nottuidi, come Mamestra brassicae e Spodoptera littoralis, sono poco sensibili ai normali ceppi di Btk (Hoefte et al., 1988). L'attività di Delfin sui Nottuidi dimostra che la tossina derivante dalla solubilizzazione del cristallo proteico è altamente attiva per tutte le specie appartenenti a questa famiglia (Tab. 1).

Tab. 1 - Attività insetticida di Delfin e di Thuricide HP contro le larve di Spodoptera exigua e di Heliothis zea

| Formulati | Ceppo | CL ₅₀ in ppm | |
|--------------|-------|--------------------------|----------------------|
| | | <u>Spodoptera exigua</u> | <u>Heliothis zea</u> |
| Delfin | SA11 | 500-800 | 830 |
| Thuricide HP | HD1 | 8.900 | 7.300 |

La sensibilità delle larve dei Nottuidi a Delfin dipende dalla stadio di sviluppo. Le prove su S. exigua

dimostrano che la dose efficace di Delfin varia tra 0,5 e 2 kg/ha rispettivamente per le larve allo stadio L1 ed L4. (Graf. 3).

LE PROVE DI LOTTA

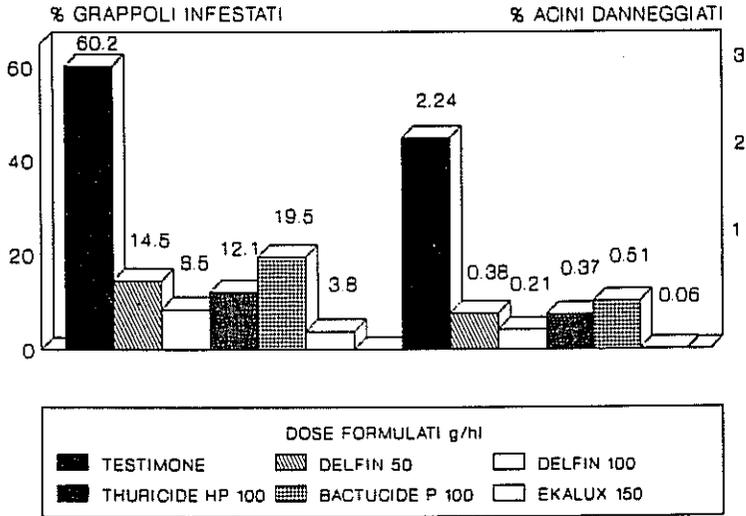
In Italia, le prime prove sperimentali in pieno campo con Delfin sono iniziate nel 1985 e, nel corso di un quinquennio, sono state prese in considerazione le più importanti specie di Lepidotteri che infestano le colture agrarie e forestali. Nel presente lavoro vengono sintetizzate solo le prove eseguite sulla vite contro la Tignoletta, sulle pomacee contro i Tortricidi ricamatori ed in orticoltura contro le Nottue.

Materiali e metodi

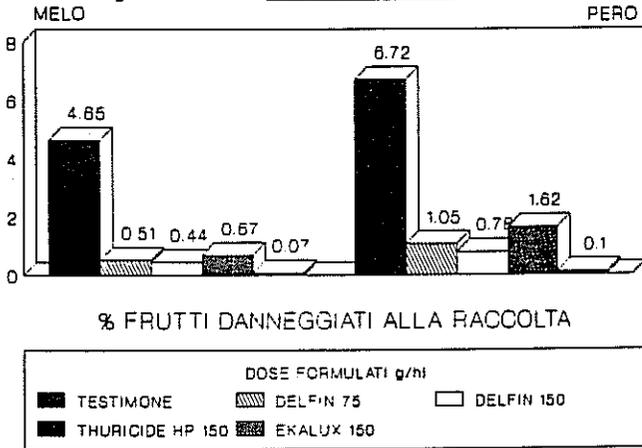
In viticoltura sono state eseguite 7 prove di lotta contro la seconda generazione della Tignoletta della vite (Lobesia botrana) su diverse varietà di uva da vino. Sono state poste a confronto sei tesi secondo uno schema che prevedeva 3-4 ripetizioni per ogni tesi. Le date dei trattamenti sono state decise in base alle indicazioni sui voli forniti dalle trappole sessuali Sandoz, modello Grapamone. I trattamenti sono stati eseguiti per Delfin a 100 g/hl a 8 e 10 giorni dall'inizio delle catture, per Ekalux a 10-12 giorni mentre per Delfin a 50 g/hl e per Thuricide HP sono stati eseguiti due trattamenti a 8 e 16 giorni. L'efficacia insetticida è stata valutata mediante il conteggio della percentuale di grappoli e di acini infestati dopo circa 3 settimane dal trattamento.

In frutticoltura sono state eseguite 4 prove di lotta contro la prima e la seconda generazione del Tortricide ricamatore Pandemis cerasana su melo e pero. Lo schema sperimentale prevedeva 5 tesi con 3-4 ripetizioni. Per tutti i prodotti il trattamento è stato eseguito a 14-16 giorni dal superamento della soglia di cattura di 15 maschi adulti per settimana e per trappola. Per Delfin a 75 g/hl e Thuricide

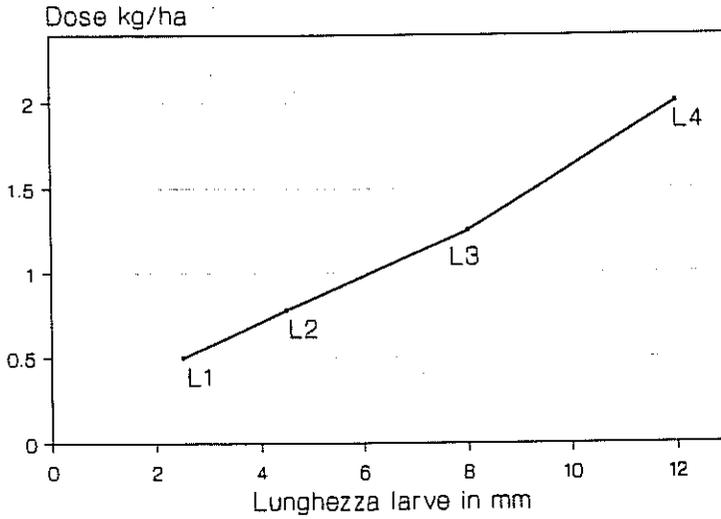
GRAF.1 - Risultati ottenuti con **DELFIN** contro la seconda generazione delle tignole della vite



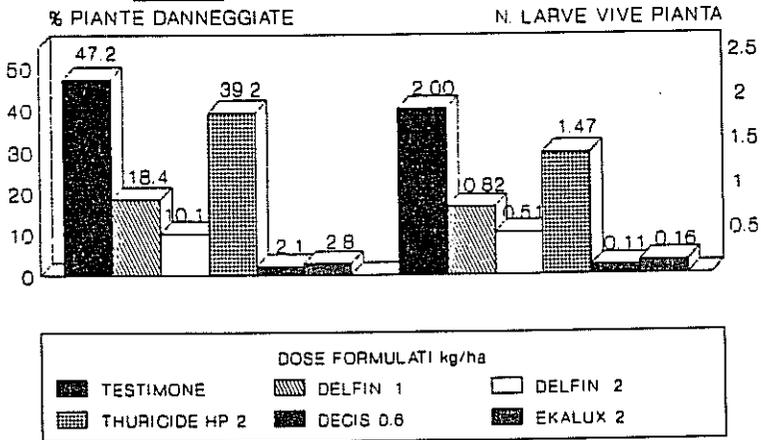
GRAF.2 - Risultati ottenuti con **DELFIN** contro la 1 e la 2 generazione di *Pandemis cerasana*



GRAF. 3 - DL95 di **DELFIN** su diversi stadi larvati di *Spodoptera exigu*



GRAF.4 - Risultati ottenuti con **DELFIN** contro *Mamestra brassicae* su cavolo e cavolfiore



HP è stato effettuato un secondo intervento 3-10 giorni più tardi. L'efficacia insetticida è stata valutata alla raccolta e riguarda la percentuale di frutti danneggiati.

In orticoltura, su cavolo e cavolfiore sono state effettuate 9 prove di lotta contro la Nottua del cavolo, (M.brassicae) con 6 tesi a confronto e 3-4 ripetizioni. Sono stati effettuati 3-4 trattamenti per generazione: il primo è stato diretto contro le larve neonate, gli altri si sono susseguiti ad intervalli di circa 10 giorni. L'efficacia insetticida è stata valutata dopo circa 8 giorni dall'ultimo trattamento e riguardava la percentuale di piante danneggiate ed il numero di larve vive per pianta.

Risultati

Nelle prove di campo Delfin ha fornito risultati eccellenti contro la Tignoletta della vite alla dose di 50 e di 100 g/hl (Graf. 1). Per ambedue le dosi è stata osservata una notevole riduzione della percentuale di grappoli infestati e di acini danneggiati.

Contro la prima e la seconda generazione di P. cerasana Delfin a 75 e 150 g/hl, applicato secondo le modalità descritte in precedenza, ha fornito una protezione significativa riducendo la percentuale di frutti danneggiati alla raccolta (Graf. 2).

In orticoltura, contro la Nottua del cavolo, Delfin applicato alla dose di 1 e di 2 kg/ha ha ridotto in modo concreto la percentuale di piante danneggiate ed il numero di larve vive per pianta rispetto al testimone (Graf. 4).

CONCLUSIONI

Delfin è un nuovo insetticida biologico che agisce per ingestione sulle larve dei Lepidotteri comprese quelle appartenenti alla famiglia dei Nottuidi. Le prove sperimentali dimostrano che Delfin può essere impiegato con successo nella lotta alla Tignoletta della vite alla dose di 50 e di 100 g/hl, al Ricamatore P. cerasana su melo e pero

alla dose di 75 e 150 g/hl ed in orticoltura alla Nottua del cavolo alla dose di 1 kg/ha in presenza di larve neonate e di 2 kg/ha se le larve sono in una fase di sviluppo più avanzato. Visto il modo di azione è opportuno irrorare con cura tutta la vegetazione.

BIBLIOGRAFIA

BECHTEL D.B., BULLA L.A., 1976. Electron microscopic study of sporulation and parasporal crystal formation in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol., 127,1472-1481.

CARLTON B.C., GONZALES Jr. J.M., 1984. Plasmid-associated delta-endotoxin production in Bacillus thuringiensis, p. 387-400. In A. T. Ganesan and J.A. Hoch (ed.). Genetics and biotechnology of bacilli. Academic Press. Inc., New York.

HOEFTE H., VAN RIE J., JANSEN S., VAN HOUTVEN H., VANDERBRUGGEN H., VAECK M., 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidoptera-specific insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Appl. Environ. Microbiol., 54,2010-2017

HUBER H., LUETHY P., 1981. Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: composition and activation. p. 209-234. In E. W. Davidson (ed). Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allehel, Osmun Publisher, Totowa, N.J.

KNOWLES B.H., ELLAR D.J., 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin with different insect specificities. Biochim. Biophys. Acta, 924,509-518.

KRONSTAD J.W., SCHNEPF H.E., WHITELEY H.R., 1983. Diversity of locations for Bacillus thuringiensis crystal protein genes. J. Bacteriol. 134,419-428.

LECADET M.M., DEDONDER R., 1971. Biogenesis of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis during sporulation. Eur. J. Biochem., 23, 282-294.

LUETHY P., EBERSOLD H.R., 1981. Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: histopathology and molecular mode of action, p.235-267. In E.W. Davidson (ed.), Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allanheld, Osmun Publisher, Totowa. N.J.

MINNICH S.A., ARONSON A.I., 1984. Regulation of protoxin synthesis in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol., 158,447-454.

YAMAMOTO T., IIZUKA T., 1983. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystal of Bacillus thuringiensis kurstaki. Arch. Biochem. Biophys., 227, 233-241.