

Sopravvivenza di Bacillus thuringiensis Berl. var. Kurstaki su viti attaccate da Lobesia botrana, in Toscana (nota preliminare)

R. TIBERI*, G. SURICO*, G. TASSINARI**

* Istituto di Patologia e Zoologia forestale e agraria, Firenze

** Collaboratore esterno

RIASSUNTO

Si riferiscono i risultati di una sperimentazione condotta nel 1989 in un vivaio situato nelle vicinanze di Firenze sulla persistenza e sulla efficacia di due preparati commerciali di Bacillus thuringiensis var. Kurstaki (Bactucide P e Thuricide HP) nei confronti delle larve di 2^a generazione di Lobesia botrana. I batteri sono stati distribuiti come sospensione acquosa addizionata di ossicloruro di rame (500 g/hl) e di zolfo bagnabile (300 g/hl) su viti della cv Sangiovese. Foglie e acini sono stati esaminati periodicamente per determinare la percentuale di sopravvivenza dei batteri e il grado di infestazione di L.botrana.

Il numero di spore vitali presenti sulle foglie e sugli acini di vite è apparso alto in tutti e due i tipi di trattamento negli 8 giorni successivi alla distribuzione. Successivamente le spore vitali sono diminuite drasticamente. Comunque, un numero elevato di spore è stato rilevato sulle foglie e, soprattutto, sugli acini 6 settimane dopo il trattamento. In generale, sugli acini la sopravvivenza di Thuricide HP è apparsa maggiore di quella del Bactucide.

Quanto alle larve di L.botrana, è stata rilevata un'azione soddisfacente di Thuricide HP, mentre più modesta è apparsa quella del Bactucide P.

SUMMARY

Survival of Bacillus thuringiensis Berl. var. Kurstaki on grapes attacked by Lobesia botrana, in Tuscany.

The results of trials carried out during 1989 in Tuscany to test the

Lavoro eseguito nell'ambito della ricerca sull'impiego dei presidi sanitari della Regione Toscana.

persistence and effectiveness of two commercial preparations of Bacillus thuringiensis var. Kurstaki (Bactucide P and Thuricide HP) against 2nd generation larvae of Lobesia botrana are referred. Bacteria were applied as aqueous suspensions of wettable powders (100 g/100 l) plus copper oxychloride (500 g/100 l) and sulphur (300 g/100 l) to grapevines cv Sangiovese. Leaves and berries were sampled periodically to determine survival of applied bacteria and infestation of L. botrana.

Recoverable populations of B. thuringiensis in both bacterial treatments were high within 8 days following the distribution, then bacteria sharply declined. However, a great number of viable spores were recovered from leaves and, especially, from berries 6 weeks after the treatment. In general, greater persistence was observed for Thuricide HP.

With regard to the larvae of L. botrana a satisfactory action of Thuricide HP was recorded, while the effectiveness of Bactucide P appeared less evident.

Tra i fitofagi più pericolosi della vite un ruolo di primaria importanza è senz'altro rivestito dalle Tignole: Eupoecilia ambiguella (Hb.) e Lobesia botrana (Den. et Schiff.). Questi due lepidotteri sono ampiamente distribuiti nelle diverse regioni italiane e, con l'eccezione di alcune zone collinari del Nord Italia dove E. ambiguella fa registrare pericolose infestazioni, la specie dominante è senza dubbio L. botrana la cui dannosità è anche legata a possibili attacchi di Botrytis cinerea Pers.

Nella lotta contro la "Tignoletta della vite" da tempo si impiegano preparati a base di Bacillus thuringiensis Berl. Tuttavia, dalle notizie riportate in letteratura, ancora limitate appaiono le informazioni sulla vitalità del batterio in natura. Infatti, alle numerose esperienze pratiche effettuate sull'uso di B. thuringiensis nel controllo di fitofagi dannosi a piante agrarie e forestali (si ricordano, tra gli altri, i contributi di De Bellis e Cavalcaselle, 1967; Ronchetti, 1973; Celli et al.,

1975 e 1980; Tranfaglia e Viggiani, 1976 e 1981; Triggiani, 1979; Niccoli e Tiberi, 1985), non corrisponde una adeguata informazione sulla sopravvivenza e sulla vitalità delle spore del batterio dopo la distribuzione in natura (Triggiani e Sidor, 1982; Niccoli e Pelagatti, 1986).

Le notizie riferite nella presente nota costituiscono un primo contributo di una più ampia indagine sulla valutazione dell'efficacia di metodi di lotta basati sulla utilizzazione di microrganismi e di feromoni sessuali contro i principali fitofagi della vite. In particolare, gli Autori discutono i risultati ottenuti nel corso di osservazioni effettuate nel 1989 sulla sopravvivenza delle spore di B.thuringiensis su acini e foglie di vite e sulle modificazioni indotte nell'andamento delle infestazioni di L.botrana, nella seconda generazione, in seguito alla morte delle larve causata dal batterio.

MATERIALE E METODI

Le osservazioni sono state svolte in un vigneto di circa 5 ettari di estensione, compreso in una più vasta area viticola ubicata nelle vicinanze di Firenze, a circa 60 metri di altitudine. Le cultivar presenti erano, in ordine di importanza, Sangiovese, Trebbiano, Malvasia e Canaiolo.

In questa zona la "Tignoletta" causa, ormai da tempo, danni di rilievo con perdite sensibili di prodotto, tanto che negli ultimi anni i viticoltori hanno fatto ricorso, in maniera crescente, alla lotta con insetticidi chimici seguendo uno schema d'intervento a "calendario". Solo alcuni imprenditori agricoli hanno adottato e applicato le innovazioni emerse nel settore fitosanitario, soprattutto se basate sui principi della lotta integrata.

In questa nota si riferisce sulle osservazioni svolte in due parcelle di circa 1 ettaro, trattate con due diversi formulati commerciali di B.thuringiensis: Bactucide P (Bacillus thuringiensis var. Kurstaki, sierotipo H-3A3B, 16000 U.T.I./mg di formulato) e Thuricide HP (stesse caratteristiche del Bactucide).

I due preparati, entrambi in polvere bagnabile, sono stati impiegati alla

dose di 100g/hl con l'aggiunta di un adesivante (50g/hl) e dei classici anticrittogamici utilizzati per il controllo delle infezioni di peronospora e del mal bianco: ossicloruro di rame e zolfo bagnabile (500 g e 300 g per ettolitro di acqua, rispettivamente). Una terza parcella, di più limitata estensione ma rappresentativa della promiscuità delle varietà presenti nel vigneto, tenuta come testimone, è stata irrorata con acqua.

Il 6 luglio 1989, subito dopo il picco massimo delle catture nelle trappole a feromone, collocate a dimora già nella primavera precedente, è stato effettuato il trattamento, utilizzando le attrezzature in dotazione all'azienda (*).

I rilievi successivi relativi alle infestazioni di Lobesia e alla vitalità del Bacillus hanno riguardato la cv Sangiovese, in quanto la più rappresentata in ciascuna parcella.

Rilievo delle infestazioni di Lobesia botrana

Il giorno precedente l'intervento è stato effettuato un controllo per verificare il livello dell'infestazione della "Tignoletta" esaminando 60 viti, scelte a caso: 20 per ciascuna parcella. In questi rilievi si è tenuto conto dei "nidi larvali" e della natura del danno a carico degli acini ancora nelle prime fasi di accrescimento.

A partire dal 10 luglio, cioè dopo 4 giorni dal trattamento, si sono susseguiti 5 controlli: 4 nello stesso mese di luglio (10, 14, 20 e 28) e l'ultimo il 4 agosto.

In occasione di ciascun controllo venivano scelte a caso 40 viti per parcella e su queste si esaminavano tutti i grappoli, individuando quelli infestati dal tortricide. A questo esame in campo ne seguiva un altro in labora-

(*) Si ringrazia vivamente il Signor Adorni, proprietario dell'azienda, per la cortese accoglienza e la costante collaborazione nelle operazioni di campo.

torio su campioni di grappoli, scelti fra quelli attaccati di ogni parcella, sui quali si verificava allo stereoscopio la presenza e la fase di sviluppo delle larve vive, nonché il numero di quelle morte. Inoltre sugli stessi grappoli si controllava il numero medio degli acini danneggiati.

Nella valutazione del livello d'infestazione sono stati sempre esclusi tutti i grappoli in cui l'attacco di Lobesia si arrestava alla fase iniziale e gli acini riuscivano, durante la crescita, a cicatrizzare i tentativi di penetrazione delle larve.

Rilievo delle popolazioni batteriche

Il controllo del numero delle spore vitali di Bacillus thuringiensis è stato effettuato subito dopo che la sospensione distribuita era asciugata e poi a distanza di 1, 4, 6, 8, 11 e 14 giorni dal trattamento.

In ciascuno di questi sopralluoghi sono stati prelevati da 3 viti di ogni parcella, scelte sempre a caso, e poi immediatamente trasportate in laboratorio, 10 foglie e 3 grappoli. Sei campioni di 12 acini e sei di 10 pezzi di foglia di circa 2x2 cm (mediamente 80 cm² complessivi, considerando sia la superficie inferiore che quella superiore), sono stati ripartiti in beute sterili contenenti 10 ml di tampone fosfato 10 mM a pH 6,8 e lo 0,1% di sodio docecilsolfato. Con le sospensioni batteriche ottenute dopo 30 minuti di agitazione sono state preparate serie di diluizioni decimali. Aliquote di 0,1 ml di ciascuna di esse sono state distribuite sulla superficie di piastre Petri, contenenti 20 ml di substrato B di King et al (1954) modificato con l'aggiunta di actidione (70 mg/l). Le piastre sono state collocate in termostato a 27°C e dopo 48 ore si è proceduto al conteggio delle colonie di B. thuringiensis nel frattempo accresciutesi. Il numero dei batteri è stato riferito a 1 g di peso fresco (acini) o a 1 cm² (foglie).

RISULTATI

Efficacia dei due prodotti nei confronti delle larve di Lobesia botrana

Nonostante il modesto numero di individui di prima generazione catturati nelle trappole a feromone (il valore medio più elevato, per giorno e per trappola, registrato agli inizi di luglio, era di 11 esemplari), l'infestazione di Lobesia nella seconda generazione è apparsa piuttosto intensa (Tab. 1)

Tabella 1 - Percentuali dei grappoli infestati riscontrate nei 5 controlli post-trattamento

Data dei controlli	Percentuali di grappoli con larve vive		
	Bactucide P	Thuricide HP	Testimone
10 luglio	25,0	19,3	27,2
14 "	31,25	26,6	39,3
20 "	31,50	18,4	43,6
28 "	29,5	11,2	56,8
4 agosto	38,3	13,4	58,4

Le percentuali d'infestazione riscontrate nei 5 controlli post-trattamento oscillano intorno a valori ben lontani dalla soglia di tolleranza che prevede un limite massimo di grappoli con larve vive del 10% (Viggiani e Tranfaglia, 1975).

I due preparati a base di Bacillus thuringiensis utilizzati nella prova, hanno mostrato una diversa efficacia nel ridurre il livello d'attacco, inteso come percentuale di grappoli con larve vive.

Il Bactucide P, se messo a confronto con il testimone, si è dimostrato capace di ostacolare lo sviluppo dell'infestazione, senza però determinare nel tempo una soddisfacente riduzione dei danni, cosa che invece si è verificata nella parcella trattata con Thuricide. Infatti da un livello di infestazione pre-trattamento del 17,6% si è passati, in occasione del primo

controllo, quello del 10 luglio, al 25% e poi ancora in maniera progressiva fino al 38,3% nel controllo del 4 agosto. Di contro, nella parcella trattata con Thuricide HP a un primo periodo in cui si registra una crescita della percentuale di grappoli infestati, segue una successiva fase (ultimi 3 controlli) in cui l'infestazione, intesa sempre come grappoli con larve vive, si riduce sensibilmente fino a sfiorare negli ultimi due rilievi quel livello del 10% che, come riferito, costituisce il limite massimo tollerabile.

Nella parcella testimone invece, cosa tra l'altro attendibile, l'incidenza dei grappoli attaccati è cresciuta in maniera progressiva e in occasione dell'ultimo controllo ha toccato il livello del 58,4%.

Vitalità delle spore di *Bacillus thuringiensis*

La presenza di *B.thuringiensis* è stata rilevata sia sugli acini che sulle foglie in tutti i rilievi effettuati. In generale l'andamento delle popolazioni del batterio si è mantenuto entro l'intervallo di un ciclo logaritmico per circa 8 giorni per poi subire un graduale declino. Il comportamento dei batteri presenti in ciascuno dei due formulati è apparso sostanzialmente analogo sia sugli acini che sulle foglie, mentre leggermente diverso è risultato l'andamento del sierotipo H-3A3B in Bactucide P rispetto allo stesso sierotipo in Thuricide HP (d'ora in avanti, per comodità di esposizione, indicheremo i batteri presenti nei due formulati, rispettivamente con le sigle BH-3A3B e TH-3A3B) (Tab.2).

Tabella 2 - Percentuale di spore di *Bacillus thuringiensis* sopravvissute sulle foglie e sugli acini dopo 8 e 14 giorni dal trattamento*

Tesi	Bactucide P	Thuricide HP
Acini: 8 gg	24,7	91,2
14 gg	2,3	4,7
Foglie: 8 gg	21,3	19,7
14 gg	0,56	0,34

* La percentuale di sopravvivenza è stata calcolata dividendo il numero di batteri isolati 8 e 14 giorni dopo il trattamento per il numero di batteri isolati subito dopo il trattamento e moltiplicando per 100.

Sugli acini il numero delle spore BH-3A3B non ha subito modificazioni nelle prime 24 ore dal trattamento; è diminuito dal 1° al 4° giorno (da $1,7 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^3/g$) ed è in seguito aumentato. Si è mantenuto pressochè costante fino all'11° giorno ed è tornato poi a diminuire ($3,5 \times 10^2/g$ alla fine della prova). Sulle foglie H-3A3B è subito diminuito da $4,5 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^3$ spore/cm², dopo 24 ore, e a $7,1 \times 10^2$ il 4° giorno.

E' quindi aumentato leggermente dal 6° all'8° giorno ed è tornato a diminuire dall'8° al 14° giorno attestandosi su valori di $2,5 \times 10^2$ spore/cm².

TH-3A3B si è invece mantenuto pressochè costante durante i primi 8 giorni dalla prova (solo sulle foglie si è osservata una netta diminuzione nelle prime 24 ore). E' poi diminuito fino a circa $1,6 \times 10^3$ spore/g di acino e $2,4 \times 10^2/cm^2$ di foglia.

Successivamente, dal 14° giorno e fino a 36 giorni dopo il trattamento, si è continuato a rilevare, a intervalli di 4 - 5 giorni, la presenza di spore vitali di Bacillus thuringiensis semplicemente imprimendo pezzi di foglia sulla superficie del substrato B di King o lasciandovi "rotolare" per 2-3 minuti 4-5 acini. In tutti i casi è stata rilevata la presenza del batterio e anche l'ultimo rilievo, effettuato l'11 agosto, ha indicato l'abbondante presenza di B.thuringiensis sulle foglie e, soprattutto, sugli acini.

CONCLUSIONI

L'adeguata valutazione del potenziale impiego di un microrganismo antagonista nella lotta contro "agenti di malattia", crittogame o insetti, comporta sempre il rilevamento, durante gli esperimenti, delle popolazioni applicate in campo. Tali rilievi, oltre a fornire informazioni sulla persistenza del microrganismo somministrato, consentono di valutare l'efficacia di formulati commerciali diversi ed eventualmente di ottimizzare le modalità di somministrazione al fine di ottenere una migliore e più duratura copertura delle piante da proteggere. I risultati degli esperimenti qui descritti indicano

(anche se il semplice conteggio delle cellule batteriche vive non è indicativo dell'efficacia di un preparato) che, nelle condizioni adottate, un numero significativamente elevato di spore di B.thuringiensis si mantiene vitale sulle foglie e, soprattutto, sugli acini di vite della cv Sangiovese per almeno una settimana. A ciò è corrisposto, almeno quando si è impiegato il Thuricide HP, un efficace contenimento della popolazione larvale di Lobesia botrana. Infatti il livello dell'infestazione dopo un primo, ma contenuto, incremento è diminuito progressivamente nel tempo, fino ad attestarsi su valori di poco superiori al limite massimo di tolleranza. Bactucide P, invece, pur dimostrando una soddisfacente capacità nel contenimento dell'attacco di Lobesia, se raffrontato con quello registrato nella parcella testimone, non ha impedito che questo crescesse nel periodo successivo al trattamento.

I risultati ottenuti sulla persistenza delle spore di B.thuringiensis contrastano, in parte, con i dati riportati in letteratura. Al momento possiamo avanzare due ipotesi esplicative: i) il ricco apparato fogliare delle piante ha protetto i grappoli, dove la persistenza delle spore batteriche è apparsa maggiore, dall'azione inattivante dei raggi ultravioletti; ii) l'aggiunta di rame e zolfo alla sospensione distribuita in campo ha forse favorito la sopravvivenza del batterio eliminando eventuali microrganismi antagonisti preesistenti. Questi dati comunque, pur con le necessarie verifiche che richiedono, suggeriscono la possibilità di allungare il tempo di sopravvivenza in campo di B.thuringiensis agendo sulle modalità di somministrazione e sulla formulazione dei preparati commerciali.

Circa la diversa efficacia sulle larve di Lobesia dei due preparati, non disponiamo per il momento di sufficienti elementi per individuare quale o quali fattori possono aver influito in maniera differente sulla loro attività, visto che entrambi contenevano lo stesso sierotipo batterico (H-3A3B) e che sono state adottate le medesime metodologie di applicazione.

BIBLIOGRAFIA

CELLI G., R. BARBIERI e C. CASARINI, 1975. Risultati dell'impiego di un preparato a base di Bacillus thuringiensis Berliner contro la Lobesia botrana Schiff (Lepidoptera, Tortricidae). Atti Giornate Fitopatologiche 1975: 335-339

CELLI G., C. CASARINI, R. BARBIERI e R. BECCHI, 1980. Risultati di trattamenti con preparati a base di Bacillus thuringiensis contro Lobesia botrana Schiff (Lepidoptera, Tortricidae) nel modenese in rapporto al rilievo feromonico e al danno. Atti Giornate Fitopatologiche 1980: 431-439

DE BELLIS E. e B. CAVALCASELLE, 1967. La lotta contro la Processionaria del pino (Thaumetopoea pitycampi Schiff) mediante l'uso del Bacillus thuringiensis Berliner. Cellulosa e Carta, 18 (2): 1-6

KING E.O., M.K. WARD, E.D. RANEY, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med., 44:301-307

NICCOLI A., R. TIBERI, 1985. Impiego di Bacillus thuringiensis Berliner nel controllo di insetti dannosi in ambienti agrari e forestali. Redia, LXVIII: 305-322

NICCOLI A., O. PELAGATTI, 1986. Persistenza di prodotti a base di Bacillus thuringiensis Berl. impiegati nel controllo di alcune specie di lepidotteri. Redia, LXIX: 329-339

RONCHETTI G., 1973. Prove di lotta microbiologica con Bacillus thuringiensis Berliner contro la Processionaria del pino (Thaumetopoea pitycampi Schiff) in provincia di Pavia. Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Museo civ. Storia nat. Milano, 114 (4): 511-527

TRANFAGLIA A., G. VIGGIANI, 1976. Osservazioni sui voli di Lobesia botrana Schiff (Lep. Tortricidae) con trappole a feromone sessuale sintetico e prove di lotta. Boll. Lab. Ent. Agr. Portici, 33: 259-264

TRANFAGLIA A., G. VIGGIANI, 1981. I problemi di lotta integrata in viticoltura in Italia. Boll. Zool. agr. Bach., Ser. II, 16: 85-89

TRIGGIANI O., 1979. Preliminari prove di lotta con il Bacillus thuringiensis Berl. e Borrelinavirus reprimens contro larve della Porthetria (Lymantria) dispar L. (Lep.: Lymantriidae) sul fragno (Quercus trojana Webb). Entomologica, XV:103-113

TRIGGIANI O., C. SIDOR, 1982. Prove di controllo microbiologico della Processionaria del pino (Thaumetopoea pitycampi Schiff, Lep. Thaumetopoeidae) nelle pinete in Puglia. Entomologica, XVII: 91-102

VIGGIANI G., A. TRANFAGLIA, 1975. Prove orientative di lotta contro la Tignola della vite (Lobesia botrana Schiff) in Campania. Boll. Lab. Ent. Agr. Portici, 32: 140-144