

EFFICACIA E PERSISTENZA D'AZIONE DI MVP 84860, BIOINSETTICIDA PER LA LOTTA A Lobesia botrana Den.& Schiff.

IORIATTI C., FORTI D., DELAITI M., DELAITI L.

Istituto Agrario - 38010 S.Michele all'Adige (TN).

RIASSUNTO

MVP 84860 è un prodotto della Mycogen Corporation ottenuto attraverso un sistema di incapsulamento biologico dell'endotossina di Bacillus thuringiensis.

Con questo lavoro si è inteso studiare l'efficacia e la persistenza d'azione su L. botrana. Lo studio in laboratorio dell'efficacia di diversi dosaggi di principio attivo e di zucchero ha consentito di mettere a punto le ottimali modalità per l'esecuzione del trattamento.

Le prove di campo sono state realizzate sulla varietà "Chardonnay". I dosaggi di 200 e 400 cc/hl distribuiti in una e due applicazioni sono stati messi a confronto con l'unica applicazione di chlorpyrifos-m. I risultati (85-95% di efficacia) hanno confermato l'elevata attività del prodotto e l'interessante persistenza d'azione.

Summary

Efficacy and residual activity of MVP 84860, a bioinsecticide for the control of Lobesia botrana Den. & Schiff.: MVP 84860 is a novel formulation developed by Mycogen Corporation; dead bacterial cell wall of Pseudomonas fluorescens serves as a biological microcapsule which protects fragile Bacillus thuringiensis protein biotoxin.

Two-years trials have been carried out in laboratory to study the efficacy and the residual activity on grape vine moth (Lobesia botrana); four dosages of MVP 84860 (100, 200, 400 and 800 cc/hl) and three different amount of sugar has been evaluated.

A field trial has been carried out on "Chardonnay". Dosages of 200 and 400 cc/hl, treated either once or twice has been compared with one treatment of chlorpyrifos-m. Results (85-95% of efficacy) confirm the high activity and long persistence of MVP 84860.

INTRODUZIONE

Il *Bacillus thuringiensis* è un batterio sporigeno, Gram positivo, conosciuto per la sua capacità di produrre, durante la fase di sporulazione, un cristallo parasporale di natura proteica. Dalla sua identificazione (Berliner, 1911) ad oggi oltre 40 sottospecie sono state identificate su base sierologica, biochimica e dell'attività insetticida (Deseö e Rovesti, 1992; Lambert e Peferoen, 1992). L'interesse per la difesa delle colture è legata alle proprietà del cristallo proteico, conosciuto come delta-endotossina, tossico per numerose specie di insetti appartenenti agli ordini dei Lepidotteri, Coleotteri, e Ditteri. Il cristallo ingerito dall'insetto, nell'ambiente ridotto ed alcalino dell'intestino, è dissolto in protossina, la quale è trasformata in tossina attiva dalle proteasi presenti nel succo intestinale (Jacquet *et al.*, 1987). L'utilizzazione di *B.thuringiensis* nella protezione delle colture, iniziata negli anni 20, ebbe un freno con l'avvento degli insetticidi di sintesi nel secondo dopoguerra. L'interesse per questo insetticida biologico riprese sul finire degli anni sessanta allorché diverse esperienze vennero condotte su insetti di interesse forestale, su fitofagi di orticole e delle colture erbacee. Di questi anni sono anche le prime esperienze d'uso di *B.thuringiensis* per il controllo di *Lobesia botrana* (Roehrich, 1968). Pur dimostrando la buona efficacia nel controllo della tignoletta, l'attività fu giudicata ancora insufficiente. La scoperta di nuovi ceppi, il miglioramento e la standardizzazione delle formulazioni, l'aggiunta di sostanze edulcoranti hanno in seguito consentito di incrementare notevolmente l'efficacia (Schmid e Antonin, 1977; Celli *et al.*, 1985; Dalla Montà, *et al.*, 1986; Barbieri *et al.*, 1988; Forti *et al.*, 1988; Charmillot, 1991 e 1992) tanto da venir indicato come una reale e valida alternativa ai prodotti chimici nel controllo di *L. botrana* almeno nelle varietà a grappolo spargolo. Tuttavia, nonostante le sue innegabili qualità, il *B.thuringiensis* soffre di alcune debolezze che ne limitano il suo successo. Dal punto di vista pratico, la limitata persistenza d'azione è spesso indicata quale principale limite ad una sua utilizzazione generalizzata: la necessità di ripetere che ne consegue il trattamento, infatti, ne pregiudica l'economicità di impiego.

Scopo di questo lavoro è di valutare l'efficacia e la persistenza d'azione di MVP-84860, un nuovo prodotto costituito dalla endotossina di *B.thuringiensis* microincapsulata biologicamente, del quale era già stata rilevata l'interessante attività su tignoletta (Ioriatti, 1992)

MATERIALI E METODI

Prodotti. CellCap™ o MVP-84860 (10% M/M), messo a disposizione dalla Shell, è un prodotto ottenuto attraverso un sistema di incapsulamento sviluppato dalla Mycogen. Il gene responsabile per la produzione della endotossina di *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* è trasferito nelle cellule di *Pseudomonas fluorescens*. Le cellule di *P.fluorescens* così modificate, moltiplicate in fermentatori, producono l'endotossina proteica tipica di *B.thuringiensis*. Mentre le cellule di *B.thuringiensis* alla fine del loro ciclo scoppiano liberando nel mezzo di coltura i cristalli nudi e le spore, le cellule ingegnerizzate di *P.fluorescens* rimangono intatte; ancora nel recipiente di fermentazione vengono sottoposte a trattamenti chimici e termici che le inattivano e che determinano un ispessimento della parete cellulare. La rigida parete delle cellule morte di *P.fluorescens* viene quindi a costituire una sorta di microcapsula biologica che avvolge la endotossina di *B.thuringiensis* proteggendola dalla degradazione ambientale (Gelernter, 1990).

Dosaggi e zucchero. Nel primo anno di sperimentazione si sono trattate delle parcelle di "Chardonnay" con 4 dosaggi di MVP-84860: 100, 200, 400, e 800 cc/hl. I trattamenti sono stati eseguiti l'11 luglio 1991.

Nel 1992 si sono invece volute verificare le variazioni dell'efficacia dei trattamenti conseguenti all'aggiunta di zucchero. A ciascuno dei 4 dosaggi provati negli anni precedenti è stato quindi aggiunto 1 kg di zucchero (ERIDANIA). Si è voluto inoltre valutare l'efficacia di MVP-84860 a 400 cc/hl addizionato di 3 diversi quantitativi di zucchero: 0,25, 0,5 e 1 Kg. I trattamenti sono stati effettuati il 9 luglio sempre su "Chardonnay". In entrambi gli anni la distribuzione del formulato è stata realizzata con lancia a mano.

Efficacia e persistenza. La metodologia seguita per la valutazione dell'efficacia e della persistenza d'azione è stata quella proposta da Charmillot (1991). Dalle viti trattate sono stati prelevati degli acini, i quali, portati in laboratorio sono stati collocati, a gruppi di tre, in una provetta di vetro. Nelle provette è stata quindi introdotta, con l'ausilio di un pennellino, una larva di L. botrana. Le larve provenivano dall'allevamento permanente presente all'Istituto Agrario ed avevano una capsula cefalica di 300-400 μ . Sono stati così preparati 3 lotti da 20 larve (30 per l'esperienza con lo zucchero) per ogni tesi e data di prelievo. Un uguale numero di larve è stato collocato su acini non trattati quale testimone. Le provette sono state quindi riposte in un armadio climatico a 25 °C, 70% U.R. e 17 h di luce; dopo 12 giorni si è eseguito il controllo della mortalità. I dati relativi ai diversi dosaggi sono stati corretti in ragione della % di sopravvivenza nel testimone (Abbott, 1925).

Tutte queste operazioni sono state eseguite il giorno del trattamento e ripetute settimanalmente per tre settimane.

Prova di campo. Sulla base dei risultati delle prove di laboratorio si è impostata una prova di pieno campo in cui si sono messi a confronto due diversi dosaggi, 200 e 400 cc/hl, in una o due applicazioni. I trattamenti sono stati eseguiti sempre con l'aggiunta di 500 g di zucchero.

L'efficacia è stata calcolata in rapporto ad un testimone non trattato e comparata con quella di chlorpyrifos-methyl in una singola applicazione a 200 cc/hl. Tutte le 6 tesi presenti sono state ripetute tre volte su parcelle di 500 m² di "Chardonnay" allevato a pergola singola. Scegliendo questo vitigno si è volontariamente deciso di operare nelle condizioni più difficili per via della compattezza del grappolo e della conseguente difficoltà di copertura.

Il primo trattamento è stato eseguito il 29 giugno in concomitanza con il rilevamento delle prime uova schiuse; la ripetizione del trattamento sulle tesi che la prevedevano è stata eseguita il 5 luglio. Infine il 6 luglio si sono trattate le tre parcelle con chlorpyrifos-m. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti con atomizzatore utilizzando 15 hl/ha di miscela. L'attività dei prodotti è stata valutata controllando 100 grappoli per parcella durante la prima settimana di agosto. I valori relativi al numero di larve vive per 100 grappoli sono stati sottoposti all'analisi della varianza dopo loro normalizzazione mediante trasformazione logaritmica.

Dalla tesi trattata due volte con 200 cc/hl si sono periodicamente prelevati degli acini per valutare, secondo la metodologia sopra descritta, la persistenza del prodotto; la valutazione è stata effettuata utilizzando 90 larve per data (30 per ripetizione).

Parametri misurati in campagna. Durante il periodo di realizzazione della prova si sono registrati i dati meteorologici relativi a temperatura e precipitazioni nonché l'accrescimento della superficie dell'acino. Nell'esecuzione della prova di campo una trappola a feromoni ha

consentito di rilevare il volo degli adulti, mentre un controllo periodico dell'ovideposizione ha permesso di rilevarne la progressiva schiusa.

RISULTATI

Attività e persistenza. Il primo anno di sperimentazione l'attività iniziale di MVP-84860 a 800 cc/hl è stata dell'ordine del 90% (fig.1). L'efficacia del prodotto a questo dosaggio rimane elevata durante le prime due settimane facendo registrare un'efficacia del 70% dopo 14 giorni dal trattamento. Rapida invece la perdita di efficacia durante la terza settimana. Per quanto riguarda gli altri dosaggi e' evidente un graduale calo di efficacia al diminuire della dose di prodotto.

L'aggiunta di zucchero apportata nella prova del secondo anno non ha modificato i risultati (fig.2). Se si esclude un leggero aumento di attività iniziale registrato per i due dosaggi più elevati, i risultati ottenuti riproducono assai fedelmente quanto riscontrato nel primo anno di prova.

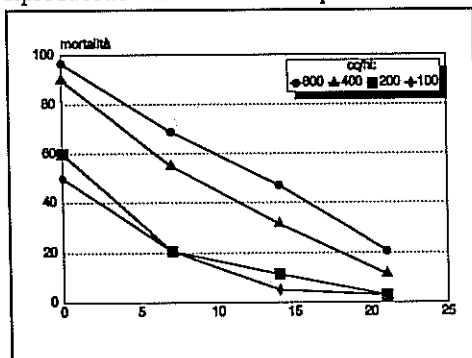


Figura 2: Persistenza d'azione dei dosaggi provati con l'aggiunta di 1000 gr/hl di zucchero nell'anno 1992.

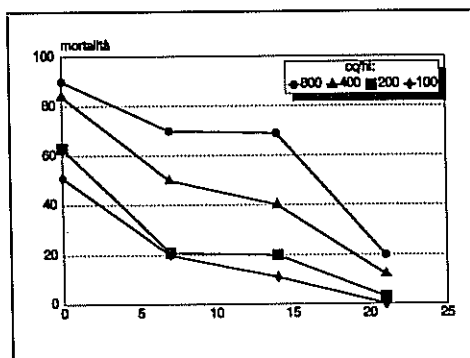


Figura 1: Persistenza d'azione dei quattro dosaggi provati nell'anno 1991.

Nella esperienza in cui la dose di 400 è stata addizionata di 3 diversi quantitativi di zucchero (fig.3) si è comunque riscontrata una differenza nell'efficacia e nella persistenza di attività a significare che anche nel caso di MVP-84860 l'edulcorazione apporta dei benefici. L'assenza quindi di rilevanti differenze nelle prove con e senza edulcorante è probabilmente da attribuirsi non tanto a differenze climatiche quanto piuttosto alla variabilità di bagnatura che può essere intervenuta facendo uso della lancia a mano.

Prova di campo. Il volo di tignoletta rilevata con trappola a feromone è iniziato l'11 giugno e si è protratto per circa 1 mese (fig.4). Nella stessa figura è riportato l'andamento della schiusa delle uova, sui cui valori si è basata la scelta dei momenti di intervento; la schiusa è iniziata il 28 giugno e si è conclusa dopo 15 giorni, il 13 luglio.

In tabella è riportata l'efficacia dei diversi dosaggi di MVP-84860 ottenuta rapportando il grado di attacco con quello del testimone non trattato (0,97 larve vive per grappolo). Da ciò si evince che anche le due applicazioni eseguite a 200 cc/hl hanno dato risultati pienamente soddisfacenti (93,81%) e praticamente comparabili con quelli del test aziendale (94,1%). Benché il risultato migliore sia stato ottenuto là dove si è ripetuto il trattamento a 400 cc/hl (95,36%), interessante è risultata anche l'efficacia di un'unico intervento (90,72%).

I risultati dell'analisi della varianza, eseguita sui valori relativi alle larve vive, risultano altamente significativi ($P < 0,001$).

Il testimone non trattato presenta un attacco di quasi una larva per grappolo (0,97) e differisce in maniera altamente significativa da tutte le tesi trattate. Relativamente a queste ultime, il test di Duncan mette in evidenza differenze altamente significative fra il trattamento singolo a 200 cc/hl e le due tesi con doppio intervento (2x200, 2x400) e quella trattata con chlorpyrifos-m. Non c'è differenza significativa fra le due tesi trattate una sola volta, ma nemmeno fra il singolo trattamento a 400 cc/hl e le rimanenti tesi trattate.

Per meglio comprendere le modalità d'azione dei prodotti sono stati presentati in tabella anche i valori relativi alle larve morte, al numero di acini danneggiati e all'efficacia calcolata sia sul totale degli acini danneggiati sia, in maniera più consueta, sul numero di larve sopravvissute al trattamento.

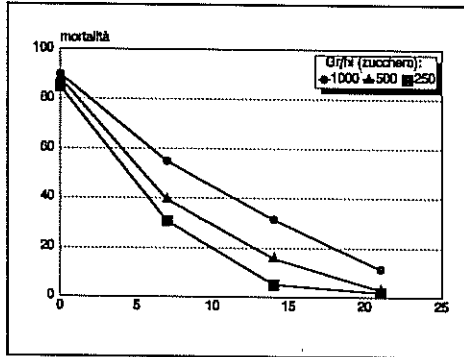


Figura 3: Persistenza di MVP 84860 utilizzato a 400 cc/hl con l'aggiunta di tre diversi dosaggi di zucchero.

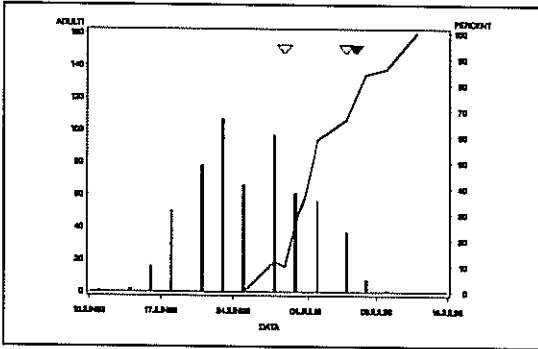


Figura 4: Volo di *L. botrana* (istogrammi) e schiusa delle uova (spezzata). (▽ trat. MVP, ▼ trat. estere).

numero di acini danneggiati.

I dati della prova di persistenza sono presentati nella figura 5. L'efficacia iniziale risulta piuttosto bassa in occasione della prima applicazione, ma prontamente si innalza dopo il secondo intervento rimanendo su valori superiori al 70-80%, per tutti i quindici giorni in cui si è verificata la schiusura delle uova.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Per poter meglio interpretare i risultati delle prove condotte in laboratorio e spiegare le differenze riscontrate nel confronto con i dati di campagna è necessario premettere alcune considerazioni.

Interessante è far notare che il trattamento con chlorpyrifos-m è stato in grado di colpire efficacemente anche le larve in attiva penetrazione che avevano già attaccato uno o talvolta anche due acini. Ciò è evidenziato dal notevole numero di larve morte presenti in confronto con le tesi trattate con *B.thuringiensis*. L'efficace attività curativa dell'estere fosforico non impedisce che rimangano evidenti i postumi del danno, questo aspetto è sintetizzato nel basso valore di efficacia qualora questa sia calcolata sulla base del

Innanzitutto MVP 84860 era un prodotto in fase di sviluppo probabilmente non ancora standardizzato per il mercato. Aggiustamenti nella formulazione, alla ricerca delle ottimali caratteristiche tecnico-commerciali, possono essere la causa di una certa variabilità dei risultati da un anno all'altro.

In secondo luogo il test scelto per la valutazione dell'attività di questi prodotti è molto severo in quanto vengono esposte le larve nelle migliori condizioni per causare il danno. Inoltre è da far rilevare che in queste prove, al fine di ridurre l'elevata mortalità naturale, si è fatto uso di larve al 2°-3° stadio; questo ha consentito di rendere più costanti i risultati, ma ha d'altra parte contribuito a diminuire l'attività dei prodotti saggiati. È infatti risaputo che l'attività di *B.thuringiensis* è più consistente su larve neonate rispetto a quelle più sviluppate.

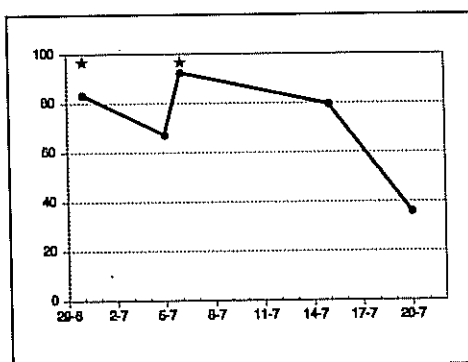


Figura 5: Decadimento dell'attività di MVP 84860 a 200 cc/hl più 500 gr/hl di zucchero, trattato due volte (*).

PRODOTTO E DOSE/HL (cc.)	DATA TRATT.	% GRAPPOLI COLPITI	ACINI COLPITI X 100 GRAPPOLI			% EFFICACIA		
			LARVE VIVE	LARVE MORTE	TOT. ACINI	DANNO	LARVE VIVE	
TESTIMONE	/	65	97	A	11.3	214	/	/
MVP-84860- 400	29-06	16	9	CB	9	26.3	87.71	90.72
MVP-84860 400	29-06/05-07	11	4.5	C	9.7	18	91.59	95.36
MVP-84860 200	29-06	23	14.7	B	12	43.6	79.63	84.85
MVP-84860 200	29-06/05-07	12.7	6	C	9	21	90.19	93.81
Reldan 22 Dow 200	06-07	35.7	5.7	C	45.7	73.6	65.61	94.12

Tabella 1: Risultati della prova di campo realizzata nel 1993. L'efficacia è stata valutata secondo la formula di Abbott (In Guignard *et al.*, 1984)

Infine, mentre nell'esecuzione delle prove di persistenza effettuate nel corso dei due primi anni il prodotto era stato distribuito con lancia a mano, nella prova di campo si è fatto uso dell'atomizzatore. L'uso della lancia impostoci dalla scarsa disponibilità di prodotto non ci ha consentito di realizzare quella ottimale distribuzione richiesta soprattutto quando si deve intervenire con prodotti biologici (Rovesti e Foschi, 1990). Ciononostante ci è stato possibile confermare sia l'interessante attività di MVP-84860 su *Lobesia botrana*, che il miglioramen-

to di efficacia conseguente all'edulcorazione. Questi dati preliminari uniti all'esperienza precedentemente maturata (Ioriatti, 1992) ci hanno consentito di scegliere opportunamente i dosaggi di principio attivo e di zucchero da verificare in campo.

Da quanto emerge dallo studio di efficacia realizzato in laboratorio, i 200 cc/hl hanno dimostrato un'attività iniziale attorno all'85% e una persistenza tale da assicurare, nelle condizioni di campo, un efficace controllo della tignoletta con due trattamenti. Pur non disponendo della curva di attività relativa ai 400 cc/hl, l'efficacia evidenziata nella prova di campo dal singolo trattamento è una dimostrazione della buona resistenza alla degradazione. Ne consegue che la persistenza di questo dosaggio si è estesa per lo meno per i 15 giorni durante i quali si è registrata la schiusura delle uova.

In conclusione la sperimentazione condotta in questi anni ha consentito di mettere a punto le ottimali modalità d'impiego di MVP-84860 nel controllo di L. botrana.

Nelle condizioni climatiche del Trentino, dove il volo della seconda generazione di tignoletta non si protrae in generale oltre le 4 settimane, due trattamenti con B. thuringiensis sono di solito consigliati per raggiungere risultati comparabili ad un trattamento con estere fosforico.

Lo stesso risultato è ottenibile con due interventi di MVP-84860 a 200 cc/hl più 500 g di zucchero. Data la elevata persistenza di questo formulato un solo trattamento a 400 cc/hl consente di ottenere risultati altrettanto soddisfacenti.

BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 165-267
- BARBIERI R., MALAVOLTA C., CAVALLINI G., GUARDIGNI P., PARI P. (1988). Efficacia di due formulati a base di Bacillus thuringiensis Berliner con e senza aggiunta di edulcoranti nella lotta contro la Lobesia botrana (Den & Schiff). Inf. Fitopat. 7-8: 59-62.
- BERLINER E. (1911). Über die Schlaffsuch der Mehlmotenraupe (Ephesia kuehniella Zell), und ihren Erregen Bacillus thuringiensis n. sp. Z. angew. Ent. 2: 29-56
- CELLI G., BARBIERI R., BECCHI R., POZZA M. (1985). La lotta microbiologica contro Lobesia botrana Den. & Schiff. mediante preparati a base di Bacillus thuringiensis Berliner. Un decennio di sperimentazione. La difesa delle piante; 2: 271-276.
- CHARMILLOT P.J., PASQUIER D., ANTONIN P. (1991). Efficacité et rémanence de quelques préparations à base de Bacillus thuringiensis (BT) dans la lutte contre les vers de la grappe eudémis et cochylis. Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic. 23: 187-194.
- CHARMILLOT P.J., PASQUIER D., ANTONIN P., MITTAZ C. (1992). Lutte contre les vers de la grappe eudémis au moyen de Bacillus thuringiensis (BT): résultats de 1991. Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic., 24: 109-116.
- DALLA MONTA' L., PAVAN F., DUSO C., (1986). Impiego di formulati diversi a base

di Bacillus thuringiensis Berl. nel controllo delle tignole della vite. Giornate Fitopatologiche 1: 53-62.

DESEÖ-KOVÁCS K.V., ROVESTI L. (1992). Lotta microbiologica contro i fitofagi; teoria e pratica. Edagricole Bologna, 300p.

FORTI D., IORIATTI C., MESCALCHIN E., MATTEDI L. (1988). Prove preliminari di efficacia di fenoxycarb, Bacillus thuringiensis e teflubenzuron impiegati nella difesa contro tignoletta della vite (Lobesia botrana Den & Schiff). Giornate Fitopatologiche, 2: 91-100.

GELERNTER W.D., 1990. Bacillus thuringiensis, bioengineering and the future of bioinsecticides. Proc. Brighton Crop Prot. Conf. 2: 617-624.

GUIGNARD E., ANTONIN Ph, BAILLOD M. (1984). Efficacité et effets secondaires des insecticides utilisés contre les vers de la grappe. Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic. 16: 338-346.

JAQUET F., HÜTTER R., LÜTHY P. (1987). Specificity of Bacillus thuringiensis Delta-Endotoxin. Appl. Environ. Microbiology: 500-504.

IORIATTI C. (1992). Etude en laboratoire de l'activité et de la rémanence de trois produits à base de Bacillus thuringiensis et d'une préparation contenant son endotoxine sur les larve de Lobesia botrana Den & Schiff. Bulletin OILB/SROP XV/2: 15.

LAMBERT B., PEFFEROEN M. (1992). Insecticidal promise of Bacillus thuringiensis; facts and mysteries about a successful biopesticide. Bioscience 42: 112-122.

ROEHRICH R. (1968). Essais sur la vigne de divers produits à base de Bacillus thuringiensis Berliner contre l'Eudémis de la vigne (Lobesia botrana). Rev. Zool. agric. 4-6: 63-67.

ROVESTI L., FOSCHI S. (1990). Applicazione dei preparati microbiologici contro gli insetti (I°). Inf. Fitopat. 4:11-20

SCHMID A., ANTONIN P. (1977). Bacillus thuringiensis dans la lutte contre les vers de la grappe, eudémis (Lobesia botrana) et cochyliis (Clysia ambiguella) en Suisse romande. Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic. 9: 119-126.