

OSSERVAZIONI SULLA TOSSICITÀ DEL *BACILLUS THURINGIENSIS* NEI CONFRONTI DI *CERATITIS CAPITATA* WIED. (DIPT. TEPHRITIDAE)

E. BAZZONI¹, G. DELRIO¹, S. RUBINO², A. SATTA³, R. PROTA¹

¹Istituto di Ricerca sul Controllo Biologico dell' Ambiente - CNR Sassari Italy -

²Istituto di Microbiologia e Virologia - Università di Sassari Italy -

³Istituto di Entomologia agraria - Università di Sassari Italy -

Riassunto

Al fine di indagare sull'attività insetticida del *Bacillus thuringiensis* nei confronti della *Ceratitis capitata* Wied., è stata condotta sul fitofago una serie di prove con isolati del batterio ottenuti da campioni di suolo prelevati in Sardegna (Italia), Angola e Zimbabwe.

Dai biosaggi effettuati è emerso che l'effetto tossico è correlato all'isolato e allo stadio dell'insetto. Le larve sono apparse più suscettibili degli adulti e l'effetto tossico è risultato dose-dipendente: impiegando $1,3 \times 10^{10}$ spore e cristalli per grammo di dieta si è ottenuta, in alcuni casi, una mortalità del 100%, mentre a dosi più basse è stata osservata una mortalità parziale e un notevole ritardo nello sviluppo. Sugli adulti, nettamente più resistenti delle larve, è stato raggiunto un tasso di mortalità del 40%. Qualche isolato di *Bt* ha mostrato un elevato grado di selettività, risultando efficace o solo sulle larve o solo sugli adulti.

Parole chiave: *Bacillus thuringiensis*, *Ceratitis capitata*, lotta microbiologica

Summary

Observations on *Bacillus thuringiensis* toxicity against *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt. Tephritidae).

In order to investigate insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* against *Ceratitis capitata* Wied., a series of bioassays with bacterial isolates obtained from samples of soil collected in Sardinia (Italy), Angola and Zimbabwe were carried out.

Bioassays effected showed toxicity was correlated to the isolates and to the insect life stage. The larvae were more susceptible than adults to the same *Bt* suspension and the effect was dose-dependent: in some cases, with $1,3 \times 10^{10}$ spores and crystals per gram of larval diet, 100% of mortality was reached, while a partial mortality and a considerable delay on larval development were obtained at lower doses. The adult fly showed a remarkable higher level of resistance compared to the larvae reaching a maximum peak of mortality of 40%. Some isolates of *Bt* were active only on larvae or on adults.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Ceratitis capitata*, microbiological control

Introduzione

La mosca mediterranea della frutta (*Ceratitis capitata* Wied.), Dittero Tefritide estremamente dannoso alla frutticoltura mondiale, manifesta nel nostro Paese una marcata pericolosità che deriva dall'alta polifagia e dall'elevato numero di generazioni annuali.

Le strategie di lotta chimica attualmente in uso prevedono l'impiego di insetticidi endoterapici distribuiti a tutta chioma (lotta curativa larvicida) oppure l'impiego di esche proteiche avvelenate con trattamenti localizzati (lotta preventiva adulticida). La lotta curativa, spesso associata ad un

uso improprio dei prodotti chimici, comporta una serie di effetti secondari di natura ecologica e tossicologica: distruzione di organismi utili, contaminazione ambientale (in relazione all'ampiezza delle aree trattate), rischi di residui tossici nei frutti. Effetti collaterali di natura ambientale sono segnalati anche con l'impiego di esche proteiche avvelenate, in particolare quando vengono irrorate con mezzo aereo (Ehler e Endicott, 1984; Ehler *et al.*, 1984; Gary e Mussen, 1984; Troetschler, 1984; Hoelmer e Dahlsten, 1993), benché questa tecnica consenta di ridurre notevolmente la quantità di insetticida distribuita per ettaro.

Una possibilità di lotta alternativa può essere rappresentata dall'impiego del *Bacillus thuringiensis*, agente microbiologico da tempo largamente impiegato a livello mondiale soprattutto contro larve di Lepidotteri, Ditteri Nematoceri e Coleotteri. Il batterio, come è noto, è in grado di produrre, durante la sporulazione, delle strutture cristalline di natura proteica (delta-endotossine) che dopo ingestione si dissolvono nell'intestino dell'insetto, danneggiando le cellule epiteliali delle specie suscettibili e determinando, dopo un rallentamento dell'attività trofica, la morte in tempi brevi. La selettività del microrganismo è una conseguenza del meccanismo di azione delle endotossine che risultano attive solo se nelle cellule intestinali sono presenti recettori altamente specifici (Knowles, 1994).

In considerazione delle scarse notizie presenti in letteratura sull'efficacia del *Bt* nei confronti dei Ditteri Tefritidi (Gingrich, 1987; Karamanlindou *et al.*, 1991) è stata avviata una ricerca mirata a stabilire la potenzialità insetticida del *Bt* nei confronti della mosca mediterranea della frutta e a valutare le possibilità d'impiego del batterio in luogo degli insetticidi usati in miscela con le esche proteiche.

A questo scopo sono stati saggati, su larve e adulti di una popolazione di laboratorio del fitofago, 58 isolati di *Bt* provenienti da campioni di suolo prelevati in Sardegna, Angola e Zimbabwe.

Materiali e metodi

Isolamento di *Bt*

L'isolamento del *Bt* dai campioni di suolo raccolti è stato effettuato secondo la metodologia di Ohba e Aizawa (1986). In breve, 1g di suolo, diluito in acqua sterile, è stato scaldato a 80°C per eliminare le forme vegetative; 3 diluizioni del supernatante (1:10, 1:100 e 1:1000) sono state seminate in piastre di Nutrient Agar all'1,4%. Dopo una prima selezione delle colonie, in base alla loro morfologia, l'identificazione degli isolati di *Bt* è stata effettuata attraverso l'osservazione delle spore e dei cristalli al microscopio ottico.

Produzione del materiale per i biosaggi

Una colonia di ogni singolo isolato è stata seminata in 100ml di Nutrient Broth in beute da 500ml che sono state mantenute in un agitatore termostato (30°C e 120 RPM) per 4 giorni. La sospensione ottenuta, formata per lo più da spore libere e cristalli, è stata centrifugata per 10 minuti a 10mila RPM: parte del supernatante è stato conservato per saggiare l'esotossina mentre il pellet, dopo lavaggio in acqua sterile, è stato diluito in acqua fino ad ottenere una sospensione con una concentrazione di 2×10^{10} spore e cristalli/ml, stabilita con conteggio alla camera di Thoma.

Allevamento di *Ceratitis capitata*

L'allevamento del fitofago è stato condotto in laboratorio su diete artificiali alla temperatura di 25°C (Cavalloro e Girolami, 1969). In queste condizioni la durata di sviluppo larvale era di 7-8 giorni e quella pupale di 10 giorni.

Biosaggi

Le prove di tossicità sugli adulti sono state effettuate su gruppi di 10 esemplari di 1 giorno di età, mantenuti in contenitori di plastica con coperchio trasparente e nutriti con lievito solido e una dieta liquida somministrata con capillari da 25 µl. Quest'ultima era costituita dalla sospensione di spore e cristalli o dal supernatante (e da acqua per il testimone) diluiti 1:1 con una soluzione acquosa al 60% di zucchero. Con la sostituzione giornaliera dei capillari, veniva rilevata la mortalità nel corso della settimana.

Per le prove sulle larve, 0,66 ml di sospensione di spore e cristalli (o di supernatante) sono stati aggiunti a 1 g di dieta larvale in piastre Petri contenenti 20 larve neonate. La mortalità è stata rilevata dopo 7 giorni e le larve mature sono state conservate per il controllo degli sfarfallamenti. In alcune prove il *Bt* è stato impiegato in dosi più basse in modo da osservare l'effetto sulla durata dello sviluppo e sulla crescita ponderale delle larve.

Tutte le prove sono state effettuate con 4 replicazioni (eccetto che per i supernatanti con 1 replicazione) e le percentuali di mortalità trasformate in arcsenradq sono state elaborate con l'analisi della varianza. Nelle tabelle i dati di mortalità sono stati corretti rispetto alla mortalità del testimone con la formula di Abbott (Abbott, 1925).

Risultati

Dei 58 isolati (25 sardi, 21 angolani e 12 dello Zimbabwe) saggiati sulla *Ceratitis capitata*, 19 (13 sardi, 3 dell' Angola e 3 dello Zimbabwe) hanno determinato sulle larve una mortalità statisticamente differente dal testimone e solamente 2 (entrambi sardi) sugli adulti (Tab. 1).

I tassi di mortalità riscontrati sulle larve sono risultati notevolmente variabili e 5 isolati, 4 sardi (ONF 5, MOR 1, SER 1 e SER 2) e uno dello Zimbabwe (ZIM 66), hanno causato il 100% di mortalità. Gli isolati di *Bt* più efficaci hanno determinato mortalità a partire dalle larve di prima età, mentre per quelli meno tossici un'attività parziale è stata osservata dalla seconda età.

Sugli adulti, nettamente più resistenti delle larve, è stata raggiunta una mortalità massima del 34,2% con l'isolato MOG 1.

Su questo stadio l'effetto è risultato evidente fin dai primi giorni ed è aumentato progressivamente fino al settimo giorno di vita (Fig. 1).

Impiegando sulle larve l'isolato MOR 1 in differenti dosi è stato osservato un prolungamento dello stadio larvale, che è passato dai 7 giorni del testimone (a 25 °C) ai 15 per le larve trattate (Tab. 2).

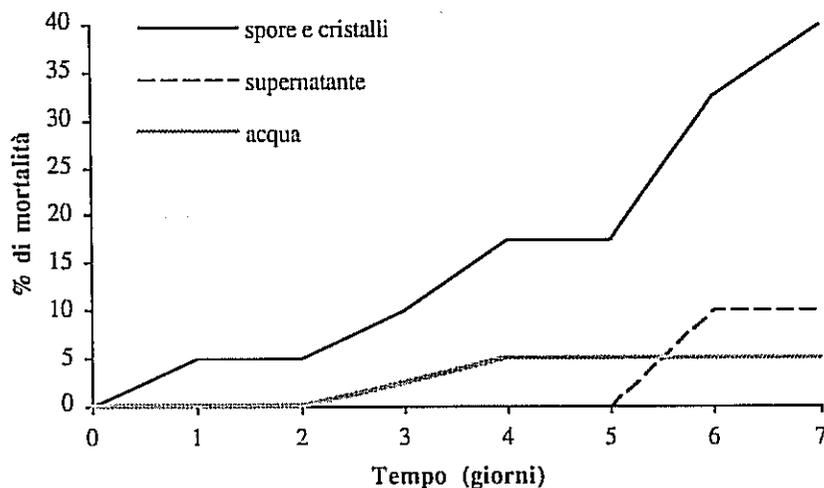


Fig. 1 - Tossicità di spore e cristalli e del supernatante dell'isolato di *Bacillus thuringiensis* MOG 1 su adulti di *Ceratitis capitata*.

Tab.1 - Tossicità di spore e cristalli di isolati di *Bacillus thuringiensis* su adulti e larve di *Ceratitis capitata*.

Isolati	Mortalità ^a larvale a 72h	Mortalità ^a adulti a 7 giorni	Isolati	Mortalità ^a larvale a 72h	Mortalità ^a adulti a 7 giorni
Isolati sardi					
SIN 2	0	10,0	FIL 1	66,0**	0
BOR 1	0	0	PAU 2	41,0*	5,8
DAC 1	56,8**	5,2	PAU 8	13,3	13,5
DAC 2	66,6**	10,5	PAU 9	0	7,9
ORL 1	85,7**	0	SAN 1	0	26,3
ORL 2	85,7**	6,6	MAR 1	11,1	7,9
ORL 6	65,7*	13,3	MOG 1	31,1	34,2*
ONF 1	38,0**	20,5	MOG 2	0	10,5
ONF 4	2,2	2,9	SER 1	100,0**	0
ONF 5	100,0**	0	SER 2	100,0**	2,7
ORS 1	31,8	0	SER 3	33,3	13,5*
VIL 2	9,1	17,6	DOL 1	52,9*	2,7
MOR 1	100,0**	5,8			
Isolati dell' Angola					
ANG 1	0	2,7	ANG 25	18,1	0
ANG 2	0	0	ANG 33	62,1**	0
ANG 5	15,7	0	ANG 37	25,7*	0
ANG 9	0	0	ANG 42	86,3**	0
ANG 11	0	0	ANG 44	12,1	0
ANG 13	0	0	ANG 45	16,6	0
ANG 14	0	0	ANG 46	4,5	0
ANG 17	0	2,7	ANG 50	0	11,1
ANG 18	0	24,3	ANG 51	0	8,3
ANG 21	1,5	0	ANG 53	0	19,4
ANG 22	12,1	0			
Isolati dello Zimbabwe					
ZIM 57	0	21,2	ZIM 65	98,3**	2,7
ZIM 58	0	6,0	ZIM 66	100,0**	8,3
ZIM 59	0	3,0	ZIM 67	5,0	8,3
ZIM 60	0	6,0	ZIM 69	19,2	19,4
ZIM 63	0	0	ZIM 70	23,2	0
ZIM 64	96,7**	5,7	ZIM 72	15,8	0

^a Corrette con la formula di Abbott (1925).

** Statisticamente differenti dal testimone ($p < 0,01$).

* Statisticamente differenti dal testimone ($p < 0,05$).

Inoltre, le larve mature del testimone hanno raggiunto al VII giorno un peso medio di 9 mg mentre nello stesso periodo quelle trattate hanno raggiunto pesi nettamente inferiori e inversamente proporzionali alle dosi impiegate. Alcune di queste larve hanno proseguito nello sviluppo non riuscendo comunque ad impuparsi o morendo prima dello sfarfallamento.

Tab. 2 - Effetti dell'isolato di *Bacillus thuringiensis* MOR 1 impiegato in 4 differenti dosi su larve di *Ceratitis capitata*..

Dose (in n° di cristalli e spore per g di dieta)	Peso medio delle larve al VII giorno (mg)	Età delle larve al VII giorno	Mortalità (%) al VII giorno	Giorni necessari per ultimare lo sviluppo	Sfarfallamento (%)
10 ¹⁰	0,2 ± 0,1	I e II	73	15	7,6
5x10 ⁹	0,7 ± 0,4	II e III	64	15	24,1
2,5x10 ⁹	2,1 ± 0,9	III	43	12	72,9
1,2x10 ⁹	7,6 ± 4,0	III	34	7	92,4
Testimone	9,1 ± 3,0	III	38	7	89,5

Dei complessivi 58 isolati di *Bt* è stato saggiato anche il rispettivo supernatante. Di questi, 20 hanno causato mortalità superiori al 30% (Tab. 3). Anche in questo caso lo stadio più suscettibile è risultato quello larvale sul quale, in ben 4 casi, sono state ottenute mortalità superiori al 90%. Sugli adulti invece è stata raggiunta una mortalità massima del 56,7%. La tossicità del supernatante non sempre è risultata correlata alla tossicità della corrispondente sospensione di spore e cristalli. Sulle larve per esempio, il supernatante dell'isolato MAR 1, le cui spore e cristalli hanno causato una mortalità (non significativa) dell'11,1%, è risultato uno dei più tossici con il 91,1% di mortalità.

Tab.3 - Tossicità dei supernatanti degli isolati di *Bacillus thuringiensis* che hanno causato mortalità superiori al 30% su adulti o larve di *Ceratitis capitata* (valori corretti con la formula di Abbott).

Isolati	Mortalità larvale a 72h	Mortalità adulti in 7 giorni	Isolati	Mortalità larvale a 72h	Mortalità adulti a 7 giorni
BOR 1	35,4	20,0	MAR 1	91,1	37,5
DAC 1	52,9	0	MOG 2	91,1	15,7
ORL 1	31,4	0	SER 1	52,9	2,7
ORL 2	94,2	0	SER 2	88,8	2,7
ONF 5	45,4	0	SER 3	31,3	0
ORS 1	54,5	0	DOL 1	31,3	0
VIL 2	63,6	5,8	AF 1	0	35,1
MOR 1	45,4	5,8	AF 5	15,7	56,7
PAU 8	90,9	36,8	AF 44	57,7	0
SAN 1	46,0	37,5	AF 46	33,3	0

Conclusioni

Le ricerche effettuate sulla tossicità di *Bacillus thuringiensis* nei confronti di *Ceratitis capitata* hanno dimostrato che è possibile trovare più isolati attivi sulle larve che sugli adulti.

Nel complesso gli isolati sardi hanno mostrato una maggiore efficacia di quelli dell'Angola e dello Zimbabwe.

La mortalità causata dai differenti isolati sulle larve del fitofago è stata quasi sempre più elevata rispetto agli adulti. Questo potrebbe essere spiegato tenendo presente che l'attivazione della delta-endotossina richiede l'azione di enzimi proteolitici (Fast, 1981) e un ambiente fortemente alcalino salvo alcune eccezioni (Knowles, 1994). Condizioni chimiche differenti nel lume intestinale dei due stadi dell'insetto (larva e adulto), possono giustificare pertanto la differente azione della delta-endotossina.

Inoltre, considerando il meccanismo di azione delle tossine prodotte da *Bt*, che per poter agire richiedono la presenza nelle cellule epiteliali del mesointestino di recettori altamente specifici, si può spiegare l'azione selettiva di alcuni isolati che sono risultati attivi solo sulle larve (la maggior parte) e degli isolati sardi MOG 1 e SER 3 che sono risultati attivi solo sugli adulti. In questi casi infatti è possibile ipotizzare la produzione di una o più tossine capaci di interagire con uno o più recettori specifici presenti esclusivamente nell'intestino dell'insetto adulto o della larva. Ne segue che i geni depositari dell'informazione per la sintesi della delta-endotossina, sono diversi per i diversi stadi di sviluppo dell'insetto. Quanto osservato è una conferma dell'elevato grado di selettività che può essere raggiunto con l'impiego di *Bacillus thuringiensis* nel controllo del fitofago, fatto di estrema importanza per la salvaguardia dell'entomofauna utile.

Allo stato attuale, la riscontrata attività insetticida di *Bt* nei confronti della mosca mediterranea della frutta non appare ancora sfruttabile, sia per le ovvie difficoltà di colpire le larve, ampiamente protette all'interno dei frutti nei quali si sviluppano, sia per il basso livello di mortalità osservato sugli adulti, insufficiente a consentire l'impiego del microrganismo come bioinsetticida in associazione alle esche proteiche.

Tuttavia è possibile che il proseguimento delle ricerche consenta di ritrovare isolati più efficaci su questo stadio, o che un elevato grado di efficacia possa essere raggiunto con l'impiego di miscele degli isolati più attivi.

Lavori citati

ABBOTT W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, (2), 265-267.

CAVALLORO R., GIROLAMI V. (1969). Miglioramenti nell'allevamento in massa di *Ceratitis capitata* Wiedmann (Diptera, Trypetidae). *Redia.*, LI, 315-327.

EHLER L.E., ENDICOTT P.C. (1984). Effect of malathion-bait spray on biological control of insect pest of olive, citrus and walnut. *Hilgardia*, 52 (5), 1-47.

EHLER L.E., ENDICOTT P.C., HERTLEIN M.B., ALVARADO-RODRIGUEZ B. (1984). Medfly eradication in California: impact of malathion-bait spray on an endemic gall midge and its parasitoids. *Entomol. exp. appl.*, 36, 201-208.

FAST P.G. (1981). The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Microbial control of Pest and Plant diseases, 1970-1980. (Burgess Ed.). Acc. Press. Inc. (London), 223-248.

GARY N.E., MUSSEN E.C. (1984). Impact of Mediterranean Fruit Fly malathion-bait spray on honey bees. *Environ. Entomol.*, 13, 711-717.

GINGRICH R.E. (1987). Demonstration of *Bacillus thuringiensis* as a potential control agent for the adult Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied.). *J. Appl. Ent.*, 104, 378-385.

HOELMER K.A., DAHLSTEN D.L. (1993). Effect of malathion-bait spray on *Aleyrodes spyraeoides* (Homoptera: Aleyrodidae) and its parasitoids in northern California. *Environ. Entomol.*, 22 (1), 49-56; 22 ref.

KARAMANLIDOU G., LAMBROPOULOS A.F., KOLIAIS S.I., MANOUSIS T., ELLAR D., KASTRITSIS C. (1991). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the Olive Fruit Fly (*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8), 2277-2282.

KNOWLES B.H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -Endotoxin. *Adv. Insect Physiol.* 24, 275-308.

OHBA M., AIZAWA K. (1986). Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.*, 47, 12-20.

TROETSCHLER R.G. (1984). Effect on nontarget arthropods of malathion-bait spray using in California to eradicate the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera Tephritidae). *Environ. Entomol.*, 12, 1816-1822.