

DISTRIBUZIONE DI *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *KURSTAKI* IN QUERCETI CADUCIFOGLI CON TRATTAMENTI AEREI AD ULTRABASSO VOLUME: PENETRAZIONE NELLO STRATO DELLE CHIOME E PERSISTENZA

P. RUMINE, G. P. BARZANTI, P. F. ROVERSI
CRA - Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria
Via Lanciola 12/A, Cascine del Riccio - 50125 Firenze, Italia
pietro.rumine@isza.it; rovers@isza.it

RIASSUNTO

Nel biennio 2004-2005 sono stati effettuati, in comprensori boschivi situati in Toscana, rilievi per verificare la penetrazione nelle chiome e la persistenza sulle foglie di *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Foray 48B) distribuito con mezzo aereo ad ultra basso volume alle dosi di 2,5 - 3,5 - 4,5 l/ha (31,75 BIU/ha, 44,45 BIU/ha e 57,15 BIU/ha) per controllare l'avvio di un'infestazione di "processionaria della quercia". Le sperimentazioni hanno richiesto il prelievo di larve e campioni di foglie da porzioni differenti delle chiome delle piante trattate e l'effettuazione di indagini di laboratorio mirate ad evidenziare la presenza del batterio. Nel corso del primo anno le indagini sono state incentrate sulla verifica della presenza di *Btk* nelle larve raccolte già morte in natura o decedute negli allevamenti dopo pochi giorni dal loro prelievo in bosco. Nel secondo anno di studio è stata indagata per un periodo di 6 mesi dal trattamento, la persistenza delle spore del batterio sulle foglie delle piante.

Parole chiave: *Bacillus thuringiensis*, *Thaumetopoea processionea*, *Quercus* spp., trattamenti aerei, persistenza

SUMMARY

DISTRIBUTION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *KURSTAKI* IN DECIDUOUS OAK WOODS BY MEANS OF ULTRA-LOW-VOLUME AERIAL TREATMENTS: PENETRATION INTO THE CROWN LAYER AND PERSISTENCE

Following a vast experimental intervention of microbiological control in large wooded areas, we conducted tests in oak woods of Tuscany in 2004-2005 to evaluate the penetration into the crown and the persistence on the leaves of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Foray 48B). The *Btk* suspension was distributed via ultra-low-volume aerial treatments at doses of 2,5 - 3,5 - 4,5 l/ha (31,75 BIU/ha, 44,45 BIU/ha e 57,15 BIU/ha) to control the beginning of an Oak Processionary Moth infestation.

The investigation consisted in the collection of larvae and leaf samples from different portions of the crown of treated trees, followed by laboratory analyses to identify the presence of the bacteria. In the first year of the study, we determined the presence of *Btk* in larvae collected dead in the wild or that died in the laboratory a few days after being collected in the woods. In the second year, we investigated the persistence of the entomopathogen on the leaves of treated trees for a period of 6 months after the application of the *Btk* suspension.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Thaumetopoea processionea*, *Quercus* spp., aerial treatments, persistence

Ricerche svolte nell'ambito di: Progetto "META - Monitoraggio Estensivo dello Stato Fitosanitario delle Foreste Toscane", Reg. CE 1257/99, PSR 2000/2006, Misura 8 Selvicoltura;

Programma ordinario CRA - Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Firenze, Scheda di Ricerca 1/04 - *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* per il controllo di *Thaumetopoea processionea*: verifica dell'efficacia e della selettività di trattamenti a basso volume in querceti caducifogli.

INTRODUZIONE

La lotta microbiologica si basa sull'applicazione di microrganismi batterici e fungini per il controllo di insetti fitofagi in alternativa alle tradizionali tecniche di difesa delle piante con insetticidi di sintesi in un'ottica di maggiore attenzione alla tutela dell'ambiente e dell'uomo.

Fra i microrganismi utilizzabili nella lotta microbiologica contro insetti dannosi, un posto di rilievo spetta a *Bacillus thuringiensis* Berliner per le caratteristiche di selettività, rapidità di azione, innocuità per l'uomo e gli animali domestici, assenza di fitotossicità e possibilità di produzione industriale e stoccaggio.

E' noto che alle diverse varietà di *B. thuringiensis* corrispondono differenti specificità di azione nei confronti dei fitofagi, almeno a livello di Ordini. In particolare, la var *kurstaki* risulta molto efficace nel controllo dei lepidotteri. Da alcuni decenni, a seguito della comparsa sul mercato di formulazioni in grado di combattere efficacemente fitofagi di notevole importanza forestale, anche in Italia si è diffuso l'impiego di *B. thuringiensis* var *kurstaki* soprattutto per il controllo di defogliatori forestali (Luciano *et al.*, 1995; Rumine e De Silva, 2002; Roversi *et al.*, 2004).

Le querce caducifoglie, gruppo di vasta diffusione nel nostro Paese, sono attaccate, tra gli altri, dal lepidottero defogliatore *Thaumetopoea processionea* L. dimostratosi capace di dare luogo a vere e proprie esplosioni demografiche, determinando defogliazioni di interi boschi con ripercussioni sul regolare sviluppo delle piante. La presenza di un elevato numero di larve ha determinato, nelle aree attaccate e in quelle circostanti, gravi problemi d'igiene pubblica, legati alla diffusione dei peli urticanti, con irritazioni cutanee e allergie.

Nella seconda metà degli anni '90 si è andata sviluppando in vaste aree dell'Italia centrale un'imponente gradazione che ha colpito migliaia di ettari di querceti decidui. In particolare in Toscana il fenomeno ha interessato il complesso forestale di Santa Luce (PI) e aree limitrofe. Nel 2003 programmi di monitoraggio realizzati nella Regione allo scopo di prevedere gli sviluppi di nuove infestazioni sul territorio (Prog. META) hanno fornito indicazioni su una ripresa di vigore delle popolazioni di questo fitofago. In tale contesto si è ritenuto necessario programmare un intervento di lotta microbiologica su vasta scala con l'impiego di mezzi aerei.

La sperimentazione s'inserisce nel programma di ricerca che è stato avviato per far fronte a tale emergenza.

Obiettivo dell'indagine è stato lo studio della penetrazione all'interno delle chiome di un formulato a base di *B. thuringiensis* var *kurstaki* distribuito con elicottero a ultra-basso volume e della persistenza delle spore del batterio sulle foglie.

MATERIALI E METODI

Le prove di controllo della "processionaria della quercia" sono state condotte in un comprensorio boschivo di circa 1600 ha, costituito in prevalenza da *Quercus cerris* L., situato nei Comuni di Santa Luce e Chianni in Provincia di Pisa.

A fine aprile 2004, è stato effettuato un trattamento aereo contro larve di I e II età del defogliatore mediante un elicottero equipaggiato con barra orizzontale munita di quattro distributori "micronair". E' stato utilizzato senza diluizione un formulato (Foray 48B) a base di *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a tre diverse dosi: 2,5 - 3,5 - 4,5 l/ha (31,75 BIU/ha, 44,45 BIU/ha e 57,15 BIU/ha). L'applicazione del prodotto sull'area boschiva è stata effettuata per "passaggi" successivi e contigui guidati da un sistema GPS ad alta precisione.

Per lo studio della penetrazione del prodotto all'interno della vegetazione, prima dell'inizio del trattamento, in una stazione scelta all'interno dell'area interessata, sono stati collocati cartellini idrosensibili su due piante di *Q. cerris* a tre diverse altezze della chioma (porzione

superiore, intermedia, inferiore). Ad ognuna delle tre altezze sono stati posizionati cinque cartellini per pianta. I cartellini spia sono stati quindi ritirati dopo il trattamento, posti in contenitori sterili e trasportati in laboratorio per successive analisi.

In laboratorio i cartellini idrosensibili sono stati analizzati secondo due modalità: parte di essi è stata tagliata in piccole porzioni e posta in piastra su mezzo di coltura NA (Nutrient Agar) avendo cura di mettere a contatto con il substrato alternativamente ambedue le superfici; una seconda parte è stata invece lavata con acqua sterile e 1 ml della sospensione risultante è stato distribuito in piastra sul medesimo mezzo di coltura.

Sono state inoltre effettuate raccolte di larve di “processionaria” in due campionamenti successivi a distanza di 8 giorni. Le raccolte sono state fatte abbattendo tre piante in ciascuna delle quattro stazioni prescelte, tre delle quali collocate in aree trattate alle tre diverse dosi di prodotto ed una in un’area testimone. Tutte le larve rinvenute sulle piante esaminate sono state prelevate.

In laboratorio le larve morte sono state lavate esternamente in ipoclorito di sodio, sciacquate in acqua sterile e poste in piastra su mezzo di coltura NA. A cadenze regolari (ogni tre giorni) tutte le larve morte reperite negli allevamenti sono state sottoposte alla medesima procedura. Al termine della prova anche le larve del testimone, che risultavano tutte ancora vive, sono state utilizzate per verificare l’eventuale presenza di *Btk* all’interno dell’intestino.

In tutte le prove di laboratorio le piastre sono state incubate in termostato a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Nel 2005, allo scopo di abbattere i focolai d’infestazione ancora presenti, è stato effettuato ai primi di maggio un nuovo trattamento con elicottero utilizzando un’unica dose di formulato (2,5 l/ha). In tale anno le verifiche sulla persistenza di *Btk* sulle chiome sono state realizzate mediante controlli effettuati in quattro stazioni rappresentative dell’intera area, tre delle quali nella porzione trattata. In ciascuna stazione sono state scelte due piante di cerro dalle quali sono state prelevate foglie a cadenza periodica. Per ogni campionamento, da ciascuna pianta sono stati raccolti tre rametti a due diverse altezze della chioma (parte alta e media).

In laboratorio è stata valutata la presenza di *B. thuringiensis* sulle foglie campionate. Per ciascun campione sono state impiegate sei foglie. Di esse, tre sono state tagliate in piccole porzioni e messe in piastra su mezzo colturale NA ponendo alternativamente la pagina superiore e inferiore a contatto col substrato. Le altre sono state lavate con acqua sterile e 1 ml della sospensione risultante è stata distribuita in piastra sullo stesso substrato.

Anche in queste prove le piastre sono state tenute in termostato a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

RISULTATI

1° anno

Le analisi di laboratorio hanno mostrato che il formulato ha raggiunto entrambe le superfici di tutti i cartellini collocati sulle piante in quanto i test effettuati in piastra, sia col metodo della piastratura diretta che del lavaggio, hanno permesso di rilevare lo sviluppo di colonie batteriche di *B. thuringiensis*.

Tutte le larve di I e II età raccolte cinque giorni dopo il trattamento, già morte o morte in allevamento nei primi dieci giorni dall’intervento, hanno dato origine in piastra a colonie di *B. thuringiensis*. Nei successivi controlli effettuati sulle larve del primo campionamento dopo 10 gg e sulle larve prelevate con il secondo campionamento il numero di individui morti dai quali si è sviluppato *Btk* è diminuito (figure 1 e 2).

Nelle aree non trattate, nessuna delle larve raccolte, messe in coltura dopo uccisione con etere, ha dato origine a colonie batteriche di *Btk*.

Figura 1 – 1° campionamento (raccolta effettuata a 5 gg dal trattamento): percentuale di larve morte che in piastra hanno dato origine a colonie di *Btk*.

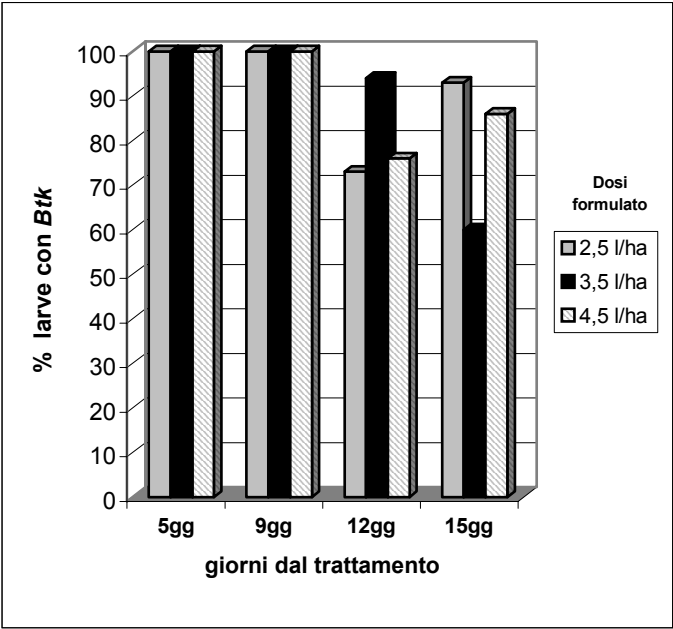
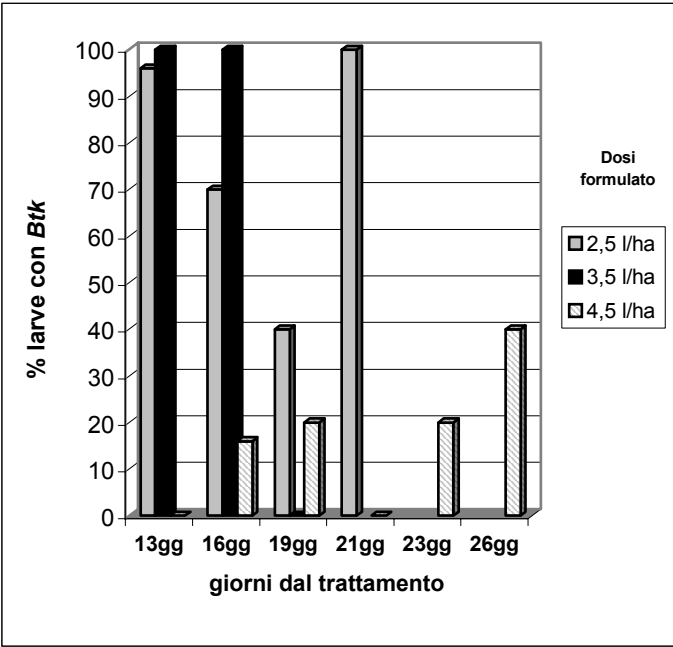


Figura 2 – 2° campionamento (raccolta effettuata a 13 gg dal trattamento): percentuale di larve morte che in piastra hanno dato origine a di colonie di *Btk*



2° anno

Nelle tre stazioni trattate le foglie campionate alcune ore dopo l'intervento, tagliate in piccole porzioni e messe in piastra, hanno dato origine a colonie di *B. thuringiensis*.

Il secondo tipo di analisi, effettuato sulle foglie mediante lavaggio superficiale, ha fornito risultati analoghi. Le foglie sottoposte a lavaggio hanno consentito di evidenziare la presenza del batterio fino a circa un mese dal trattamento. In una sola stazione (staz. 3) è stata ottenuta una colonia di *Btk* anche a più di due mesi. In due stazioni (staz. 2 e 3) dopo soli 4 gg dal trattamento si è registrato un crollo del numero di colonie sviluppatesi dal lavaggio delle foglie, mentre nella stazione 1 il crollo nel numero di colonie è stato rilevato sulle foglie raccolte dopo 11 gg dall'intervento (tabella 1).

Tabella 1 – Presenza di *Btk* sulle foglie trattate (metodo del lavaggio fogliare)

Giorni dal trattamento	Stazione 1 n° colonie/ml	Stazione 2 n° colonie/ml	Stazione 3 n° colonie/ml	Media n° colonie/ml
0	7.475	2.083	6.292	5.283
4	5.083	417	500	2.000
11	277	183	275	245
18	88	3	39	44
31	2	1	5	3
64	0	0	1	0

CONCLUSIONI

I risultati del primo anno hanno evidenziato l'efficacia dell'utilizzo del mezzo aereo per la distribuzione a ultra-basso volume del Foray 48B.

L'analisi di laboratorio dei cartellini-spia, applicati a tre diverse altezze delle chiome, ha dimostrato infatti l'effettiva penetrazione del formulato insetticida applicato con elicottero munito di "micronair". Tale risultato è stato ribadito nella sperimentazione del secondo anno con l'analisi diretta delle foglie prelevate dai settori alto e medio delle chiome di piante situate all'interno dell'area trattata. In entrambi gli anni anche le porzioni più interne delle chiome sono state raggiunte dal prodotto irrorato.

A conferma di una elevata penetrazione del formulato si evidenzia come la presenza di *Btk* sia stata osservata sulla gran parte delle larve raccolte dopo il trattamento, indipendentemente dal settore di chioma e dall'altezza.

La sperimentazione del secondo anno, tesa a valutare anche la persistenza del batterio sulle foglie di quercia, ha permesso di rilevare la scomparsa di spore vitali di *Btk* dalla chioma nell'arco di circa un mese.

I futuri studi dovranno indagare il persistere dell'attività insetticida del formulato distribuito con mezzo aereo definendo in particolare l'efficacia su altre specie di lepidotteri la cui attività trofica si esplica nel periodo successivo all'emissione delle foglie.

LAVORI CITATI

- Luciano P., Lentini A., Prota R., Verdinelli M., Deiana P., 1995. Impiego del *Bacillus thuringiensis* Berl. nella lotta alla *Lymantria dispar* L. in boschi di *Quercus suber* L. IV. Risultati della sperimentazione condotta nel 1993. *Frustula entomol.* (1995) n. s. XIX (XXXI): 77-84.
- Roversi P.F., Faggi M., Rumine P., 2004. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaky* against *Thaumetopoea processionea* L. L1 larvae: field trials in *Quercus cerris* L. woods. 4th Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Integrated Protection in Quercus spp. Forests", Hammamet, Tunisie, October 5-8, 2004.
- Rumine P., De Silva J., 2002. Verifica in laboratorio della patogenicità di ceppi di *Bacillus thuringiensis* Berliner nei confronti di *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera Arctiidae). *Entomologica*, Bari, 36, pp.153-160.