

EUSTACHIO TARASCO

Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi di Bari

Confronto di patogenicità fra otto ceppi di *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae) rinvenuti in terreni dell'Italia meridionale*

ABSTRACT

INFECTIVITY COMPARISON AMONG EIGHT *STEINERNEMA FELTIAE* (FILIPJEV, 1934) (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE) ISOLATED FROM SOUTHERN ITALIAN SOILS

The infectivity of eight strains of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) isolated from Southern Italian soils were compared in two laboratory bioassays against *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Galleriidae) larvae. Infectivity was determined by larval mortality rate and penetration rate assays. The percentage of larval mortality was recorded after 72-h exposure to infective juveniles (IJs) ranging from 37.7 to 71.1%. In the penetration rate assay the percentage and sex ratio of nematodes invading the insects were determined; the average number of nematodes in cadavers exposed to 100 IJs ranged from 5.23 to 15.80.

There were significant differences among the strains and four of them (IS-CL2, IS-GR1, IS-CO1, IS-SA1) were highly virulent to *G. mellonella* larvae.

Bioassays' results showed a correlation between levels of host mortality and levels of nematode establishment.

Key words: Entomopathogenic nematodes, *Galleria mellonella*, Italian strains, bioassays, penetration rate, larval mortality rate.

INTRODUZIONE

I nematodi entomopatogeni appartenenti alle famiglie Steinernematidae ed Heterorhabditidae sono ottimi agenti per il controllo biologico di insetti dannosi che svolgono almeno una parte del loro ciclo nel terreno (GEORGIS e MANWEILER, 1994).

L'abilità di cercare attivamente l'ospite, l'innocuità per gli animali superiori (GAUGLER, 1987; KAYA, 1985; POINAR, 1986) e il migliorato processo di produzione (BEDDING, 1981) sono caratteristiche che hanno permesso ai nematodi di proporsi come alternativa all'utilizzo dei mezzi chimici.

La forma infestante dei nematodi è rappresentata dal terzo stadio giovanile

* Lavoro parzialmente finanziato con i fondi M.U.R.S.T. 60%.

(IJs), che presenta particolari adattamenti morfologici e fisiologici atti a persistere, senza nutrirsi, nell'ambiente esterno anche per un lungo periodo di tempo. Gli IJs penetrano nella vittima, attraverso le aperture naturali o perforando la cuticola, e rilasciano in essa i batteri simbiotici che trasportano nell'intestino; la morte dell'ospite sopraggiunge dopo 24-48 ore ed è causata dall'azione combinata del nematode e dei batteri (AKHURST e BOEMARE, 1990). Agli Steinernematidae sono associati batteri del genere *Xenorhabdus*, agli Heterorhabditidae batteri del genere *Photorhabdus* (BOEMARE *et al.*, 1993).

I nematodi, anche appartenenti allo stesso genere, presentano un diverso grado di patogenicità nei riguardi delle vittime (KONDO, 1989; GLAZER, 1992; MANNION e JANSSON, 1993; RICCI *et al.*, 1996; CAROLI *et al.*, 1996).

In seguito al rinvenimento in terreni dell'Italia meridionale di 8 isolati di *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (TARASCO e TRIGGIANI, 1997) si è inteso valutare la loro azione patogena in laboratorio allo scopo di individuare quelli più idonei per prove di pieno campo.

MATERIALI E METODI

Gli 8 ceppi di *S. feltiae* (tab. 1) sono stati fatti riprodurre in laboratorio su larve di *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Galleriidae) a $25\pm 1^\circ\text{C}$ (WOODRING e KAYA, 1988). Gli IJs, raccolti in trappole ad acqua (WHITE, 1927) e conservati

Tab. 1 - Data e località di rinvenimento degli 8 ceppi di *S. feltiae* isolati in Italia meridionale.

Isolati	Data	Località	Regione
IS-CO1	Feb. 1992	Corato (BA)	Puglia
IS-MO1	Sett. 1996	Melfi (PZ)	Basilicata
IS-MV1	Ott. 1996	Montevergine (AV)	Campania
IS-MU1	Ott. 1996	Mugnano del Cardinale (AV)	Campania
IS-GR1	Nov. 1995	Grassano (MT)	Basilicata
IS-CL2	Ott. 1996	Celsi (AV)	Campania
IS-SA1	Giu. 1990	Sammichele (BA)	Puglia
IS-CE2	Ott. 1996	Cerignola (FG)	Puglia

a 10°C per un massimo di 3 settimane, sono stati sottoposti a prove di laboratorio per valutarne patogenicità e capacità di penetrazione nell'ospite. In tali prove gli 8 ceppi italiani sono stati messi a confronto con l'isolato *S. feltiae* UK 76 ottenuto dal "Department of Biological Control and Quarantine" di Poznan, Polonia.

Come "insetti test" sono state utilizzate larve dell'ultimo stadio di *G. mellonella*.

TASSO DI MORTALITÀ

Preventivamente si è determinata la DL 70 (dose di IJs capace di uccidere il 70% degli insetti test) del ceppo UK 76, per confrontarla con gli 8 isolati italiani di *S. feltiae*.

In 18 contenitori di polietilene (10x10x4 cm) sono stati collocati 40 grammi di torba sterile inumidita con acqua distillata fino al 75% e 30 larve di *G. mellonella* per ciascuno. In ogni contenitore è stata quindi aggiunta una sospensione di 5 ml di acqua distillata con concentrazioni di 50-100-200-400-800-1600 IJs di UK 76. Per ciascuna dose sono state effettuate 3 ripetizioni. Nel controllo è stata rilasciata solo acqua distillata. La mortalità larvale è stata rilevata dopo 72 ore. La prova è stata condotta alla temperatura di 24±1°C.

Stabilita la DL 70 di UK 76, concentrazioni identiche di IJs sono state impiegate per gli 8 isolati italiani, allo scopo di valutarne la virulenza a parità di dose di IJs.

Per il biosaggio sono stati preparati 27 contenitori di polietilene con le modalità precedenti. Per ciascuno degli 8 isolati sono state utilizzate 90 larve di *G. mellonella* (30 per ogni contenitore per 3 ripetizioni) e in ciascun contenitore è stata rilasciata la medesima concentrazione di IJs. Nei 3 contenitori di controllo è stata aggiunta solo acqua distillata. La mortalità larvale è stata rilevata dopo 72 ore. La prova è stata condotta alla temperatura di 24±1°C (RICCI, dati non pubblicati)*.

TASSO DI PENETRAZIONE

Per stimare la capacità di penetrazione degli IJs degli 8 ceppi di *S. feltiae*, in scatole Petri (diametro 6 cm) con due filtri di carta bibula e contenenti tre larve di *G. mellonella*, è stata rilasciata una sospensione di 2 ml di acqua distillata con 100 ± 5 IJs. Per ogni isolato, compreso quello di riferimento UK 76, sono state effettuate 10 ripetizioni. Dieci scatole Petri con 3 larve di *G. mellonella* e filtri di carta bibula inumidita con acqua distillata, sono state utilizzate come confronto.

Dopo 48 ore dall'infestazione le larve sono state trasferite in scatole Petri sterili con filtri di carta bibula asciutta. Dopo 96 ore, le larve morte sono state

* Questo tipo di biosaggio rappresenta un rapido metodo per lo 'screening' di vari isolati di nematodi perchè unisce alla semplicità di esecuzione una elevata standardizzazione di tutti i parametri sperimentali e una risposta consistente dei risultati in condizioni molto simili a quelle naturali. A differenza di altri biosaggi (KAYA e HARA, 1980; MORRIS, 1985; MILLER, 1989; MORRIS et al., 1990; GLAZER, 1992), in questo si utilizzano un numero maggiore di insetti e di nematodi contemporaneamente, un'arena tridimensionale con substrato e condizioni climatiche simili ad una reale situazione di pieno campo.

separate da quelle vive e dissecate per rilevare il numero ed il sesso dei nematodi adulti.

Il biosaggio è stato condotto alla temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

ANALISI DEI DATI

La DL70 dell'isolato UK 76 è stata calcolata con il programma Probit del SAS (SAS Institute, 1985).

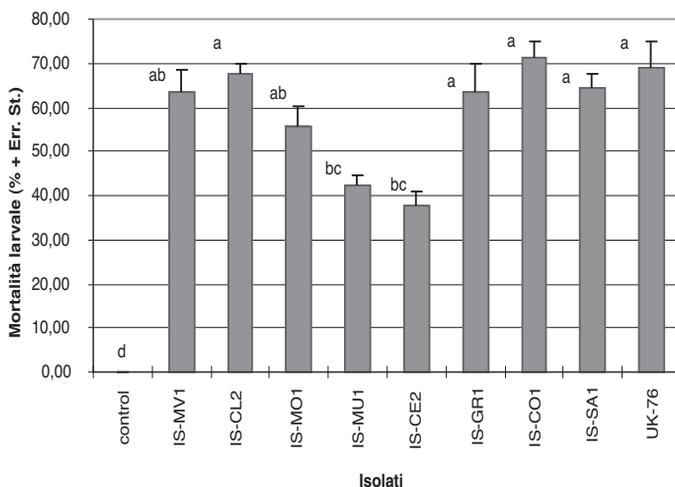
I dati riguardanti i biosaggi del tasso di mortalità e del tasso di penetrazione sono stati sottoposti all'analisi della varianza dopo la trasformazione della radice quadrata delle percentuali di mortalità e di penetrazione in arcoseno (ANOVA; SAS Institute, 1985); le differenze significative tra i valori sono state evidenziate con il test di Tukey ($P < 0,05$).

RISULTATI

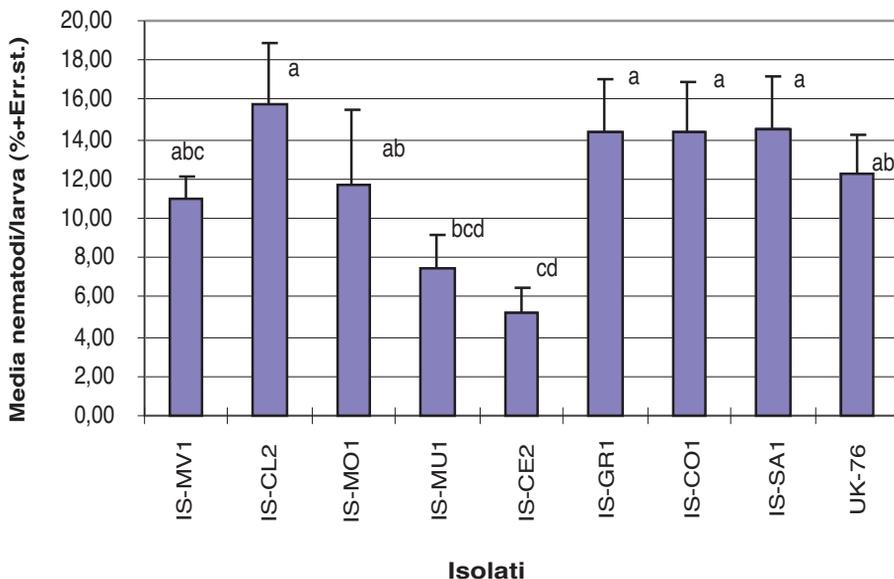
BIOSAGGI

Dall'analisi dei Probit la DL70 di *S. feltiae* UK 76, assunta come dose di paragone per il tasso di mortalità degli 8 ceppi italiani, è risultata di 311, 63 (253,24-394,86) IJs.

La percentuale più elevata di mortalità è stata ottenuta con il ceppo IS-CO1 (71,10%) (graf. 1), superiore di alcuni punti percentuali al ceppo di confronto UK 76 (68,89%). Gli isolati IS-GR1 (63,30%), IS-CL2 (67,70%) e IS-SA1



Graf. 1 - Biosaggio del tasso di mortalità: mortalità larvale (%) di *G. mellonella* a 72 ore dall'infestazione con IJs degli 8 isolati italiani e di UK 76 (le barre con le stesse lettere non sono statisticamente differenti; Tukey HSD Post Hoc Comparison Test; $P < 0,05$).

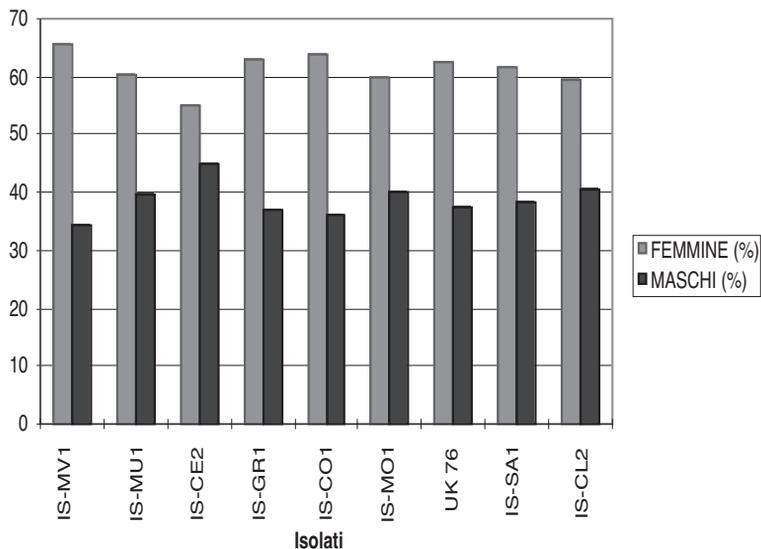


Graf. 2 - Biosaggio del tasso di penetrazione: nematodi rinvenuti (%) nelle larve di *G. mellonella* infestate da 100 IJs degli 8 isolati italiani e di UK 76 (le barre con le stesse lettere non sono statisticamente differenti; Tukey HSD Post Hoc Comparison Test; $P < 0,05$).

(64,40%) hanno presentato percentuali di mortalità leggermente inferiori ma statisticamente non dissimili ($P < 0,05$). Gli isolati IS-MO1 (55,50%), IS-MU1 (42,20%), IS-CE2 (37,70%) e IS-MV1 (61,10%) hanno evidenziato invece una virulenza significativamente inferiore sia rispetto al ceppo di confronto sia rispetto agli altri isolati ($P > 0,05$).

Le percentuali più elevate di penetrazione sono state rilevate nei ceppi IS-CL2 (15,80%), IS-GR1 (14,40%), IS-CO1 (14,30%), IS-SAI (14,47%) e UK-76 (12,20%) (graf. 2). Tra questi isolati non si sono evidenziate differenze significative. Invece per gli isolati IS-MO1 (11,63%), IS-MU1 (7,50%), IS-MV1 (11,00%) e IS-CE2 (5,23%) sono state rilevate percentuali di penetrazione significativamente inferiori.

La sex ratio è risultata a favore delle femmine per tutti gli isolati (graf. 3); il rapporto medio è stato di 1:1,5 con un massimo di 1:1,92 per IS-MV1 ed un minimo di 1:1,22 per IS-CE2.



Graf. 3 - Femmine e maschi (%) di nematodi rinvenuti in larve di *G. mellonella* dopo 96 ore dalla infestazione.

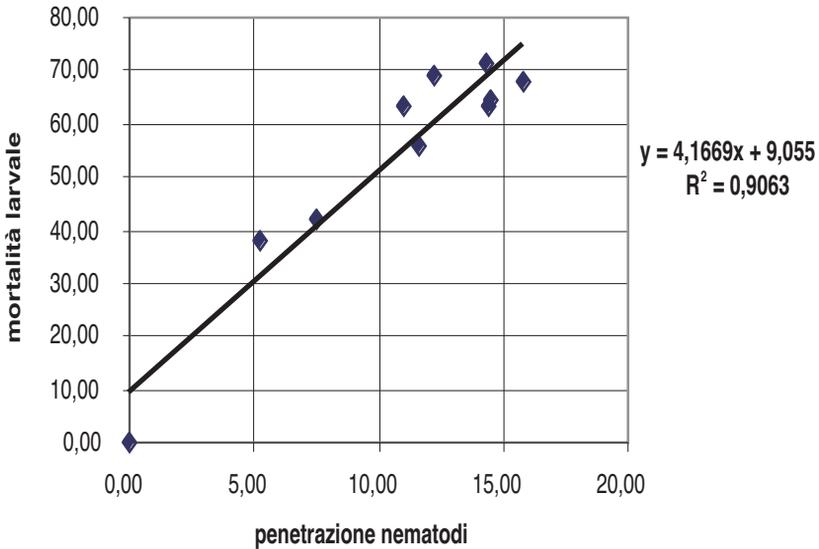
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I biosaggi hanno messo in luce una differente patogenicità tra gli 8 ceppi di *S. feltiae* rinvenuti nell'Italia meridionale. Questa variabilità d'azione è dunque caratteristica non solo di nematodi di specie diverse (KONDO e ISHIBASHI, 1986; GAUGLER *et al.*, 1990; GLAZER, 1992; MANNION e JANSSON, 1993; RICCI *et al.*, 1996; CAROLI *et al.*, 1996) ma anche di isolati della stessa specie.

Il tasso di mortalità di IS-CO1, IS-GR1, IS-CL2 e IS-SA1 è risultato simile a quello dell'isolato di riferimento *S. feltiae* UK 76, mentre è stato significativamente inferiore quello degli altri ceppi (IS-MV1, IS-MU1, IS-CE2 e IS-MO1).

Una netta correlazione è stata evidenziata tra tasso di mortalità e tasso di penetrazione (graf. 4), a dimostrazione del fatto che la virulenza dei nematodi aumenta in relazione al numero di IJs che penetrano nell'ospite.

Tale correlazione tra tasso di mortalità e tasso di penetrazione di ceppi e/o specie di nematodi è comunque un tema controverso: MANNION e JANSSON, (1993) l'hanno evidenziata in un confronto di patogenicità tra 5 specie di nematodi su *Cylas formicarius* (F.) (Coleoptera: Apionidae), e SHANNAG *et al.* (1994) tra 5 specie di nematodi contro *Diaphania nitidalis* (Stoll.) (Lepidoptera: Pyralidae). EPSKY (1991) e EPSKY e CAPINERA (1994) invece non l'hanno rilevata in prove effettuate con alcuni ceppi di *S. carpocapsae* contro



Graf. 4 - Correlazione tra il tasso di mortalità ed il tasso di penetrazione.

differenti specie di lepidotteri; lo stesso dicasi per le prove effettuate da KONDO e ISHIBASHI (1986) e da GAUGLER *et al.* (1990).

Gli Ijs che diventeranno femmine penetrano in maggiore numero rispetto agli Ijs che si evolveranno in maschi. Questo confermerebbe quanto osservato da GREWAL *et al.* (1993) secondo i quali *S. feltiae*, a differenza di *S. anomali*, *S. carpocapsae*, *S. glaseri* e *S. scapterisci*, ha una sex ratio a favore delle femmine e che molto probabilmente in *S. feltiae* il sesso colonizzatore è quello femminile.

È interessante notare che il ceppo IS-CE2 con la sex ratio più vicina a 1:1, e con il tasso di penetrazione più basso è anche quello che presenta il più basso tasso di mortalità. La sua ridotta azione patogena nei confronti di *G. mellonella* potrebbe essere spiegata dalla mancanza nella sua popolazione di un numero sufficiente di femmine colonizzatrici.

In conclusione sono state evidenziate differenze significative tra i diversi ceppi e 4 di essi (IS-CL2, IS-GR1, IS-CO1, IS-SA1) hanno mostrato un alto livello di patogenicità nei confronti delle larve di *G. mellonella*. Sarebbe pertanto opportuno valutare la loro azione su altri insetti-test e verificare la loro idoneità ad essere impiegati in pieno campo.

RIASSUNTO

È stato effettuato un confronto di patogenicità tra 8 ceppi di *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), isolati da terreni dell'Italia meridionale, utilizzando larve di *Galleria mellonella* in due biosaggi di laboratorio. La patogenicità è stata valutata mediante il tasso di mortalità larvale ed il tasso di penetrazione. I dati sulla mortalità larvale sono stati rilevati 72 ore dopo aver sottoposto 30 larve all'inoculo di stadi giovanili infestanti (Ijs); le percentuali di mortalità hanno presentato valori compresi tra 37,7% (IS-CE2) e 71,1% (IS-CO1). Nel biosaggio sul tasso di penetrazione, dove 3 larve sono state sottoposte all'infestazione di 100 (Ijs) dei diversi ceppi, sono stati determinati il numero dei nematodi penetrati all'interno dell'ospite (variabile da 5,23% a 15,80%) e la sex ratio. Sono state evidenziate significative differenze tra i diversi isolati e 4 di essi (IS-CL2, IS-GR1, IS-CO1, IS-SA1) hanno mostrato una alta patogenicità nei confronti delle larve di *G. mellonella*. I dati dei biosaggi hanno evidenziato una correlazione tra la mortalità larvale ed i nematodi riscontrati all'interno delle larve.

Parole chiave: nematodi entomopatogeni, *Galleria mellonella*, isolati italiani, biosaggi, tasso di penetrazione, tasso di mortalità.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dr. Manuele Ricci della Bio Integrated Technology s.r.l. di Todi (Perugia) per l'aiuto fornito nella elaborazione statistica dei dati e nella impostazione delle prove di laboratorio. Si ringrazia il Dr. Marek Tomalak del "Department of Biological Control & Quarantine" di Poznan (Polonia) per aver fornito il ceppo *S. feltiae* UK 76.

BIBLIOGRAFIA

- AKHURST R.J., BOEMARE N.E., 1990 - Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*, in "Entomopathogenic Nematodes in Biological Control" (Gaugler R., Kaya H.K., Eds.) CRC Press, Boca raton, Fl, Usa, pp.75-90.
- BEDDING R.A. 1981 - Low cost, in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pest. *Nematologica*, 27: 109-114.
- BOEMARE N.E., AKHURST R.J., MOURANT R.G., 1993 - DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic bacteriology*, 43: 249-255.
- CAROLI L., GLAZER I., GAUGLER R., 1996 - Entomopathogenic nematode infectivity assays: comparison of penetration rate into different hosts. *Biocontrol Science & Technology*, 6: 227-233.
- EPSKY N., 1991 - Comparative Pathogenesis of the Entomogenous Nematodes, *Steinernema carpocapsae*. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- EPSKY N.D., CAPINERA J.L., 1994 - Invasion efficiency as a measure of the entomogenous nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *J. Econ. Entomol.*, 87(2): 366-370.
- GAUGLER R., 1987 - Entomogenous nematodes and their prospects for genetic improvements. In: "Biotechnology Advances in Invertebrate Pathology and Cell Culture", pp. 457-484. Ed. K. Maramorosch. New York: Academic Press.

- GAUGLER R., CAMPBELL J.F., MCGUIRE T.R., 1990 - Fitness of a genetically improved entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 56: 106-116.
- GEORGIS R., MANWEILER S.A., 1994 - Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. In *Agricultural Zoology Reviews* (Evans K., Ed.) Intersept., Andover, pp. 63-94.
- GLAZER I., 1992 - Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes to insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 90-94.
- GREWAL P.S., SELVAN S., LEWIS E.E. AND GAUGLER R. 1993 - Male insect-parasitic nematodes: a colonizing sex. *Experientia* 49(6/7): 605-608.
- KAYA H.K., 1985 - Entomogenous nematodes for insect control in IPM System. In "Biological Control in Agricultural IPM System" (M.A. Hass ad D. C. Herzog, Eds.), pp. 283-302.
- KAYA H.K., HARA A.H., 1980 - Differential susceptibility of lepidopterous pupae to infection by the nematode *Neoapectana carpocapsae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 36: 389-393.
- KONDO E., 1989 - Studies on the infectivity and propagation of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., (Rhabditida: Steinernematidae), in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull. Fac. Agr., Saga Univ.*, 67: 1-88.
- KONDO E., ISHIBASHI N., 1986 - Infectivity and propagation of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 21: 95-108.
- MANNION C.M., JANSSON R.K., 1993 - Infectivity of five entomopathogenic nematodes to the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Apionidae), in three experimental arenas. *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 29-36.
- MILLER R., 1989 - Novel pathogenicity assessment technique of steinernematid and heterorhabditid entomopathogenic nematodes. *J. Nematology*, 21: 574.
- MORRIS O.N., 1985 - Susceptibility of 31 species of agricultural insect pests to entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Canad. Entomol.*, 117: 401-407.
- MORRIS O.N., CONVERSE V., HARDING J., 1990 - Virulence of entomopathogenic nematode-bacteria complexes for larvae of noctuids, a geometrid and a pyralid. *Canad. Entomol.*, 122: 309-320.
- POINAR G.O.J., 1986 - Entomogenous nematodes. In "Biological Plant and Health Protection" (B.D. Franz, Ed.), pp. 95-121. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- RICCI M., GLAZER I., CAMPBELL J.F., GAUGLER R., 1996 - Comparison of bioassays to measure virulence of different entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sciences and Technology*, 6: 235-245.
- SAS INSTITUTE, 1985 - SAS/STAT Guide for Personal Computers, Version 6. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- SHANNAG H.K., WEBB S.E., CAPINERA J.L., 1994 - Entomopathogenic nematode effect on pickleworm (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory and field conditions. *J. Econ. Entomol.*, 87(5): 1205-1212.
- TARASCO E., TRIGGIANI O., 1997 - Survey of *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Rhabditida: Nematoda) in Southern Italian soils. *Entomologica*, Bari, XXXI: 117-123.
- WHITE G.F., 1927 - A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66: 302-303.
- WOODRGING J.L., KAYA H.K., 1988 - Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A handbook of Techniques, Arkansas Agricultural experiment Station, Fayetteville, AK., USA.