Indice con link

# ATTI
DELLA
# ACCADEMIA NAZIONALE ITALIANA DI ENTOMOLOGIA

## RENDICONTI

Anno LXVI
2018

TIPOGRAFIA COPPINI - FIRENZE

# ATTI
DELLA
# ACCADEMIA NAZIONALE ITALIANA DI ENTOMOLOGIA

## RENDICONTI
Anno LXVI
2018

TIPOGRAFIA COPPINI - FIRENZE

ISSN 0065-0757

Direttore Responsabile: *Prof. Romano Dallai*
Presidente Accademia Nazionale Italiana di Entomologia

Coordinatore della Redazione: *Dr. Roberto Nannelli*

La responsabilità dei lavori pubblicati è esclusivamente degli autori
Registrazione al Tribunale di Firenze n. 5422 del 24 maggio 2005

# INDICE


**Rendiconti**

Consiglio di Presidenza ... Pag. 5
Elenco degli Accademici ... » 6
Verbali delle adunanze del 23-24 febbraio 2018 ... » 9
Verbali delle adunanze del 8-9 giugno 2018 ... » 19
Verbali delle adunanze del 16-17 novembre 2018 ... » 27

**Commemorazione**

ROBERTO NANNELLI – *Breve ricordo di Fausta Pegazzano* ... » 51

**Letture**

GIUSEPPE GARGIULO – *Interazione ospite-parassitoide: analisi dei fattori di virulenza nel modello* Drosophila ... » 57
EMILIO BALLETTO, FRANCESCA BARBERO, SIMONA BONELLI, LUCA PIETRO CASACCI – *La mirmecofilia nelle farfalle diurne europee* ... » 63
ROBERTO A. PANTALEONI, MAURO RUSTICI – *Il* nemico condiviso *e l'entomologia applicata: alcune chiavi di lettura* ... » 69

**Tavola Rotonda su:**

DISCESE TERMICHE E TEMPERATURE BASSE E ULTRABASSE PER LA CREAZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI DI INTERESSE AGROFORESTALE

PIO FEDERICO ROVERSI, FRANCESCO PAOLI, SILVIA LANDI – *Embriologia e crioconservazione di insetti* ... » 77
MAURIZIO LAMBARDI – *La crioconservazione di specie arboree: dal laboratorio alla criobanca* ... » 81
SAURO SIMONI, ENRICO DE LILLO – *Note su conservazione a basse temperature di ceppi di acari utilizzabili per il controllo biologico* ... » 89
GIAN PAOLO BARZANTI, VALERIA FRANCARDI – *Tecniche per la crioconservazione di microrganismi entomopatogeni* ... » 95
SILVIA LANDI, GIULIA TORRINI, EUSTACHIO TARASCO – *Temperature ultrabasse e protocolli cryo per la costituzione di collezioni viventi di nematodi entomopatogeni* ... » 99

**Tavola Rotonda su:**

APPROCCI GENOMICI E MOLECOLARI PER IL CONTROLLO DI SPECIE INVASIVE DI INSETTI DI INTERESSE AGRARIO E SANITARIO

PAOLA POLLEGIONI, IGNAZIO GRAZIOSI, RUTH MÜLLER, ANDREA CRISANTI – *Editing population genetics for vector control* ... » 105
MARC F. SCHETELIG – *Genomic engineering of insects for sustainable crop protection* ... » 111
GIUSEPPE SACCONE – *Sex determination and gene editing in Tephritids: converging on innovative biocontrol strategies* ... » 115
BRUNO ARCÀ, SARA BUEZO MONTERO, FABRIZIO LOMBARDO – *Antigeni salivari quali strumenti epidemiologici per la valutazione dell'esposizione umana ad* Aedes albopictus ... » 123
GUIDO FAVIA – *I batteri simbionti nel controllo delle malattie trasmesse da insetti vettori* ... » 129
MAURIZIO CALVITTI, RICCARDO MORETTI, ELENA LAMPAZZI – *The role of the endosymbiotic bacterium* Wolbachia *in the control of* Aedes albopictus*-borne human diseases* ... » 135

**Tavola Rotonda su:**

ESTINZIONI GLOBALI ED ESTINZIONI LOCALI

ACHILLE CASALE – *Estinzioni locali o globali. L'estinzione in entomologia: mito o realtà? Introduzione a una Tavola Rotonda* ... » 143
GÁBOR L. LÖVEI – *The possible consequences of invasions: will they cause extinctions or not?* ... » 149
EMILIO BALLETTO, FRANCESCA BARBERO, SIMONA BONELLI, LUCA PIETRO CASACCI, CRISTIANA CERRATO – *Le estinzioni nelle farfalle diurne* ... » 151
VALERIO SBORDONI – *Aspetti genetici ed ecologici del declino di popolazioni di farfalle e altri insetti* ... » 159
MAURIZIO BIONDI – *Insetti, cambiamenti climatici ed estinzioni: il contributo della modellistica nella previsione di scenari futuri* ... » 169

MARCO A. BOLOGNA – *Possible extinction, population reduction and rediscovery of Italian blister beetles (Coleoptera, Meloidae)* ..... Pag. 177
PIETRO BRANDMAYR, GIORGIO COLOMBETTA, ROBERTO PIZZOLOTTO – *Estinzioni a livello di habitat ed a meso-scala di specie e comunità di Coleotteri Carabidi: esperienze in Italia* ..... » 183
PAOLO AUDISIO – *Estinzioni vere o presunte in ambito entomologico in corsi d'acqua montani e in altri ambienti vulnerabili* ..... » 191
MARZIO ZAPPAROLI – *Entomologia urbana ed estinzioni* ..... » 197

ANNO ACCADEMICO
2018

## CONSIGLIO DI PRESIDENZA

PRESIDENTE

DALLAI Prof. Dott. Romano
(confermato)

VICE-PRESIDENTE

GIORDANA Prof. Dott.sa Barbara
(confermato)

SEGRETARIO

CRAVEDI Prof. Dott. Piero
(confermato)

TESORIERE

NANNELLI Dott. Roberto
(confermato)

# ELENCO DEGLI ACCADEMICI

## ACCADEMICI EMERITI

| | | |
|---|---|---|
| Arzone Prof. Dott. Alessandra | – Torino | 1984 |
| Barbagallo Prof. Dott. Sebastiano | – Catania | 1982 |
| Baronio Prof. Piero ([1]) | – Bologna | 2001 - 2012 |
| Bonvicini Pagliai Prof. Dott. Anna | – Modena | 1983 - 2001 |
| Briolini Prof. Dott. Giovanni | – Bologna | 1977 - 1982 |
| Bullini Prof. Dott. Luciano | – Roma | 1986 |
| Covassi Dott. Marco Vittorio | – Firenze | 1983 - 1997 |
| Cravedi Prof. Dott. Piero | – Piacenza | 1999 - 2005 |
| Dallai Prof. Dott. Romano | – Siena | 1979 - 1982 |
| Delrio Prof. Dott. Gavino | – Sassari | 1989 - 2000 |
| Frilli Prof. Dott. Franco | – Udine | 1978 - 1982 |
| Gasperi Prof. Dott. Giuliano | – Pavia | 2005 - 2013 |
| Giordana Prof. Dott. Barbara | – Milano | 1997 - 2003 |
| Girolami Prof. Dott. Vincenzo | – Padova | 1993 - 2004 |
| Maroli Prof. Dott. Michele | – Roma | 2003 - 2010 |
| Masutti Prof. Dott. Luigi | – Padova | 1972 - 1977 |
| Mellini Prof. Dott. Egidio | – Bologna | 1962 - 1972 |
| Mineo Prof. Dott. Giovanni ([2]) | – Palermo | 1986 |
| Monaco Prof. Dott. Raffaele | – Bari | 1985 |
| Nuzzaci Prof. Dott. Giorgio | – Bari | 1988 - 1994 |
| Olmi Prof. Dott. Massimo | – Viterbo | 2002 - 2013 |
| Osella Prof. Dott. Giuseppe Bartolomeo | – L'Aquila | 1983 - 1997 |
| Ragusa di Chiara Prof. Dott. Salvatore | – Palermo | 1993 - 2000 |
| Rivosecchi Prof. Dott. Leo | – Roma | 1987 - 2003 |
| Rotundo Prof. Dott. Giuseppe | – Campobasso | 1999 - 2010 |
| Santini Prof. Dott. Luciano | – Pisa | 1993 - 2000 |
| Sbordoni Prof. Dott. Valerio | – Roma | 1986 |
| Solinas Prof. Dott. Mario | – Perugia | 1978 |
| Süss Prof. Dott. Luciano | – Milano | 1987 - 1993 |
| Vigna Taglianti Prof. Dott. Augusto | – Roma | 1986 - 1994 |
| Zangheri Prof. Dott. Sergio ([3]) | – Padova | 1970 - 1977 |

## ACCADEMICI ORDINARI

| | | |
|---|---|---|
| Alma Prof. Dott. Alberto | – Torino | 2007 - 2013 |
| Audisio Prof. Paolo Aldo | – Napoli | 2004 - 2015 |
| Battisti Prof. Andrea | – Padova | 2010 - 2014 |
| Binazzi Dott. Andrea | – Firenze | 1998 - 2012 |
| Bologna Prof. Dott. Marco | – Roma | 2001 - 2008 |
| Brandmayr Prof. Dott. Pietro | – Rende (CS) | 2005 - 2014 |
| Casale Prof. Dott. Achille | – Sassari | 1996 - 2002 |
| Cervo Prof. Dott. Rita | – Firenze | 1912 - 2018 |
| Cobolli Prof. Dott. Marina | – Roma | 2001 - 2018 |
| de Lillo Prof. Dott. Enrico | – Bari | 2011 - 2018 |
| Fausto Prof. Dott. Anna Maria | – Viterbo | 2011 - 2016 |
| Floris Prof. Dott. Ignazio | – Sassari | 2011 - 2017 |
| Frati Prof. Dott. Francesco | – Siena | 2011 - 2016 |
| Longo Prof. Dott. Santi | – Catania | 1993 - 2000 |
| Luciano Prof. Dott. Pietro | – Sassari | 2009 - 2014 |
| Maini Prof. Dott. Stefano | – Bologna | 2005 - 2014 |
| Malva Dott. Carla | – Napoli | 2001 - 2011 |
| Massa Prof. Dott. Bruno | – Palermo | 2011 - 2017 |

([1]) † 8 ottobre 2018.
([2]) † 15 luglio 2018.
([3]) † 12 luglio 2018.

| | | |
|---|---|---|
| Mazzini Prof. Dott. Massimo | – Viterbo | 2000 |
| Minelli Prof. Dott. Alessandro | – Padova | 1986 - 1993 |
| Nannelli Dott. Roberto | – Firenze | 1998 - 2005 |
| Pellizzari Prof. Dott. Giuseppina | – Padova | 2011 - 2018 |
| Pennacchio Prof. Dott. Francesco | – Napoli | 2001 - 2007 |
| Poggi Dott. Roberto | – Genova | 1989 - 1999 |
| Rapisarda Prof. Dott. Carmelo | – Catania | 2005 - 2012 |
| Roversi Prof. Dott. Pio Federico | – Firenze | 2008 |
| Russo Prof. Dott. Agatino | – Catania | 2011 - 2017 |
| Tranfaglia Prof. Dott. Antonio | – Potenza | 1993 - 1999 |
| Triggiani Prof. Dott. Oreste | – Bari | 2001 - 2012 |
| Turillazzi Prof. Dott. Stefano | – Firenze | 1989 - 2000 |

## ACCADEMICI ONORARI

| | | |
|---|---|---|
| Altieri Prof. Miguel Angel | – Berkeley (California, USA) | 2004 |
| Beutel Prof. Dott. Rolf G. | – Jena (Germania) | 2018 |
| Gatehouse Prof. Angharad M.R. | – Newcastle (U.K.) | 2015 |
| Harris Dott. Keit Murray | – Ripley, Woking (U.K.) | 2002 |
| Hodek Prof. Dott. Ivo | – Ceské Budejovice (Repubblica Ceca) | 1986 |
| Lenteren Prof. Dott. Johan Coert van | – Wageningen (Olanda) | 2006 |
| Stroyan Dott. Henry L.G. ([1]) | – Harpenden (U.K.) | 1998 |
| Tautz Prof. Dott. Jürgen | – Würzburg (Germania) | 2006 |
| Wilson Prof. Edward O. | – Birmingham (Alabama, USA) | 2011 |

## ACCADEMICI STRAORDINARI

| | | |
|---|---|---|
| Ballerio Dott. Alberto | – Brescia | 2015 |
| Balletto Prof. Dott. Emilio | – Torino | 2016 |
| Bandi Prof. Dott. Claudio | – Milano | 2015 |
| Biondi Prof. Dott. Maurizio | – L'Aquila | 2012 |
| Bosco Prof. Dott. Domenico | – Torino | 2015 |
| Burgio Prof. Dott. Giovanni | – Bologna | 2018 |
| Colazza Prof. Dott. Stefano | – Palermo | 2013 |
| Conti Prof. Dott. Eric | – Perugia | 2018 |
| Cristofaro Dott. Massimo | – Roma | 2014 |
| Dapporto Prof. Dott. Leonardo | – Firenze | 2018 |
| Digilio Prof. Dott. Maria Cristina | – Napoli | 2015 |
| Di Palma Prof. Dott. Antonella | – Foggia | 2014 |
| Duso Prof. Dott. Carlo | – Padova | 2016 |
| Gargiulo Prof. Dott. Giuseppe | – Bologna | 2013 |
| Garonna Prof. Dott. Antonio Pietro | – Napoli | 2016 |
| Germinara Prof. Giacinto Salvatore | – Foggia | 2014 |
| Isidoro Prof. Dott. Nunzio | – Ancona | 2013 |
| Lucchi Prof. Dott. Andrea | – Pisa | 2015 |
| Mazzoni Prof. Dott. Emanuele | – Piacenza | 2018 |
| Nazzi Prof. Dott. Francesco | – Udine | 2012 |
| Pantaleoni Prof. Dott. Roberto | – Sassari | 2016 |
| Ricci Prof. Dott. Carlo ([2]) | – Perugia | 2016 |
| Romani Prof. Dott. Roberto | – Perugia | 2018 |
| Simoni Dott. Sauro | – Firenze | 2018 |
| Siscaro Prof. Dott. Gaetano | – Catania | 2018 |
| Tavella Prof. Dott. Luciana | – Torino | 2018 |
| Tsolakis Prof. Dott. Haralabos | – Palermo | 2018 |
| Vanin Prof. Dott. Stefano | – Huddersfield (UK) | 2018 |
| Zapparoli Prof. Dott. Marzio | – Viterbo | 2012 |

([1]) † 5 ottobre 2018.
([2]) † 1 novembre 2018.
N.B. - Per gli Accademici Emeriti ed Ordinari le date sono rispettivamente quelle della nomina ad Accademico Straordinario e ad Accademico Ordinario.

# 8 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2017: 9-49*

# VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 23-24 FEBBRAIO 2018

Presiede il Presidente Prof. Romano DALLAI
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero CRAVEDI

## SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 23 febbraio 2018, alle ore 14:30, a Firenze in via de' Pecori 6/8 presso la Sala Convegni della Banca "Monte dei Paschi di Siena", come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti*: P. CRAVEDI, R. DALLAI, B. GIORDANA, V. GIROLAMI, S. RAGUSA DI CHIARA;
*Ordinari*: A. ALMA, I. FLORIS P. LUCIANO, B. MASSA, R. NANNELLI, G. NUZZACI, R. POGGI, P.F. ROVERSI, A. RUSSO;
*Straordinari*: E. BALLETTO, M. BIONDI, R. CERVO, M. CRISTOFARO, E. DE LILLO, C. DIGILIO, A. DI PALMA, G. GARGIULO, G.S. GERMINARA, F. NAZZI, G. PELLIZZARI, M. ZAPPAROLI

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. ARZONE, S. BARBAGALLO, P. BARONIO, A.M. BONVICINI PAGLIAI, G. BRIOLINI, L. BULLINI, M.V. COVASSI, F. FRILLI, L. MASUTTI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, M. OLMI, G. OSELLA, L. RIVOSECCHI, L. SANTINI, V. SBORDONI, M. SOLINAS, L. SÜSS, S. ZANGHERI. *Ordinari*: P.A. AUDISIO, A. BATTISTI, A. BINAZZI, M. A. BOLOGNA, P. BRANDMAYR, A. CASALE, G. DELRIO, A. M. FAUSTO, F. FRATI, G. GASPERI, S. LONGO, S. MAINI, C. MALVA, M. MAROLI, M. MAZZINI, A. MINELLI, F. PENNACCHIO, C. RAPISARDA, O. TRIGGIANI, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI. *Straordinari*: A. BALLERIO, M. BIONDI, M. COBOLLI S. COLAZZA, C. DUSO, A.P. GARONNA, N. ISIDORO, R. PANTALEONI, A. LUCCHI.

Alla Seduta Pubblica sono presenti anche numerosi ricercatori e studiosi ospiti dell'Accademia

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

*"Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale"*

Il Presidente Romano DALLAI apre la Seduta Pubblica e invita l' Accademico Pio Federico ROVERSI, organizzatore della Tavola Rotonda, a coordinare i lavori.

Si susseguono gli interventi:

– Accademico Pio Federico ROVERSI: introduzione
– Dott.ssa Silvia LANDI, CREA-DC Firenze – *Embriologia e crioconservazione di insetti*
– Dott. Maurizio LAMBARDI, CNR Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree – *La crioconservazione di specie arboree dal laboratorio alla criobanca*
– Dott. Sauro SIMONI, CREA-DC Firenze – *Conservazione a basse temperature di Acari utilizzabili per il controllo biologico*
– Dott. Gian Paolo BARZANTI, CREA-DC Firenze – *Tecniche per la crioconservazione di microrganismi entomopatogeni*
– Dott.ssa Silvia LANDI, CREA-DC Firenze – *Temperature ultrabasse e protocolli cryo per la costituzione di collezioni viventi di Nematodi entomopatogeni*

Segue un'interessante discussione, coordinata dall'Accademico Pio Federico Roversi, al termine della quale la Seduta si conclude alle ore 18,00.

I testi delle relazioni verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2018 dell'Accademia.

*Il Segretario* — Piero Cravedi

*Il Presidente* — Romano Dallai

## ASSEMBLEA PLENARIA

Presiede il Presidente Prof. Romano Dallai
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero Cravedi

Sabato 24 febbraio 2018 alle ore 9:30, a Firenze Cascine del Riccio, via Lanciola 12/A come da convocazione del Presidente iniziano i lavori dell'Assemblea Plenaria.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti*: S. Barbagallo, M.V. Covassi, P. Cravedi, R. Dallai, B. Giordana, V. Girolami, L. Masutti, M. Olmi, S. Ragusa di Chiara, L. Santini, M. Solinas L. Süss;
*Ordinari*: A. Alma, A. Battisti, A. Binazzi, A. Casale, I. Floris, F. Frati, P. Luciano, M. Maroli, B. Massa, M. Mazzini, A. Minelli, R. Nannelli, G. Nuzzaci, F. Pennacchio, R. Poggi, P.F. Roversi, A. Russo, S. Turillazzi;
*Straordinari*: A. Ballerio, M. Biondi, R. Cervo, M. Cristofaro, E. De Lillo, C. Digilio, A. Di Palma, G. Gargiulo, G. S. Germinara, A. Lucchi, B. Massa, F. Nazzi, G. Pellizzari, M. Zapparoli.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. Arzone, P. Baronio, A.M. Bonvicini Pagliai, G. Briolini, L. Bullini, F. Frilli, E. Mellini, G. Mineo, R. Monaco, G. Osella, L. Rivosecchi, V. Sbordoni, S. Zangheri. *Ordinari*: P.A. Audisio, M. A. Bologna, P. Brandmayr, G. Delrio,A. M. Fausto, G. Gasperi, S. Longo, S. Maini, C. Malva, C. Rapisarda, G. Rotundo, O.Triggiani, A. Vigna Taglianti. *Straordinari*: E. Balletto, M. Cobolli, S. Colazza, C. Duso, A.P. Garonna, N. Isidoro, R. Pantaleoni

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti
2) Comunicazioni del Presidente
3) Proclamazione e consegna Diplomi ai nuovi Accademici Ordinari
4) Fauna d'Italia
5) Varie ed eventuali

### 1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti

Vengono esaminati i verbali delle Sedute Pubbliche di venerdì 17 e sabato 18 novembre e della Assemblea Plenaria del 18 novembre 2017 tenutesi a Napoli, già inviati a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici.

I verbali vengono approvati all'unanimità.

### 2) Comunicazioni del Presidente

Il Presidente ringrazia l'Accademico Pio Federico Roversi per l'interessante Tavola Rotonda sulla crioconservazione per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale,

che si è svolta nel pomeriggio di ieri. Coglie quindi l'occasione per ricordare l'opportunità di organizzare anche in altre sedi iniziative culturali di interesse generale. Oltre a quella di ieri, il Presidente cita la Tavola Rotonda sull'Entomologia forense coordinata dal Prof. Stefano VANIN a Napoli nel novembre scorso. Tali eventi hanno rilevante importanza per rendere maggiormente visibile l'attività della nostra Accademia.

Il Presidente richiama l'attenzione sul programma delle attività culturali previste per il 2018 e per il 2019, già discusso nell'Assemblea plenaria dello scorso novembre, ma che merita alcuni aggiornamenti.

GIUGNO 2018

Nella Seduta Pubblica di venerdì 8 giugno è prevista la Tavola Rotonda su "Nuovi approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario" coordinata dall'Accademico Giuliano GASPERI.

Nella Seduta pubblica di sabato 9 giugno è prevista la lettura dell'Accademico Emilio BALLETTO su "Mirmecofilia nelle farfalle diurne europee".

LUGLIO 2018

Dal 2 al 6 luglio si terrà a Napoli il Congresso Europeo di Entomologia organizzato congiuntamente con la Società Entomologica Italiana.

NOVEMBRE 2018

Nella Seduta Pubblica di venerdì 16 novembre è prevista la Tavola Rotonda su "Estinzioni globali ed estinzioni locali" coordinata dagli Accademici Emilio BALLETTO e Achille CASALE.

Nella Seduta pubblica di sabato 17 novembre è prevista la lettura dell'Accademico Roberto PANTALEONI su " Il nemico condiviso e l'entomologia applicata".

L'Accademico Roberto NANNELLI commemorerà l'Accademica Fausta PEGAZZANO.

FEBBRAIO 2019

Nelle Sedute Pubbliche si prevede che verrà tenuta una Tavola Rotonda sulla cimice asiatica, a cura dell'Accademico Alberto ALMA e della Prof.ssa Luciana TAVELLA, e una lettura su "Gli ortotteri ipogei del genere *Troglophilus*: ecologia ed evoluzione" a cura dell'Accademica Marina COBOLLI.

GIUGNO 2019

Nella Seduta Pubblica del venerdì pomeriggio è prevista la Tavola Rotonda su "Avversità dell'eucalipto in ambiente mediterraneo" coordinata dall'Accademico Ignazio FLORIS.

La Seduta Pubblica del sabato sarà dedicata alla lettura dell'Accademico Vincenzo GIROLAMI sulle simbiosi dei Ditteri Tripetidi e alla commemorazione dell'Accademica Emerita Maria Matilde PRINCIPI a cura dell'Accademico Roberto PANTALEONI

NOVEMBRE 2019

Nel novembre è prevista una Tavola Rotonda sulle "Nuove Tecnologie nella difesa delle derrate" a cura dell'Accademico Salvatore GERMINARA.

Nella lettura del sabato, gli Accademici Massimo CRISTOFARO ed Enrico DE LILLO tratteranno "Il controllo dell'ailanto".

Su invito del Presidente, l'Accademico Ordinario Ignazio Floris espone il progetto di attività nel settore dell'apicoltura, approvato dall'"Eva Crane Trust", che prevede l'organizzazione a Sassari, tra la fine di novembre e l'inizio di dicembre 2019, di un Convegno dal titolo preliminare "L'Apicoltura italiana". La nostra Accademia sarà tra gli enti Organizzatori.

L'Assemblea esprime apprezzamento per l'iniziativa.

L'Accademico FLORIS si impegna a tenere informata l'Accademia dei progressi nell'organizzazione di tale importante attività culturale.

Chiesta e ottenuta la parola l'Accademico Emerito Salvatore RAGUSA DI CHIARA comunica che dal 13 al 17 luglio 2020 si svolgerà a Bari il IX Simposio dell'Associazione Europea degli Acarologi (EURAAC) di cui è Presidente. L'importante evento vedrà impegnati molti altri colleghi Accademici. L'Accademico RAGUSA chiede che la nostra Accademia conceda il suo Patrocinio.

In considerazione dell'elevato valore scientifico dell'evento l'Assemblea esprime apprezzamento per il prestigioso impegno affidato agli Acarologi italiani ed è lieta di concedere il Patrocinio.

Su invito del Presidente l'Accademico Roberto NANNELLI, Responsabile delle Pubblicazioni, comunica che, come programmato, è in corso di preparazione il volume degli Atti relativo al 2017 e le monografie relative alle Tavole Rotonde svolte nel corso dell'anno. Poiché il finanziamento assegnato dal Ministero dei Beni Ambientali, Culturali e del Turismo per l'attività 2017 risulta sufficiente per pubblicare almeno due monografie di interesse applicativo, una monografia riguarderà "La protezione integrata delle colture: problemi ricorrenti, soluzioni e nuove idee". L'altra monografia intitolata "Gli Artropodi del suolo: diversità e biocenosi" comprenderà i numerosi contributi sui principali gruppi di artropodi viventi nel suolo, evidenziando così la straordinaria ricchezza di biodiversità di questo ambiente. L'Accademia ha voluto dedicare questa giornata culturale ad un tema assai caro al nostro compianto accademico emerito, Prof. Marcello LA GRECA, maestro di molti di noi, ricordando il suo impegno costante per l'affermazione di una concezione moderna della Biologia della Conservazione.

Il volume degli Atti e le due monografie devono essere completate e pubblicate prima della Assemblea di giugno per poter rendicontare la spesa sostenuta con il finanziamento del MIBACT, per cui il Curatore delle pubblicazioni sollecita coloro che ancora non hanno completato e inviato il loro contributo ad affrettarsi.

3) Proclamazione e consegna Diplomi nuovi Accademici Ordinari.

Il Presidente consegna i Diplomi ai nuovi Accademici Ordinari Bruno MASSA, Ignazio FLORIS e Agatino RUSSO.

L'Assemblea si congratula con i nuovi Ordinari, accogliendoli con un caloroso applauso.

4) Fauna d'Italia

Su invito del Presidente prende la parola il Segretario Tesoriere del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia, Accademico Marzio ZAPPAROLI, che comunica che, nel periodo successivo alla seduta del Novembre 2017 a Napoli, l'attività del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia si è articolata come segue:

1. Volume 52, Hymenoptera Symphyta I, autore Fausto PESARINI: sono state consegnate le bozze corrette in data 16 novembre 2017. È stata predisposta una ulteriore bozza per alcuni problemi sulle figure. La stampa, precedentemente prevista entro il 2017, è dovuta slittare per motivi non noti al Comitato. La Casa Editrice, più volte sollecitata in proposito, non ha ancora fornito ragguagli sullo stato delle cose. Si ricorda che questo volume sarà stampato con parziale contributo del CSFI.

2. Volume 53, Lepidoptera Coleophoridae, autore Giorgio BALDIZZONE, il testo completo e tutte le figure sono state consegnate al CSFI nel Novembre 2017. Un CD Rom con testo e figure è in arrivo al Comitato. Si prevede di consegnare il CD Rom all'Editore per la stampa che verrà effettuata nel 2018. Anche questo volume sarà stampato con parziale contributo del CSFI.

3. Per il 2018 sono in preparazione i seguenti volumi della Collana Fauna d'Italia:

– Lepidoptera "Rhopalocera" (autori l'Accademico Emilio BALLETTO *et al.*). Dopo la presentazione al Comitato di una bozza della parte generale di una prima parte di Sistematica, que-

sto volume è in fase avanzata di preparazione e sarà consegnato per le stampe nell'autunno 2018. Tutor del volume sono gli Accademici Achille CASALE e Marzio ZAPPAROLI.
– Homoptera Psylloidea (autore l'Accademico Carmelo RAPISARDA *et al*.): il lavoro di revisione e aggiornamento del testo e la sua integrale stesura in lingua inglese procedono; confidiamo di avere tutto il materiale pronto per la prossima estate. Tutor del volume è l'Accademico Bruno MASSA.

Per gli anni successivi sono in preparazione i seguenti volumi:

– Cnidaria Scyphozoa (autori Fernando BOERO *et al*.);
– Plathelminthes Turbellaria (pars) (autori Marco CURINI GALLETTI *et al*.);
– Dermaptera (autori l'Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI *et al*.).

4. La preparazione della nuova "Checklist della fauna italiana" in formato solo online sta proseguendo a cura di un gruppo di lavoro ristretto del CSFI (dapprima costituito da BOLOGNA, OLIVERIO, ZAPPAROLI, successivamente ampliato a MINELLI e BONATO). Una riunione organizzativa di questo gruppo si è svolta a fine Novembre 2017. L'iter per un assegno di ricerca a cura del CNR su fondi LifeWatch, la cui conclusione era prevista per Marzo 2017 e poi per fine Novembre 2017 non è ancora terminato e andato a buon fine. Gli Enti preposti (CNR, LifeWatch), continuativamente sollecitati dal CSFI fino al febbraio 2018, assicurano che il bando sarà pubblicato nei tempi brevi. IL CSFI auspica che ciò possa avvenire entro Marzo-Aprile 2018.

5. Il CSFI continua il lavoro in convenzione con ISPRA per il monitoraggio delle specie alloctone invasive in Italia. Un borsista è attivo su questo tema la cui prima fase si è conclusa a dicembre 2017. La seconda fase si concluderà a Giugno 2018.

5) Varie ed eventuali

Nessuna

La seduta dell'Assemblea Plenaria è tolta alle ore 10:10.

*Il Segretario* — Piero CRAVEDI
*Il Presidente* — Romano DALLAI

SEDUTA PUBBLICA

Sabato 24 febbraio 2018 alle ore 10:15, presso la propria sede in via Lanciola 12/A Cascine del Riccio Firenze il Presidente Romano DALLAI dichiara aperta la Seduta Pubblica.

Oltre agli Accademici presenti all'Assemblea Plenaria, partecipano altri numerosi studiosi e ricercatori ospiti dell'Accademia.

Il Presidente Romano DALLAI invita l'Accademico Giuseppe GARGIULO a presentare la lettura dal titolo:

*"Interazione ospite-parassitoide: analisi dei fattori di virulenza nel modello Drosophila"*

Segue un'interessante discussione, al termine della quale il Presidente ringrazia il relatore e coloro che sono intervenuti.

Il testo della lettura sarà pubblicato sugli Atti-Rendiconti 2018.

La Seduta è tolta alle ore 10:55.

*Il Segretario* — Piero CRAVEDI
*Il Presidente* — Romano DALLAI

## ASSEMBLEA ORDINARIA

Presiede il Presidente Prof. Romano Dallai
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero Cravedi

Sabato 24 febbraio 2018 alle ore 11:30, presso la propria sede in via Lanciola 12/A Cascine del Riccio Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea Ordinaria alla presenza degli Accademici:

*Emeriti*: S. Barbagallo, M.V. Covassi, P. Cravedi, R. Dallai, B. Giordana, V. Girolami, L. Masutti, M. Olmi, S. Ragusa di Chiara, L. Santini, M. Solinas, L. Süss.
*Ordinari*: A. Alma, A. Battisti, A. Binazzi, A. Casale, F. Frati, P. Luciano, M. Maroli, B. Massa, M. Mazzini, A. Minelli, R. Nannelli, G. Nuzzaci, M. Olmi, F. Pennacchio, R. Poggi, P.F. Roversi, A. Russo, S. Turillazzi.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. Arzone, P. Baronio, A.M. Bonvicini Pagliai, G. Briolini, L. Bullini, F. Frilli, E. Mellini, G. Mineo, R. Monaco, G. Osella, L. Rivosecchi, V. Sbordoni, S. Zangheri. *Ordinari*: P.A. Audisio, M.A. Bologna, P. Brandmayr, G. Delrio, A. M. Fausto, G Gasperi, S. Longo, S. Maini, C. Malva, C. Rapisarda, G. Rotundo,O. Triggiani, A. Vigna Taglianti.

Il Presidente chiede all'Assemblea che alla discussione del punto 3) Proposta di modifica dello Statuto sia ammessa la presenza dell'Accademico Straordinario Avv. Alberto Ballerio, per fornire eventuali chiarimenti di natura legale. L'Assemblea esprime all'unanimità il proprio parere favorevole.

Viene quindi discusso il seguente Ordine del giorno:

1) Approvazione del verbale della seduta precedente.
2) Comunicazioni del Presidente.
3) Proposta di modifica di Statuto
4) Esame e approvazione del Conto Consuntivo anno finanziario 2017
5) Votazione per l'elezione di nuovo Accademico Onorario
6) Votazione per l'elezione di nuovi Accademici Ordinari
7) Votazione per l'elezione di nuovi Accademici Straordinari
8) Votazione per la conferma degli Accademici Straordinari in scadenza di quinquennio
9) Votazione per l'elezione di nuovi Revisori dei conti
10) Varie ed eventuali.

### 1) Approvazione del verbale seduta precedente

Viene esaminato il verbale della Seduta Ordinaria del 18 novembre 2017, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici.

Il verbale viene approvato all'unanimità.

### 2) Comunicazioni del Presidente

Il Presidente, a norma dell'art.7 del Regolamento, comunica che la disponibilità di posti nelle diverse categorie di Accademici, al 30 aprile 2018 è la seguente:
– per Accademico Onorario posti liberi 1
– per Accademico Ordinario posti liberi 5
– per Accademici Straordinari posti liberi 6

Ciascuna proposta fatta da almeno tre Accademici Ordinari o Emeriti, accompagnata da una breve relazione sui meriti scientifici e accademici dei candidati deve pervenire al Presidente dell'Accademia entro il 30 aprile 2018, secondo quanto previsto dall'art. 12 dello Statuto.

3) Proposta di modifica dello Statuto

All'Assembla viene ammesso l'Accademico Straordinario Alberto BALLERIO per fornire eventuali chiarimenti di natura legale.

Il Presidente ricorda che, come comunicato nel messaggio del 30 gennaio scorso inviato a tutti gli Accademici Ordinari ed Emeriti, il Consiglio di Presidenza ha preso in considerazione le modifiche suggerite e, grazie alla preziosa consulenza del nostro Accademico Straordinario Avv. Alberto BALLERIO, è stata preparata una nuova proposta di modifica di Statuto. Il testo preliminare è stato allegato a tale messaggio con la richiesta di eventuali altre osservazioni. I commenti pervenuti sono stati recepiti e attualmente, con l'aiuto dell'Accademico BALLERIO, è in corso la stesura aggiornata della proposta di modifica dello Statuto e il conseguente adeguamento del Regolamento. Il Presidente richiama l'attenzione dell'Assemblea sui punti caratterizzanti delle modifiche di Statuto proposte. Una spiegazione delle principali modifiche verrà inviata a tutti gli Accademici Ordinari ed Emeriti con la richiesta di fornire il loro consenso, adeguatamente firmato. Secondo quanto previsto dall'articolo 23 dello Statuto attualmente in vigore, lo Statuto può essere modificato a seguito di proposta sottoscritta da almeno un terzo dei membri aventi diritto e approvata in una Assemblea, a questo scopo convocata, alla presenza di un notaio, con un numero di voti non minore dei due terzi del numero degli Accademici presenti. L'adunanza non sarà valida se non saranno presenti almeno i due terzi degli Accademici Ordinari, comprese eventuali deleghe.

4) Esame e approvazione Conto Consuntivo anno finanziario 2017

Il Presidente invita il Tesoriere ROBERTO NANNELLI, a presentare il Conto Consuntivo per l'anno finanziario 2017.

Il Tesoriere fa presente che il 14 febbraio scorso si è riunito presso il CREA-DC, Centro di Ricerca per la difesa e la certificazione di Cascine del Riccio, sede anche dell'Accademia, il Collegio dei Revisori dei Conti per l'analisi e l'approvazione del Bilancio preventivo 2018 e il Conto consuntivo 2017.

Il Tesoriere illustra quindi all'Assemblea i principali capitoli del Conto consuntivo evidenziando il buon incremento in questi ultimi due anni del contributo assegnato dal MIBACT; per l'attività culturale svolta dall'Accademia nel 2017; il Tesoriere fa presente che è pervenuto alla fine del mese di ottobre un contributo di 11.500 Euro e un altro piccolo incremento è stato annunciato per i primi mesi del 2018. Tale finanziamento deve essere rendicontato entro la fine del mese di giugno. La maggior parte del finanziamento sarà impegnato per le pubblicazioni e per il rimborso delle spese di viaggio e soggiorno dei relatori stranieri intervenuti nelle Tavole Rotonde.

Il Tesoriere informa anche che nel mese di aprile, secondo quanto era stato deliberato dall'Assemblea di febbraio 2017, il fondo inalienabile dell'Accademia di 50.000 Euro è stato reinvestito in titoli bancari senza rischio insieme ad una parte del Fondo "Marco Osella" (20.000 Euro) giacente sul conto corrente, in maniera da realizzare una piccola reddita da impiegare nell'attività accademica. Resta invece inalterata la giacenza sul conto corrente del Fondo "Marcello La Greca" (25.000 Euro) destinato per le attività della Scuola di Alta Formazione.

Completata l'illustrazione e non essendovi richieste di ulteriori dettagli, il Presidente pone in votazione il Conto consuntivo 2017 che viene approvato all'unanimità e che verrà conservato agli atti insieme al Bilancio preventivo 2018.

Il Tesoriere informa l'Assemblea che nel mese di gennaio è stata presentata al MIBACT richiesta di finanziamento per l'attività culturale 2018.

L'Assemblea non pone rilievi e approva all'unanimità.

5) Votazione per l'elezione di nuovo Accademico Onorario

Il Presidente ricorda che al 30 aprile 2017 era libero un posto di Accademico Onorario e che entro tale data è pervenuta, a norma di Statuto (art. 12) la proposta di nomina del Prof. Rolf Georg BEUTEL dell'Università Friedrich-Schiller di Jena presentato dagli Accademici Francesco FRATI, Alessandro MINELLI e Francesco PENNACCHIO.

Il Presidente, verificata, come disposto dall'Articolo 13 dello Statuto, la presenza della maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari, dichiara valida la seduta.

Vengono designati gli Accademici M. MAROLI e R. POGGI quali scrutatori per questa e per le altre votazioni previste per la presente seduta.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del Prof. Rolf Georg BEUTEL: Come previsto dall'art. 12 c.2 dello Statuto, l'Accademico Alessandro MINELLI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del Prof. Rolf G. BEUTEL.

La candidatura raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama il Prof. Rolf Georg BEUTEL Accademico Onorario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia.

6) Votazione per l'elezione di nuovi Accademici Ordinari

A norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Articolo 7), a fronte di 6 posti disponibili per Accademico Ordinario sono pervenute entro il 30 aprile 2017 quattro proposte per nuovi Accademici per essere votate nell'Assemblea Ordinaria di febbraio 2018.

Le quattro proposte per nuovi Accademici Ordinari riguardano gli Accademici Straordinari:

– Rita CERVO, presentata dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Ignazio FLORIS e Pietro LUCIANO;
– Marina COBOLLI, presentata dagli Accademici Marco A. BOLOGNA, Anna Maria FAUSTO e Paolo AUDISIO;
– Enrico DE LILLO, presentato dagli Accademici Giorgio NUZZACI, Mario SOLINAS e Giuseppe ROTUNDO;
– Giuseppina PELLIZZARI, presentata dagli Accademici Andrea BATTISTI, Sebastiano BARBAGALLO e Alessandro MINELLI.

Il Presidente, verificata, come disposto dall'Articolo13 dello Statuto, la presenza della maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari, dichiara valida l'Assemblea.

a) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademica Straordinaria Rita CERVO. Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto l'Accademico Ordinario Ignazio FLORIS illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici della candidata.
   La candidata raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Rita CERVO eletta e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei beni e delle attività culturali e del turismo per la nomina ad Accademica Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte del Presidente della Repubblica.
b) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico Straordinario Enrico DE LILLO. Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto l'Accademico Ordinario Giorgio NUZZACI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.
   Il Candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Enrico DE LILLO eletto e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei beni e delle attività culturali e del turismo per la nomina ad Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte del Presidente della Repubblica.
c) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademica Straordinaria Marina COBOLLI. Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto l'Accademico Ordinario

Alessandro MINELLI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici della candidata.
La candidata raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Marina COBOLLI eletta e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei beni e delle attività culturali e del turismo per la nomina ad Accademica Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte del Presidente della Repubblica.

d) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademica Straordinaria Giuseppina PELLIZZARI: Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto l'Accademico Ordinario Andrea BATTISTI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici della candidata.
La candidata raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Giuseppina PELLIZZARI eletta e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei beni e delle attività culturali e del turismo per la nomina ad Accademica Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia.

7) Votazioni per elezione nuovi Accademici Straordinari.

A norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Articolo 7), a fronte di 7 posti per Accademico Straordinario, sono pervenute entro il 30 aprile 2017 le seguenti 5 proposte per nuovi Accademici Straordinari per essere votate nell'Assemblea di novembre 2016.

– prof. Eric CONTI, presentato dagli Accademici Giorgio NUZZACI, Mario SOLINAS e Luciano SÜSS;
– dott. Leonardo DAPPORTO, presentato dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Francesco PENNACCHIO e Francesco FRATI;
– dott. Sauro SIMONI, presentato dagli Accademici Pio Federico ROVERSI, Pietro LUCIANO e Andrea BATTISTI;
– prof. Haralabos TSOLAKIS, presentato dagli Accademici Salvatore RAGUSA DI CHIARA, Giorgio NUZZACI e Luciano SÜSS;
– prof. Stefano VANIN, presentato dagli Accademici Augusto VIGNA TAGLIANTI, Anna Maria FAUSTO e Paolo AUDISIO;

Il Presidente, verificata, come disposto dall'Articolo 13 dello Statuto, la presenza della maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari, dichiara valida l'Assemblea.

– Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del prof. Eric CONTI.

Come previsto dall'Articolo 12c.2, l'Accademico Emerito Mario SOLINAS, illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Eric CONTI Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2018-2022.

– Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del dott. Leonardo DAPPORTO.

Come previsto dall'Articolo 12c.2, l'Accademico Ordinario Francesco FRATI, illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il Candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Leonardo DAPPORTO Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2018-2022.

– Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del dott. Sauro SIMONI.

Come previsto dall'Articolo 12c.2, l'Accademico Ordinario Pietro LUCIANO illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Sauro SIMONI Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2018-2022.

– Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del prof. Haralabos TSOLAKIS.

Come previsto dall'Articolo 12c.2, l'Accademico Emerito Salvatore RAGUSA DI CHIARA illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Haralabos TSOLAKIS Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2017-2021.

– Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del prof. Stefano VANIN.

Come previsto dall'Articolo 12c.2, l'Accademico Ordinario Roberto POGGI illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Stefano VANIN Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2017-2021.

8) Votazione per la conferma degli Accademici Straordinari in scadenza di quinquennio

Il Presidente informa che per gli Accademici Straordinari Maurizio BIONDI, Francesco NAZZI e Marzio ZAPPAROLI è scaduto il quinquennio di appartenenza.

Il Presidente, verificato, come disposto dall'Articolo 13 dello Statuto, la presenza della maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari dichiara valida l'Assemblea.

– Viene posta in votazione a scrutinio segreto la conferma dell'Accademico Straordinario Maurizio BIONDI.

Come previsto dall'Articolo 10 del Regolamento, il Presidente ricorda all'Assemblea l'impegno scientifico, l'interesse e la partecipazione attiva dimostrata dal confermando e il desiderio espresso dal medesimo di poter continuare in futuro.

Il candidato raggiunge il quorum previsto e il Presidente lo proclama confermato per il quinquennio 2018-2022.

– Viene posta in votazione a scrutinio segreto la conferma dell'Accademico Straordinario Francesco NAZZI.

Come previsto dall'Articolo 10 del Regolamento, il Presidente ricorda all'Assemblea l'impegno scientifico, l'interesse dimostrato del confermando e il desiderio espresso dal medesimo di poter continuare in futuro.

Il Candidato raggiunge il quorum previsto e il Presidente lo proclama confermato per il quinquennio 2018-2022.

– Viene posta in votazione a scrutinio segreto la conferma dell'Accademico Marzio ZAPPAROLI.

Come previsto dall'Articolo 10 del Regolamento, il Presidente ricorda all'Assemblea l'impegno scientifico, l'interesse dimostrato e il desiderio espresso dal medesimo di poter continuare in futuro.

Il candidato raggiunge il quorum previsto e il Presidente lo proclama confermato per il quinquennio 2018-2022.

9) Varie ed eventuali

Nessuna

La seduta dell'Assemblea Ordinaria è tolta alle ore 13:10.

*Il Segretario* — Piero CRAVEDI

*Il Presidente* — Romano DALLAI

# VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 8-9 GIUGNO 2018

Presiede il Presidente Prof. Romano DALLAI
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero CRAVEDI

## SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 8 giugno 2018, alle ore 14,30, a Firenze presso la Sala Convegni della Banca "Monte dei Paschi di Siena", via de' Pecori 6/8, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti*: P. CRAVEDI, R. DALLAI, B. GIORDANA, V. GIROLAMI;
*Ordinari*: A. ALMA, P. BRANDMAYR, R. CERVO, G. GASPERI, C. MALVA, M. MAROLI, B. MASSA, A. MINELLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, C. RAPISARDA;
*Straordinari*: E. BALLETTO, M. BIONDI, D. BOSCO, S. COLAZZA, L. DAPPORTO, C. DIGILIO, A. DI PALMA, C. DUSO, G. GARGIULO, G.S. GERMINARA, F. NAZZI, S. SIMONI, M. ZAPPAROLI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. ARZONE, S. BARBAGALLO, P. BARONIO, A.M. BONVICINI PAGLIAI, G. BRIOLINI, M.V. COVASSI, G. DELRIO, F. FRILLI, L. MASUTTI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, M. OLMI, G. OSELLA, S. RAGUSA DI CHIARA, L. RIVOSECCHI, L. SANTINI, V. SBORDONI, M. SOLINAS, L. SÜSS, S. ZANGHERI. *Ordinari*: P.A. AUDISIO, A. BATTISTI, A. BINAZZI, M.A. BOLOGNA, A. CASALE, M. COBOLLI, E. DE LILLO, A. M. FAUSTO, I. FLORIS, F. FRATI, S. LONGO, P. LUCIANO, S. MAINI, M. MAZZINI, G. NUZZACI, G. PELLIZZARI, R. POGGI, G. ROTUNDO, A. RUSSO, P.F. ROVERSI, O. TRIGGIANI, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI. *Straordinari*: A. BALLERIO, E. CONTI, M. CRISTOFARO, A.P. GARONNA, N. ISIDORO, A. LUCCHI, R. PANTALEONI, C. RICCI, H. TSOLAKIS, S. VANIN.

Alla Seduta Pubblica sono presenti anche numerosi ricercatori e studiosi ospiti dell'Accademia.

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

*"Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario"*

Il Presidente Romano DALLAI apre la Seduta Pubblica e invita l'Accademico Giuliano GASPERI a coordinare i lavori.

Si susseguono gli interventi:

– Accademico Giuliano GASPERI: Introduzione
– Ruth Mueller, Polo d'Innovazione di Genomica, Genetica e Biologia - Terni: *Editing population genetics for vector control*
– Marc F. SCHETELIG, Justus Liebig - Universität Giessen: *Gene targeting and editing for pest control*
– Giuseppe SACCONE, Università di Napoli - Federico II: *Sex determination and gene editing in Tephritids, toward biocontrol strategies*
– Bruno ARCÀ, Università di Roma "La Sapienza": *Salivary antigens as epidemiological tools to evaluate human exposure to* Aedes albopictus
– Guido FAVIA, Università di Camerino: *Using microbial symbionts in effective strategies for insect pest control*
– Maurizio CALVITTI, ENEA Roma: *il ruolo di Wolbachia nel controllo della trasmissione di malattie umane trasmesse da zanzare vettori*

Segue un'interessante discussione coordinata dall'Academico Giuliano GASPERI, al termine della quale la Seduta si conclude alle ore 17:45.

I testi delle relazioni verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2018 dell'Accademia.

*Il Segretario* — Piero CRAVEDI

*Il Presidente* — Romano DALLAI

## ASSEMBLEA PLENARIA

Presiede il Presidente Prof. Romano DALLAI
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero CRAVEDI

Sabato 9 giugno 2018 alle ore 09:15, presso la propria sede in via Lanciola 12/A Cascine del Riccio, Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea Plenaria alla presenza degli Accademici:

*Emeriti*: M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, B. GIORDANA, L. MASUTTI, L. SANTINI.
*Ordinari*: A. ALMA, P.A. AUDISIO, A. BATTISTI, M.A. BOLOGNA, P. BRANDMAYR, A. CASALE, R. CERVO, M. COBOLLI, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, F. FRATI, G. GASPERI, S. MAINI, M. MAROLI, B. MASSA, A. MINELLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, C. RAPISARDA, S. TURILLAZZI.
*Straordinari:* A. BALLERIO, E. BALLETTO, M. BIONDI, D. BOSCO, E. CONTI, L. DAPPORTO, C. DIGILIO, A. DI PALMA, G. GARGIULO, G.S. GERMINARA, A. LUCCHI, F. NAZZI, S. SIMONI, M. ZAPPAROLI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. ARZONE, S. BARBAGALLO, P. BARONIO, A.M. BONVICINI PAGLIAI, G. BRIOLINI, G. DELRIO, F. FRILLI, V. GIROLAMI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, M. OLMI, G. OSELLA, S. RAGUSA DI CHIARA, L. RIVOSECCHI, V. SBORDONI, M. SOLINAS, L. SÜSS, S. ZANGHERI. *Ordinari*: A. BINAZZI, E. DE LILLO, S. LONGO, P. LUCIANO, C. MALVA, M. MAZZINI, G. NUZZACI, G. PELLIZZARI, R. POGGI, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, A. RUSSO, O. TRIGGIANI, A. VIGNA TAGLIANTI. *Straordinari:* S. COLAZZA, M. CRISTOFARO, C. DUSO, A.P. GARONNA, N. ISIDORO, R. PANTALEONI, H. TSOLAKIS, S. VANIN.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti (23 e 24 febbraio 2018)
2) Comunicazioni del Presidente
3) Consegna Diplomi ai nuovi Accademici Straordinari
4) Fauna d'Italia
5) Pubblicazioni dell'Accademia
6) Richiesta finanziamenti attività culturale dell'Accademia
7) Varie ed eventuali

1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti (23 e 24 febbraio 2018)

Vengono esaminati i verbali della Seduta Plenaria del 23 febbraio 2018 e delle Sedute Pubbliche del 23 e del 24 febbraio 2018, già inviati a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici. I verbali vengono approvati all'unanimità.

2) Comunicazioni del Presidente

Il Presidente Romano DALLAI ringrazia l'Accademico Giuliano GASPERI per l'interessante Tavola Rotonda sugli aspetti genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti che si è svolta nel pomeriggio di ieri.

Il Presidente comunica poi che la nostra Accademia è stata recentemente accolta a far parte dell'Unione Nazionale per le Scienze Applicate allo Sviluppo dell'Agricoltura (UNASA). L'adesione è stata ufficializzata in occasione dell'inaugurazione dell'Anno Accademico 2018 dell'UNASA, che si è svolta l'11 maggio scorso a Lecce e a cui ha partecipato, per incarico del Presidente, in rappresentanza della nostra Accademia, l'Accademico Ordinario Giorgio NUZZACI.

Il Presidente ricorda che per l'organizzazione del prossimo Congresso Nazionale Italiano di Entomologia erano stati interessati gli Accademici Bruno MASSA, per la sede di Palermo, e Alberto ALMA, per la sede di Torino.

Su invito del Presidente l'Accademico Alberto ALMA, a nome di tutti i colleghi di Entomologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari dell'Università degli Studi di Torino, comunica la disponibilità ad organizzare il prossimo Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Il XXVI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia si svolgerà a Torino dall'8 al 12 giugno 2020. Dopo una breve comunicazione sui contatti istituzionali territoriali avviati, con l'ausilio di una presentazione PowerPoint illustra strutture e aule della sede dell'Ateneo di Torino e del Centro Congressi "Torino Incontra" dove si intende svolgere le attività congressuali.

3) Consegna Diplomi nuovi Accademici Straordinari

Il Presidente consegna i Diplomi ai nuovi Accademici Straordinari E. CONTI, L. DAPPORTO e S. SIMONI.

L'Assemblea si congratula con i nuovi Accademici Straordinari accogliendoli con un caloroso applauso.

4) Fauna d'Italia

L'Accademico M.A. BOLOGNA, Presidente del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia, su invito del Presidente, riferisce che, nel periodo successivo alla seduta del febbraio 2018 a Firenze, l'attività del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia si è articolata come segue:

a) Volume LII, Hymenoptera Symphyta I della Collana Fauna d'Italia, autore Fausto PESARINI: la seconda bozza è stata corretta e riconsegnata all'editore. Si attende, in questi giorni, la stampa del volume. La Casa Editrice è stata sollecitata in tal senso. Questo volume sarà stampato con parziale contributo del CSFI.
b) Volume LIII, Lepidoptera Coleophoridae, autore Giorgio BALDIZZONE: il testo, consegnato a Novembre 2017, è in fase di organizzazione redazionale e vi è stato un ripetuto scambio di comunicazioni con l'editore e l'autore. Si prevede, a breve, la produzione delle bozze. Anche questo volume sarà stampato con parziale contributo del CSFI.
c) Sono in avanzata preparazione i seguenti volumi della stessa collana, che dovrebbero essere consegnati al CSFI entro l'autunno (Psylloidea) e all'inizio del 2019 (Rhopalocera):
   - Homoptera Psylloidea (autore l'Accademico Carmelo RAPISARDA *et al.*): il testo, in lingua inglese, è quasi completato. Gli autori hanno indicato come data di consegna ottobre o novembre 2018. Tutor del volume, che sarà stampato con parziale contributo del CSFI, è l'Accademico Bruno MASSA.
   - Lepidoptera "Rhopalocera" (autori l'Accademico Emilio BALLETTO *et al.*): il testo è praticamente concluso e le figure degli adulti sono quasi complete. Si sta cercando di comple-

tare anche le tavole con le foto delle larve e delle pupe di tutte le specie, attraverso la collaborazione di numerosi fotografi naturalisti ed entomologi italiani. Tutor del volume, che sarà stampato con parziale contributo del CSFI, sono gli Accademici Achille CASALE e Marzio ZAPPAROLI.

Per gli anni successivi sono in preparazione i seguenti volumi:

– Diptera Tachinidae (autori Pierfilippo CERRETTI *et al*.);
– Plathelminthes Turbellaria (pars) (autori Marco CURINI GALLETTI *et al*.);
– Cnidaria Scyphozoa (autori Fernando BOERO *et al*.);
– Dermaptera (autori l'Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI *et al*.).

La preparazione online della nuova "Checklist della fauna italiana" prosegue a cura di un gruppo di lavoro del CSFI. L'iter concorsuale per un assegno di ricerca dedicato al progetto (a cura del CNR su fondi LifeWatch), ha concluso la prima fase e terminerà il 9 luglio 2018 con il colloquio. Il lavoro redazionale potrà quindi iniziare dopo l'estate.

Il CSFI ha terminato il lavoro in convenzione con ISPRA per il monitoraggio delle specie alloctone invasive in Italia ed i prodotti attesi saranno consegnati entro il 30 giugno 2018.

5) Pubblicazioni dell'Accademia

Su invito del Presidente l'Accademico Roberto NANNELLI informa che, come programmato, nel mese di marzo sono stati pubblicati sia in forma cartacea che in versione online, con attivazione sul sito dell'Accademia dei pdf liberi scaricabili, il volume degli Atti e Rendiconti dell'Accademia - Anno LXV (2017) e le tre monografie relative alle Tavole Rotonde tenute in febbraio, giugno e novembre 2017 (monografia n. 29 intitolata "La protezione integrata delle colture: problemi ricorrenti, soluzioni e nuove sfide", monografia n. 30 intitolata "Gli artropodi del suolo: diversità e biocenosi" e monografia n. 31 intitolata "Insect-plant interactions". I costi per la preparazione del volume e dei pdf della versione online sono stati coperti con il finanziamento del MIBACT assegnato nel 2017; purtroppo la disponibilità economica rimanente ha permesso di stampare solo un numero limitato di copie che sono servite per il "deposito obbligatorio" presso le Biblioteche Nazionali Istituzionali, la biblioteca storica del MIPAAF e l'invio ai repertori bibliografici internazionali. Le poche copie rimaste sono a disposizione delle biblioteche universitarie, di musei e di Accademici che ne faranno richiesta. Sia il volume degli Atti sia le tre monografie, in formato pdf, sono state inviate per posta elettronica a tutti gli Accademici.

Per il presente anno è programmata la preparazione del volume degli Atti relativo al 2018 e le monografie relative alle Tavole Rotonde svolte nel 2018, se il Ministero dei Beni Ambientali, Culturali e del Turismo assegnerà all'Accademia un adeguato finanziamento. Sicuramente la stampa delle citate pubblicazioni avverrà nei primi mesi del prossimo anno, ma il curatore delle pubblicazioni invita i rispettivi coordinatori delle Tavole Rotonde a sollecitare i relatori a fornire, entro fine anno, il testo dei loro interventi.

6) Richiesta finanziamenti e attività culturale dell'Accademia

Il Presidente ricorda l'impegno a presentare richiesta di finanziamento al Ministero dei Beni Ambientali, Culturali e del Turismo con il programma triennale delle attività culturali dell'Accademia. Il programma delle attività culturali degli anni 2018 e 2019 è già stato discusso e approvato nell'Assemblea Plenaria del 24 febbraio 2018. Rimane l'impegno di fissare le attività dell'anno 2020 e il Presidente sollecita gli Accademici, particolarmente gli Accademici Straordinari di recente nomina, a segnalare la loro disponibilità. L'invito viene accolto e dopo una breve discussione, da cui emergono iniziative culturali già previste da altre Istituzioni Scientifiche e a cui è opportuno non sovrapporsi, viene completato il programma preliminare per il 2020.

A febbraio 2020 l'Accademico Domenico Bosco si impegna ad organizzare una Tavola Rotonda su "Insetti vettori di agenti fitopatogeni: recenti acquisizioni sui meccanismi di trasmissione di virus e batteri" e l'Accademico Leonardo Dapporto si dichiara disponibile a tenere una lettura.

A giugno 2020 è previsto il XXVI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia a Torino.

A novembre 2020 la Tavola Rotonda riguarderà l'Acarologia e potrà recepire gli aggiornamenti che emergeranno dal IX Simposio dell'Associazione Europea degli Acarologi (Bari 13-17 luglio 2020) di cui l'Accademico Salvatore Ragusa di Chiara è Presidente. La lettura del sabato, sempre su una tematica di Acarologia, viene assegnata all'Accademico Sauro Simoni.

7) Varie ed eventuali

Il Presidente ricorda la recente necessità del'Accademia di recepire le nuove disposizioni sulla Privacy. L'accademico R. Nannelli ha provveduto in merito.

Segnala inoltre il convegno di presentazione della Carta di San Michele all'Adige (Appello per la tutela della biodiversità delle sottospecie autoctone *di Apis mellifera* Linnaeus,1758 in Italia). L'Accademia ha concesso il patrocinio e auspica che gli Accademici aderiscano all'importante iniziativa.

La seduta dell'Assemblea Ordinaria è tolta alle ore 10:00.

*Il Segretario* — Piero Cravedi
*Il Presidente* — Romano Dallai

SEDUTA PUBBLICA

Sabato 9 giugno 2018 alle ore 10:00, presso la propria sede in via Lanciola 12/A Cascine del Riccio, Firenze il Presidente Romano Dallai dichiara aperta la Seduta Pubblica.

Oltre agli Accademici presenti all'Assemblea Plenaria, partecipano altri numerosi studiosi e ricercatori ospiti dell'Accademia.

Il Presidente Romano Dallai invita l'Accademico Emilio Balletto a presentare la lettura dal titolo:

*Mirmecofilia nelle farfalle diurne europee*

Segue un'interessante discussione, al termine della quale il Presidente ringrazia il relatore e coloro che sono intervenuti.

Il testo della lettura sarà pubblicato sugli Atti-Rendiconti 2018.

La Seduta è tolta alle ore 11:00.

*Il Segretario* — Piero Cravedi
*Il Presidente* — Romano Dallai

## ASSEMBLEA ORDINARIA

Presiede il Presidente Prof. Romano DALLAI
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero CRAVEDI

Sabato 9 giugno 2018 alle ore 11:00, a Firenze Cascine del Riccio, via Lanciola 12/A come da convocazione del Presidente iniziano i lavori dell'Assemblea Ordinaria.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti*: M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, B. GIORDANA, L. MASUTTI, L. SANTINI.
*Ordinari*: A. ALMA, P.A. AUDISIO, A. BATTISTI, M.A. BOLOGNA, P. BRANDMAYR, A. CASALE, R. CERVO, M. COBOLLI, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, F. FRATI, G. GASPERI, S. MAINI, M. MAROLI, B. MASSA, A. MINELLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, C. RAPISARDA, S. TURILLAZZI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. ARZONE, S. BARBAGALLO, P. BARONIO, A.M. BONVICINI PAGLIAI, G. BRIOLINI, G. DELRIO, F. FRILLI, V. GIROLAMI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, S. RAGUSA DI CHIARA, L. RIVOSECCHI, V. SBORDONI, M. SOLINAS, L. SÜSS, S. ZANGHERI. *Ordinari*: A. BINAZZI, E. DE LILLO, S. LONGO, P. LUCIANO, S. MAINI, C. MALVA, M. MAZZINI, G. NUZZACI, G. PELLIZZARI, R. POGGI, P.F. ROVERSI, G. ROTUNDO, A. RUSSO, O. TRIGGIANI, A. VIGNA TAGLIANTI.

Viene discusso il seguente ordine del giorno:

1) Approvazione del verbale della seduta precedente (24 febbraio 2018)
2) Comunicazioni del Presidente
3) Modifiche di Statuto e di Regolamento
4) Varie ed eventuali

Per la discussione del punto 3) Modifiche di Statuto e Regolamento, su proposta del Presidente, viene invitato a partecipare, per le sue specifiche competenze, l'Accademico Straordinario Alberto BALLERIO.

### 1) Approvazione del verbale della seduta precedente (24 febbraio 2018

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea Ordinaria di sabato 24 febbraio 2018, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici.

Il verbale viene approvato all'unanimità.

### 2) Comunicazioni del Presidente

Il Presidente comunica che, a norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Articolo 7), a fronte di 1 posto disponibile per Accademico Onorario, 5 posti per Accademico Ordinario e 6 posti per Accademico Straordinario, sono pervenute entro il 30 aprile 2018 le seguenti proposte per nuovi Accademici, che saranno votate nell'Assemblea Ordinaria del novembre 2018:

– Cinque proposte per Accademici Ordinari che riguardano gli Accademici Straordinari:
– Maurizio BIONDI, presentato dagli Accademici Marco A. BOLOGNA, Francesco FRATI e Paolo AUDISIO;
– Stefano COLAZZA, presentato dagli Accademici Bruno MASSA, Salvatore RAGUSA DI CHIARA e Andrea BATTISTI;

– Giuseppe GARGIULO, presentato dagli Accademici Carla MALVA, Francesco PENNACCHIO e Giuliano GASPERI;
– Francesco NAZZI, presentato dagli Accademici Franco FRILLI, Francesco PENNACCHIO e Alessandro MINELLI;
– Marzio ZAPPAROLi, presentato dagli Accademici Marco A. BOLOGNA, Massimo OLMI e Alessandro MINELLI.
– Cinque proposte per Accademici Straordinari che riguardano i professori:
– Giovanni BURGIO, presentato dagli Accademici Stefano MAINI, Giuseppe ROTUNDO e Alberto ALMA;
– Emanuele MAZZONI, presentato dagli Accademici Franco FRILLI, Mario SOLINAS e Luciano SÜSS;
– Roberto ROMANI, presentato dagli Accademici Mario SOLINAS, Vincenzo GIROLAMI e Giorgio NUZZACI;
– Gaetano SISCARO, presentato dagli Accademici Carmelo RAPISARDA, Alberto ALMA e Bruno MASSA;
– Luciana TAVELLA, presentata dagli Accademici Alberto ALMA, Andrea BATTISTI e Agatino RUSSO.

Il Presidente fa presente che hanno completato il quinquennio gli Accademici Straordinari Stefano COLAZZA, Giuseppe GARGIULO, Nunzio ISIDORO.

Gli Accademici S. COLAZZA e G. GARGIULO sono stati proposti per il passaggio alla categoria degli Ordinari. L'Accademico N. ISIDORO dovrà essere confermato a novembre.

3) Modifiche di Statuto e di Regolamento

Alla discussione di questo punto è presente anche l'Accademico Straordinario Alberto BALLERIO.

Il Presidente riprende l'argomento già ripetutamente affrontato per ricordare che in data 12 marzo 2018 ha inviato un messaggio, con allegata una lista sintetica delle modifiche di Statuto, a tutti gli Accademici Emeriti e Ordinari chiedendo di prendere visione del documento inviato a fine gennaio e di inviare il proprio consenso, con firma, alla lista sintetica delle modifiche di Statuto. Le risposte favorevoli pervenute sono state 41, di cui 10 da parte di Accademici Emeriti e 31 di Accademici Ordinari. Gli Accademici Emeriti e Ordinari sono attualmente 61 per cui il numero di quanti hanno sottoscritto la proposte di modifica di Statuto è superiore al terzo degli Accademici aventi diritto, secondo quanto previsto dall'attuale Statuto.

L'Accademia esprime parere favorevole alla prosecuzione dell'iter di modifica dello Statuto.

Su invito del Presidente l'Accademico Alberto BALLERIO riferisce che nella Assemblea Ordinaria del 17 novembre prossimo sarà possibile fare la votazione sulle modifiche di Statuto proposte alla presenza di un Notaio. Già è stato individuato il Notaio Enrico LANZA di Firenze, che ha assicurato la sua disponibilità.

Il Presidente ricorda l'importanza della partecipazione degli Accademici Emeriti e Ordinari e la possibilità, per quanti non potranno essere presenti, di essere rappresentati per delega.

Ricorda inoltre che saranno previste norme transitorie per regolare il passaggio dal vecchio al nuovo Statuto e che il Regolamento verrà adeguato. In merito al Regolamento si segnala la richiesta di alcuni Accademici di modificare le modalità di voto per l'elezione dei nuovi Accademici.

Per il numero sempre limitato dei candidati si propone di non apportare modifiche.

L'Assemblea esprime parere favorevole a mantenere la modalità attuale.

4) Varie ed eventuali

Su invito del Presidente l'Accademico Francesco PENNACCHIO illustra brevemente il buon andamento dell'organizzazione dell'XI Congresso Europeo di Entomologia che si terrà a Napoli dal 2 al 6 luglio 2018.

La seduta dell'Assemblea Ordinaria è tolta alle ore 12:00.

*Il Segretario* — Piero CRAVEDI

*Il Presidente* — Romano DALLAI

# VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 16-17 NOVEMBRE 2018

Presiede il Vice-Presidente Prof. Romano Dallai
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero Cravedi

SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 16 novembre 2018, alle ore 10:30, a Firenze in via de' Pecori 6/8 presso la Sala Convegni della Banca "Monte dei Paschi di Siena", come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Pubblica.

Sono presenti gli Accademici

*Emeriti*: P. Cravedi, R. Dallai, G. Delrio, G. Gasperi, B. Giordana, V. Girolami, S. Ragusa di Chiara, V. Sbordoni;
*Ordinari*: A. Alma, P.A. Audisio, M. A. Bologna, P. Brandmayr, A. Casale, M. Cobolli, E. De Lillo, I. Floris P. Luciano, C. Malva, B. Massa, A. Minelli, R. Nannelli, G. Pellizzari, R. Poggi, C. Rapisarda, G. Rotundo, A. Russo;
*Straordinari*: A. Ballerio, E. Balletto, M. Biondi, D. Bosco, A. Di Palma, C. Duso, G. Gargiulo, G.S. Germinara, F. Nazzi, S. Simoni, M. Zapparoli.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. Arzone, S. Barbagallo, A.M. Bonvicini Pagliai, G. Briolini, L. Bullini, M.V. Covassi, F. Frilli, M. Maroli, L. Masutti, E. Mellini, R. Monaco, G. Nuzzaci, M. Olmi, G. Osella, L. Rivosecchi, L. Santini, M. Solinas, L. Süss, A. Vigna Taglianti; *Ordinari*: A. Battisti, A. Binazzi, A. M. Fausto, F. Frati, S. Longo, M. Mazzini, F. Pennacchio, P.F. Roversi, O. Triggiani, S. Turillazzi; *Straordinari*: M. Biondi, S. Colazza, C. Duso, A. P. Garonna, N. Isidoro, A. Lucchi, R. Pantaleoni, H. Tsolakis , S. Vanin.

Alla Seduta Pubblica sono presenti anche numerosi ricercatori e studiosi ospiti dell'Accademia

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

*Estinzioni globali ed estinzioni locali*

Il Presidente Romano Dallai apre la Seduta Pubblica e invita l Accademico Achille Casale, organizzatore della Tavola Rotonda assieme all'Accademico Emilio Balletto, a coordinare i lavori.

Si susseguono gli interventi:

– Accademico Achille Casale: introduzione
– Prof. Gabor Loevei, Aarhus University, Slaelse, Denmark – *The consequences of invasion on biodiversity: will it cause extinction or not?*
– Accademico Achille Casale – *L'estinzione in entomologia fra mito e realtà*
– Accademico Emilio Balletto – *Le estinzioni nelle farfalle diurne*

Ore 13.00 Pausa per il Pranzo. I lavori riprendono alle ore 14,30

– Accademico Valerio Sbordoni - *Aspetti genetici ed ecologici del declino di popolazioni di insetti*
– Accademico Maurizio Biondi - *Insetti, cambiamenti climatici ed estinzioni: il contributo della modellistica nella previsione di scenari futuri*
– Accademico Paolo Aldo Audisio - *Estinzioni vere o presunte in corsi d'acqua montani e altri ambienti*
– Accademico Marco Alberto Bologna - *Possibili estinzioni, riduzione di popolazioni e riscoperte nei Coleotteri Meloidi della fauna italiana*

– Accademico Pietro Brandmayr - *Estinzioni a livello di habitat e su scala regionale di specie e/o comunità di Coleotteri Carabidi*
– Accademic*o* Marzio Zapparoli - *Entomologia urbana ed estinzioni*

Segue un'interessante discussione, coordinata dall'Accademico Achille Casale, al termine della quale la Seduta si conclude alle ore 18,00

I testi delle relazioni saranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2018 dell'Accademia.

*Il Segretario* — Piero Cravedi
*Il Presidente* — Romano Dallai

## ASSEMBLEA PLENARIA

Presiede il Presidente Prof. Romano Dallai
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero Cravedi

Sabato 17 novembre 2018 alle ore 9:00, a Firenze Cascine del Riccio, via Lanciola 12/A, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea Plenaria.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti*: M.V. Covassi, P. Cravedi, R. Dallai, G. Delrio, G. Gasperi, B. Giordana, V. Girolami, M. Maroli, L. Masutti, G. Nuzzaci, M. Olmi, S. Ragusa di Chiara, L. Santini, V. Sbordoni, M. Solinas, L. Süss;
*Ordinari*: A. Alma, P.A. Audisio, A. Battisti, A. Binazzi, M. A. Bologna, P. Brandmayr, A. Casale, R. Cervo, M. Cobolli, E. De Lillo, I. Floris, F. Frati, P. Luciano, S. Maini, C. Malva, B. Massa, M. Mazzini, A. Minelli, R. Nannelli, G. Pellizzari, R. Poggi, C. Rapisarda, G. Rotundo, P.F. Roversi, A. Russo, S. Turillazzi;
*Straordinari*: A. Ballerio, E. Balletto, M. Biondi, A. Di Palma, C. Duso, G. Gargiulo, G. S. Germinara, A. Lucchi, F. Nazzi, R. Pantaleoni, S. Simoni, H. Tsolakis, S. Vanin, M. Zapparoli.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. Arzone, A.M. Bonvicini Pagliai, G. Briolini, L. Bullini, F. Frilli, E. Mellini, R. Monaco, G. Osella, L. Rivosecchi, A. Vigna Taglianti; *Ordinari*: A. M. Fausto, S. Longo, F. Pennachio, O.Triggiani; *Straordinari*: D. Bosco, S. Colazza, M. Cristofaro, C. Digilio, A.P. Garonna, N. Isidoro,

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti
2) Comunicazioni del Presidente
3) Proclamazione e consegna Diplomi ai nuovi Accademici
4) Fauna d'Italia
5) Programma definitivo delle Sedute per l'A.A. 2019
6) Varie ed eventuali

1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti

Vengono esaminati i verbali delle Sedute Pubbliche di venerdì 8 e sabato 9 giugno e della Assemblea Plenaria del 9 giugno 2018, già inviati a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici.

I verbali vengono approvati all'unanimità.

2) Comunicazioni del Presidente

Il Presidente informa che nell'ultimo periodo sono mancati gli Accademici Emeriti Sergio Zangheri, Giovanni Mineo e Piero Baronio, l'Accademico Straordinario Carlo Ricci e l'Accademico Onorario Henry Stroyan e invita l'Assemblea a un minuto di raccoglimento.

Nel programma delle prossime attività dell'Accademia saranno programmate le relative commemorazioni. L'Accademico Emerito Sebastiano Barbagallo ha già fornito la disponibilità a commemorare l'Accademico Onorario Stroyan nella Seduta di sabato 15 giugno 2019. Per la commemorazione degli altri colleghi recentemente scomparsi saranno interpellati gli Accademici delle rispettive sedi.

Il Presidente illustra brevemente il buon successo di partecipazione e il rilevante contenuto scientifico dell'XI Congresso Europeo di Entomologia che si è svolto a Napoli dal 2 al 6 luglio 2018.

Il Presidente invita l'Accademico Andrea Battisti a riferire in merito all'European PhD Network "Insect Science" IX Annual Meeting tenutosi a Firenze dal 14 al 16 novembre scorsi. L'Accademico Battisti riferisce che l'undicesimo incontro della rete europea di dottorato "Insect Science" ha avuto luogo nella sede storica della scuola di Agraria dell'Università degli studi di Firenze. All'evento hanno partecipato 35 dottorandi e post-doc e 6 senior. La partecipazione di ospiti stranieri ha riguardato 4 dottorandi e 2 senior. Complessivamente sono stati presentati 38 contributi orali e 6 poster, tutti in inglese, che hanno riguardato vari aspetti dell'entomologia e della patologia vegetale. L'incontro è stato molto apprezzato dai partecipanti, che hanno auspicato una riedizione, con una formula che possa diventare stabile nel tempo, in modo da costituire un riferimento per i dottorandi attuali e futuri.

Su invito del Presidente, l'Accademico Alberto Alma fa un breve aggiornamento sui lavori per l'organizzazione del XXVI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia che si svolgerà a Torino dall'8 al 12 giugno 2020. Le attività congressuali inizieranno nell'Aula Magna della Cavallerizza nella sede dell'Ateneo di Torino e proseguiranno con sessioni parallele nelle aule del Centro Congressi Torino Incontra. Una prima struttura del programma scientifico e i dettagli sui costi delle iscrizioni saranno forniti nell'Assemblea Plenaria di febbraio 2019.

3) Proclamazione e consegna Diplomi ai nuovi Accademici

Il Presidente consegna i Diplomi di Accademico Straordinario ai neoeletti Roberto Pantaleoni, Haralabos Tsolakis e Stefano Vanin.

L'Assemblea si congratula con i nuovi Accademici Straordinari, accogliendoli con un caloroso applauso.

4) Fauna d'Italia

Su invito del Presidente, prende la parola l'Accademico Marco A. Bologna, Presidente del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia (CSFI):

Nel periodo successivo alla seduta del giugno 2018 a Firenze, l'attività del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia si è articolata come segue:

1. Volume LII, Hymenoptera Symphita I della Collana Fauna d'Italia, autore Fausto Pesarini: dopo la correzione delle seconde bozze ed un incontro tra l'autore e la casa editrice, si attende la stampa del volume, che si auspica avvenga entro Dicembre 2018. Questo volume sarà stampato con parziale contributo del CSFI.
2. Volume LIII, Lepidoptera Coleophoridae, autore Giorgio Baldizzone: le prime bozze, per un

totale di circa 900 pagine e oltre 40 tavole, sono in fase di correzione. Nei prossimi giorni l'autore avrà un incontro con la redazione. Anche questo volume sarà stampato con parziale contributo del CSFI.

3. Sono in avanzata preparazione i volumi su Psilloidea e Rhopalocera della collana:
   - Homoptera Psilloidea (autore l'Accademico Carmelo RAPISARDA *et al*.): il testo, in lingua inglese, è quasi completato. Gli autori avevano indicato come data di consegna ottobre o novembre 2018, ma la consegna slitterà di qualche mese. Tutor del volume è l'Accademico Bruno MASSA. Anche questo volume sarà stampato con parziale contributo del CSFI.
   - Lepidoptera "Rhopalocera" (autori l'Accademico Emilio BALLETTO *et al*.): il testo è concluso e le figure di adulti, larve e pupe mancano soltanto di alcune specie. Si prevede la consegna all'inizio del 2019. Tutors del volume, che sarà stampato con parziale contributo del CSFI, sono gli Accademici Achille CASALE e Marzio ZAPPAROLI.

   Per gli anni successivi sono in preparazione i seguenti volumi:
   - Diptera Tachinidae (autore Pierfilippo CERRETTI *et al*.);
   - Plathelminthes Turbellaria (pars) (autori Marco CURINI GALLETTI *et al*.);
   - Cnidaria Scyphozoa (autori Fernando BOERO *et al*.);
4. È iniziata la preparazione della nuova "Checklist della fauna italiana" online. Sono attualmente al lavoro due assegnisti di ricerca (a cura del CNR su fondi LifeWatch), che stanno predisponendo la lista aggiornata dei possibili autori nazionali ed internazionali. Si stanno anche verificando le modalità di costruzione della piattaforma informatica che dovrà relazionarsi con LifeWatch e con il Network Nazionale della Biodiversità.
5. È terminato il lavoro in convenzione con ISPRA per il monitoraggio delle specie alloctone invasive in Italia e i prodotti attesi saranno consegnati entro il 30 giugno 2019.
6. Il CSFI parteciperà all'organizzazione del prossimo Congresso nazionale dell'UZI, insieme a UZI e CNR, con sede in Roma, nel settembre 2019. Sono previste due sessioni sulla biodiversità della fauna italiana, una verosimilmente sugli insetti, anche come evento per ricordare i 150 anni della Società Entomologica Italiana.

5) Programma definitivo delle sedute per l'A.A. 2019

Il Presidente informa che, in continuità con quanto programmato negli anni precedenti, le sedute dell'Anno Accademico 2019 si terranno nei giorni 22 e 23 febbraio, 14 e 15 giugno e 15 e 16 novembre. Il programma dell'attività culturale del 2019, già approvato nell'Assemblea Plenaria del 24 febbraio 2018, viene sotto riportato:

– 22 febbraio, venerdì: Tavola Rotonda sulla cimice asiatica a cura dell'accademico Alberto ALMA e della prof.ssa Luciana TAVELLA.
– 23 febbraio, sabato: Lettura dell'Accademica Marina COBOLLI su "Gli ortotteri ipogei del genere *Troglophilus*: ecologia ed evoluzione".
– 14 giugno, venerdì: Tavola Rotonda su "Avversità dell'eucalipto in ambiente mediterraneo" coordinata dall'Accademico Ignazio FLORIS.
– 15 giugno, sabato: Lettura dell'Accademico Vincenzo GIROLAMI sulle simbiosi dei Ditteri Tripetidi.
  Commemorazione dell'Accademica Emerita Maria Matilde PRINCIPI a cura dell'Accademico Roberto PANTALEONI.
  Commemorazione dell'Accademico Onorario Henry L.G. STROYAN a cura dell'Accademico Sebastiano BARBAGALLO.
– 15 novembre, venerdì: Tavola Rotonda sulle "Nuove Tecnologie nella difesa delle derrate" a cura dell'Accademico Salvatore GERMINARA.
– 16 novembre, sabato: Lettura degli Accademici Massimo CRISTOFARO ed Enrico DE LILLO su "Il controllo dell'ailanto".

Nel periodo tra la fine di novembre e l'inizio di dicembre è prevista a Sassari, a cura dell'Accademico Ignazio FLORIS, l'organizzazione di un Convegno dal titolo "L'Apicoltura italiana". La nostra Accademia sarà fra gli Enti organizzatori.

6) Varie ed eventuali

Nessuna

La seduta dell'Assemblea Plenaria è tolta alle ore 9:30

*Il Segretario* — Piero CRAVEDI
*Il Presidente* — Romano DALLAI

SEDUTA PUBBLICA

Sabato 17 novembre 2018 alle ore 9:30, presso la propria sede in via Lanciola 12/A Cascine del Riccio Firenze il Presidente Romano DALLAI dichiara aperta la Seduta Pubblica.

Oltre agli Accademici presenti all'Assemblea Plenaria, partecipano altri numerosi studiosi e ricercatori ospiti dell'Accademia.

Il Presidente Romano DALLAI invita l'Accademico Roberto PANTALEONI a presentare la lettura dal titolo:

*Il nemico condiviso e l'entomologia applicata*

Segue un'interessante discussione, al termine della quale il Presidente ringrazia il relatore e coloro che sono intervenuti.

Il Presidente dà successivamente la parola all'Accademico Roberto NANNELLI per la commemorazione dell'Accademica Emerita Fausta PEGAZZANO.

I testi della lettura e della commemorazione saranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2018.

La Seduta è tolta alle ore 10:55.

*Il Segretario* — Piero CRAVEDI
*Il Presidente* — Romano DALLAI

ASSEMBLEA ORDINARIA

Alle ore 11:00 ha inizio l'Assemblea Ordinaria, appositamente convocata, che ha come unico punto dell'Ordine del Giorno:

– Votazione per l'approvazione delle modifiche dello Statuto alla presenza del dottor Enrico Lanza, Notaio in Prato.

Il Verbale dell'Assemblea, stilato dal Notaio, viene allegato al presente verbale, del quale costituisce parte integrante (Allegato 1) insieme alla lista degli Accademici presenti e deleghe (Allegato 2).

ASSEMBLEA ORDINARIA

Presiede il Presidente Prof. Romano DALLAI
Segretario verbalizzante: il Segretario Prof. Piero CRAVEDI

Sabato 17 novembre 2018 alle ore 11:30, presso la propria sede in via Lanciola 12/A Cascine del Riccio Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea Ordinaria alla presenza degli Accademici:

*Emeriti*: M.V. Covassi, P. Cravedi, R. Dallai, G. Delrio, G. Gasperi, B. Giordana, V. Girolami, M. Maroli, L. Masutti, G. Nuzzaci, M. Olmi, S. Ragusa di Chiara, L. Santini, V. Sbordoni, M. Solinas, L. Süss;

*Ordinari*: A. Alma, P.A. Audisio, A. Battisti, A. Binazzi, M.A. Bologna, P. Brandmayr, A. Casale, R. Cervo, M. Cobolli, E. De Lillo, I. Floris, F. Frati, P. Luciano,S. Maini, C. Malva, B. Massa, M. Mazzini, A. Minelli, R. Nannelli, G. Pellizzari, F. Pennacchio, R. Poggi, C. Rapisarda, G. Rotundo, P.F. Roversi, A. Russo, S. Turillazzi;

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti*: A. Arzone, A.M. Bonvicini Pagliai, G. Briolini, L. Bullini, F. Frilli, E. Mellini, R. Monaco, G. Osella, L. Rivosecchi, A. Vigna Taglianti ; *Ordinari*: A. M. Fausto, S. Longo, F. Pennacchio, O. Triggiani.

Il Presidente chiede all'Assemblea che alla discussione del punto 4) Votazione per l'approvazione delle modifiche del Regolamento sia ammessa la presenza dell'Accademico Straordinario Avv. Alberto Ballerio, per fornire eventuali chiarimenti di natura legale. L'Assemblea esprime all'unanimità il proprio parere favorevole.

Viene quindi discusso il seguente Ordine del giorno:

1) Approvazione del verbale della seduta precedente.
2) Comunicazioni del Presidente.
3) Esame e approvazione del Bilancio preventivo anno finanziario 2019
4) Votazione per l'approvazione delle modifiche del Regolamento
5) Votazione per l'elezione di nuovi Accademici Ordinari
6) Votazione per l'elezione di nuovi Accademici Straordinari
7) Votazione per la conferma degli Accademici Straordinari in scadenza di quinquennio
8) Varie ed eventuali.

1) Approvazione del verbale della seduta precedente

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea Ordinaria del 9 giugno 2018, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici.

Il verbale viene approvato all'unanimità.

2) Comunicazioni del Presidente.

Il Presidente esprime soddisfazione per l'approvazione all'unanimità delle variazioni di Statuto avvenuta nell'Assemblea, con la partecipazione del Notaio, appena terminata. Il Presidente ringrazia tutti i colleghi che hanno contribuito con i loro consigli e suggerimenti al miglioramento e alla stesura del documento. Il lavoro di modifica del vecchio Statuto è stato lungo e ha comportato molti mesi di attenta considerazione, ma il risultato, che è stato apprezzato da tutti, ha ripagato l'impegno dedicato a questo lavoro. Il nuovo Statuto entrerà in vigore fra qualche settimana, dopo che la Prefettura avrà dato il proprio parere.

3) Esame e approvazione Bilancio preventivo anno finanziario 2019

Su invito del Presidente, il Tesoriere Roberto Nannelli informa che nei primi giorni di novembre è stata predisposta una bozza di bilancio che è stata inviata per e-mail a ciascuno dei componenti del Collegio dei Revisori dei Conti. Non essendo emersi rilievi, è stato poi concordato con il Presidente del Collegio (Dr.ssa Adele De Luca) di ratificare il bilancio in una prossima riunione da tenere prima dell'Assemblea del febbraio 2019, in cui dovrà essere ratificato anche il Bilancio consuntivo 2018.

Viene quindi presentata in Assemblea la bozza di bilancio, con riserva di approvazione appena sarà possibile convocare il Collegio dei Revisori dei Conti per la stesura del verbale e la ratifica definitiva.

Il Tesoriere illustra i diversi punti della bozza di Bilancio preventivo 2019. Sulla base della richiesta di contributo inoltrata al MIBACT nel mese di gennaio 2018, nei primi giorni di ottobre è pervenuta al Presidente la comunicazione di assegnazione di un contributo di 13.500 Euro per l'attività culturale dell'Accademia. Tale finanziamento, se non interverranno comunicazioni successive, dovrà essere rendicontato al Ministero competente entro marzo 2019.

Il Consiglio di Presidenza ha programmato la preparazione e la stampa del volume degli Atti dell'Accademia 2018 e ritiene anche importante realizzare tre monografie con i contributi presentati nelle Tavole Rotonde organizzate dall'Accademia nel corso del 2018. Con il contributo del MIBACT sarà anche possibile rimborsare i relatori stranieri invitati dai coordinatori delle Tavole Rotonde organizzate dall'Accademia relativamente alle spese sostenute per il viaggio e il soggiorno in Italia.

L'Assemblea non pone rilievi e approva all'unanimità la bozza.

4) Votazione per l'approvazione delle modifiche del Regolamento.

Alla discussione viene ammesso l'Accademico Straordinario Alberto Ballerio.

Il Presidente illustra il nuovo Regolamento, che è stato adeguato per poter applicare le variazioni allo Statuto approvate nella precedente Assemblea Ordinaria tenutasi alla presenza del Notaio, appena terminata.

L'Assemblea Ordinaria approva all'unanimità il nuovo Regolamento, che entrerà in vigore dopo che la Prefettura avrà dato il proprio parere positivo al nuovo Statuto.

5) Votazione per l'elezione di nuovi Accademici Ordinari.

A norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Articolo 7), a fronte di 5 posti disponibili per Accademico Ordinario, sono pervenute entro il 30 aprile 2018 5 proposte per nuovi Accademici, per essere votate nell'Assemblea Ordinaria di novembre 2018.

Le 5 proposte per nuovi Accademici Ordinari riguardano gli Accademici Straordinari:

– Maurizio Biondi, presentato dagli Accademici Marco A. Bologna, Francesco Frati e Paolo Audisio;
– Stefano Colazza, presentato dagli Accademici Bruno Massa, Salvatore Ragusa e Andrea Battisti;
– Giuseppe Gargiulo, presentato dagli Accademici Carla Malva, Francesco Pennacchio e Giuliano Gasperi;
– Francesco Nazzi, presentato dagli Accademici Franco Frilli, Francesco Pennacchio e Alessandro Minelli;
– Marzio Zapparoli, presentato dagli Accademici Marco A. Bologna, Massimo Olmi e Alessandro Minelli.

Il Presidente, verificata, come disposto dall'Articolo13 dello Statuto, la presenza della maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari, dichiara valida l'Assemblea.

Vengono designati gli Accademici Massimo Mazzini e Marco A. Bologna quali scrutatori per questa e per le altre votazioni previste per la presente seduta.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico Straordinario Maurizio Biondi. Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto, l'Accademico Ordinario Marco A. Bologna illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Maurizio BIONDI eletto e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni e delle Attività Culturali e del Turismo per la nomina ad Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte di tale Ministero.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico Straordinario Stefano COLAZZA. Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto, l'Accademico Ordinario Bruno MASSA illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il Candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Stefano COLAZZA eletto e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni e delle Attività Culturali e del Turismo per la nomina ad Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte di tale Ministero.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico Straordinario Giuseppe GARGIULO. Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto, l'Accademica Ordinaria Carla MALVA illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Giuseppe GARGIULO eletto e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni e delle Attività Culturali e del Turismo per la nomina ad Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte di tale Ministero.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico Straordinario Francesco NAZZI. Come previsto dall'Articolo 12 dello Statuto, l'Accademico Ordinario Alessandro MINELLI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Francesco NAZZI eletto e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni e delle Attività Culturali e del Turismo per la nomina ad Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte di tale Ministero.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico Straordinario Marzio ZAPPAROLI. Come previsto dall'articolo 12 dello Statuto, l'Accademico Ordinario Alessandro MINELLI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il Candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Marzio ZAPPAROLI eletto e da proporre, a norma dell'Articolo 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni e delle Attività Culturali e del Turismo per la nomina ad Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte di tale Ministero.

6) Votazioni per elezione nuovi Accademici Straordinari.

A norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Articolo 7), a fronte di 6 posti per Accademico Straordinario, sono pervenute entro il 30 aprile 2018 le seguenti 5 proposte per nuovi Accademici Straordinari per essere votate nell'Assemblea di novembre 2018.

– Giovanni BURGIO, presentato dagli Accademici Stefano MAINI, Giuseppe ROTUNDO e Alberto ALMA;
– Emanuele MAZZONI, presentato dagli Accademici Franco FRILLI, Mario SOLINAS e Luciano SÜSS;
– Roberto ROMANI, presentato dagli Accademici Mario SOLINAS, Vincenzo GIROLAMI e Giorgio NUZZACI;
– Gaetano SISCARO, presentato dagli Accademici Carmelo RAPISARDA, Alberto ALMA e Bruno MASSA;
– Luciana TAVELLA, presentata dagli Accademici Alberto ALMA, Andrea BATTISTI e Agatino RUSSO.

Il Presidente, verificata, come disposto dall'Articolo 13 dello Statuto, la presenza della maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari, dichiara valida l'Assemblea.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura di Giovanni BURGIO. Come previsto dall'Articolo 12, l'Accademico Ordinario Stefano Maini illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato. Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama

Giovanni Burgio Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2019-2023.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura di Emanuele Mazzoni. Come previsto dall'Articolo 12, l'Accademico Emerito Luciano Süss illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato. Il Candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Emanuele Mazzoni Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2019-2023.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura di Roberto Romani. Come previsto dall'Articolo 12, l'Accademico Emerito Mario Solinas illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Roberto Romani Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2019-2023.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura di Gaetano Siscaro. Come previsto dall'Articolo 12, l'Accademico Ordinario Carmelo Rapisarda illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato. Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Gaetano Siscaro Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2019-2023.

Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura di Luciana Tavella. Come previsto dall'Articolo 12, l'Accademico Ordinario Alberto Alma illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici della candidata. La candidata raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Luciana Tavella Accademica Straordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2019-2023.

7) Votazione per la conferma degli Accademici Straordinari in scadenza di quinquennio

Il Presidente informa che per l'Accademico Straordinario Nunzio Isidoro è scaduto il quinquennio di appartenenza.

Il Presidente, verificato, come disposto dall'Articolo 13 dello Statuto, la presenza della maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari dichiara valida l'Assemblea.

Viene posta in votazione a scrutinio segreto la conferma dell'Accademico Nunzio Isidoro. Come previsto dall'Articolo 10 del Regolamento, il Presidente ricorda all'Assemblea l'impegno scientifico, l'interesse dimostrato e il desiderio espresso dal medesimo di poter continuare in futuro.

Il candidato raggiunge il quorum previsto e il Presidente lo proclama confermato per il quinquennio 2019-2023.

8) Varie ed eventuali

Nessuna

La seduta dell'Assemblea Ordinaria è tolta alle ore 13:00.

*Il Segretario* — Piero Cravedi

*Il Presidente* — Romano Dallai

*Allegato 1*

N. 35.553 del repertorio N. 19.852 della Raccolta

**VERBALE DI ASSEMBLEA**

**DELL'"ACCADEMIA NAZIONALE ITALIANA DI ENTOMOLOGIA"**

REPUBBLICA ITALIANA

L'anno duemiladiciotto, il giorno diciassette del mese di novembre, alle ore undici e minuti diciassette

17 novembre 2018, h. 11.17

In Firenze, Via Lanciola n. 12/A.

Innanzi a me, dottor Enrico Lanza, Notaio in Prato, ed iscritto nel Collegio Notarile dei Distretti Riuniti di Firenze, Pistoia e Prato,

è presente:

- DALLAI Prof. Romano, nato a Firenze il 12 aprile 1938, domiciliato per la carica presso la sede dell'accademia, il quale interviene al presente atto in qualità di Presidente pro-tempore dell'"**ACCADEMIA NAZIONALE ITALIANA DI ENTOMOLOGIA**", **Ente morale**, con sede in Firenze, via Lanciola n. 12/a, codice fiscale 01504280486.

Il predetto comparente, della cui identità personale io, Notaio, sono certo, mi fa richiesta di redigere il verbale di assemblea dei membri della predetta accademia riunita in questo giorno, luogo ed ora, per discutere e deliberare tra l'altro sul seguente

Ordine del giorno

Votazione per l'approvazione delle modifiche dello Statuto.

Assume la presidenza dell'assemblea, il Presidente pro-tempore, Prof. Romano DALLAI, il quale constata e fa constatare preliminarmente la validità della stessa, sulla base di quanto segue:

1. l'assemblea è stata regolarmente convocata ai sensi del vigente statuto con avviso inviato in tempo utile tramite e-mail a tutti gli interessati;
2. sono presenti in proprio o per delega, che rimangono conservate agli atti dell'Accademia, n. 19 (diciannove) su n. 27 (ventisette) Accademici Emeriti, e n. 30 (trenta) su n. 31 (trentuno) Accademici Ordinari, tutti aventi diritto al voto, come risulta dal foglio presenze che si allega al presente verbale sotto la lettera "A", previa dispensa dalla lettura fatta a me notaio in assemblea dal comparente;
3. il Consiglio di Presidenza è presente nelle persone di sè medesimo, quale Presidente, di Giordana Prof.ssa Barbara, quale Vice Presidente, di Cravedi Prof. Piero, quale Segretario, e di Nannelli Dr. Roberto, quale Tesoriere.

Il Presidente dichiara, pertanto, validamente costituita la presente assemblea e dichiara aperta la seduta.

Con riferimento all'argomento all'ordine del giorno sottoposto all'assemblea, il Presidente fà presente agli Accademici i motivi che rendono necessario l'elaborazione di un nuovo testo dello statuto dell'Accademia.

Il Presidente quindi illustra ampiamente ai presenti il nuovo

*Segue Allegato 1*

testo dello statuto dell'Accademia.
In conseguenza di quanto proposto, dopo breve discussione, **l'assemblea, per voto palese, all'unanimità**

**delibera**

- di approvare articolo per articolo e nel complesso il nuovo testo dello statuto dell'Accademia, che si allega al presente atto sotto la lettera "B", previa lettura fatta da me notaio in assemblea.

Null'altro essendovi da deliberare e nessun altro avendo chiesto la parola sul predetto argomento all'ordine del giorno, il Presidente dichiara sciolta l'Assemblea sul predetto argomento alle ore undici e minuti ventiquattro (h. 11.24).
Le spese del presente verbale e conseguenti sono a carico dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia.
Dattiloscritto da persona di mia fiducia ed in parte completato a mano da me Notaio su due fogli per cinque facciate sin qui, il presente verbale è stato pubblicato mediante lettura datane da me, Notaio, in assemblea al comparente che lo approva.
L'atto viene sottoscritto alle ore undici e minuti ventisei (h. 11.26).
F.to Romano Dallai
Enrico Lanza, Notaio (Sigillo)

**Allegato "B" al Repertorio n. 35.553/19.852**

**Statuto dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia**

**Art. 1 (Costituzione, Scopo e Definizioni)**

1.1 L'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, con sede in Firenze, fondata il 16 aprile 1950 ed eretta in Ente morale con D.P.R. 19 maggio 1954, n. 691, si prefigge lo scopo di promuovere lo sviluppo degli studi nell'Entomologia, attraverso il dibattito sulla sua conoscenza, favorendone la divulgazione con attività culturali pubbliche.
1.2 Ai fini del presente Statuto valgono le seguenti definizioni:
Accademici Ordinari: gli Accademici Ordinari effettivi, cioè di età inferiore a 75 anni, e Seniores.
Accademici Straordinari: gli Accademici Straordinari effettivi, cioè di età inferiore a 75 anni, e Seniores.

**Art. 2 (Patrimonio)**

2.1 Il patrimonio dell'Accademia è costituito dalla somma attuale di Euro 50.000,00 (cinquantamila virgola zero zero) e da ogni altro bene pervenuto successivamente da Enti e da privati ed espressamente destinato a tale scopo.
2.2 Le somme provenienti dall'alienazione dei beni, da lasciti, da donazioni o che per qualsivoglia titolo siano da destinare all'incremento del patrimonio e che non siano investite in immobili devono essere impiegate in titoli nominativi di Stato o garantiti dallo Stato, o presso Istituti di Credito.

*Segue Allegato 1*

**Art. 3 (Sede)**

3.1 L'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia ha sede in Firenze presso l'ex Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria del C.R.A., ora Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Economia Agraria (CREA), via Lanciola 12/A, Cascine del Riccio.

**Art. 4 (Accademici)**

4.1 L'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia comprende tre categorie di Accademici: Ordinari, Straordinari e Onorari. Al raggiungimento del 75° anno di età gli Ordinari e gli Straordinari diventano Seniores.

4.2 Gli Accademici Ordinari e Onorari sono nominati a vita. Gli Accademici Straordinari sono sottoposti a conferma dopo tre anni. Al terzo anno l'Assemblea Ordinaria potrà decidere di confermarli o meno. In caso di conferma, essi permarranno nella categoria degli Accademici Straordinari a vita, salvo successiva elezione ad Accademici Ordinari; viceversa, in caso di mancata conferma, essi decadranno dalla carica.

4.3 Gli Accademici Ordinari e Straordinari debbono essere di nazionalità italiana. Gli Accademici Onorari possono essere di nazionalità straniera.

4.4 Gli Accademici Ordinari e Straordinari sono eletti fra coloro che si siano particolarmente distinti nello studio degli Insetti o di altre classi di Artropodi terrestri e acquatici. Gli Accademici Onorari sono eletti fra studiosi che abbiano raggiunto chiara fama o speciali meriti nel campo delle discipline entomologiche a livello internazionale.

4.5 Gli Accademici Ordinari effettivi possono raggiungere il numero massimo di 40 (quaranta), gli Straordinari effettivi di 40 (quaranta), gli Onorari di 15 (quindici).

4.6 Gli Accademici Ordinari effettivi e Straordinari effettivi confermati, al raggiungimento del 75° anno di età, assumono la qualità di Seniores; essi pertanto non vengono più contati ai fini del computo del numero massimo consentito dal precedente articolo 4.5. Gli Accademici Seniores conservano tutte le prerogative della categoria di appartenenza (rispettivamente Accademici Ordinari o Straordinari), in particolare ai fini di quanto previsto dagli artt. 4.8, 4.9, 4.10, 6, 12, 14 e 15, ma non sono tenuti a partecipare assiduamente alla vita dell'Accademia, pertanto, ai fini del risultato delle votazioni, essi verranno computati solo se presenti (quindi non sono computati ai fini del calcolo del quorum costitutivo previsto dagli artt. 4.10, 6.2, 6.3, 12 e 14).

4.7 Gli Accademici Ordinari effettivi e Straordinari effettivi confermati che per motivate ragioni di salute o perché residenti all'estero non possano partecipare attivamente alla vita dell'Accademia possono chiedere al Consiglio di Presidenza, che a sua discrezione potrà o meno concederlo, di essere collocati in congedo. Gli Accademici che abbiano ottenuto il congedo sono esonerati dalla partecipazione alla

*Segue Allegato 1*

vita dell'Accademia e alle sue Assemblee, pertanto, ai fini del risultato delle votazioni, essi verranno computati solo se presenti.
4.8 Gli Accademici Ordinari hanno voto deliberativo, quelli Straordinari hanno voto consultivo. Gli Accademici Onorari non prendono parte alle votazioni.
4.9 L'elezione di nuovi Accademici Ordinari, Straordinari e Onorari nonché la conferma degli Accademici Straordinari dopo il primo triennio hanno luogo per votazione in un'Assemblea Ordinaria. Le proposte di candidatura per la nomina degli Accademici di queste tre categorie sono fatte per iscritto da almeno tre Accademici Ordinari e dovranno essere motivate e accompagnate dal curriculum vitae e dall'elenco delle pubblicazioni del candidato. I meriti scientifici e accademici saranno inoltre illustrati all'Assemblea, prima della votazione, da uno degli Accademici proponenti. Ciascuna proposta di nomina dovrà pervenire al Presidente dell'Accademia entro il mese di aprile. La proposta di conferma degli Accademici Straordinari viene invece posta all'Ordine del Giorno dell'ultima adunanza di ogni anno e votata dall'Assemblea Ordinaria a scrutinio segreto, senza essere preceduta da particolari formalità.
4.10 Le votazioni per l'elezione dei nuovi Accademici e la conferma degli Accademici Straordinari vengono fatte una volta l'anno e, di norma, nell'ultima seduta. L'adunanza è valida solo se vi partecipa la maggioranza assoluta degli Ordinari effettivi. I nomi dei candidati all'elezione e degli Accademici Straordinari da confermare sono resi noti dal Presidente nel corso della seduta dell'Assemblea Ordinaria che precede quella in cui sono indette le elezioni. Le votazioni avvengono a scrutinio segreto. Sono eletti o confermati coloro che abbiano riportato la maggioranza assoluta dei voti dei presenti.
4.11 Gli Accademici Ordinari, eletti secondo quanto stabilito nei precedenti artt. 4.9 e 4.10, sono nominati con decreto del Ministero per i Beni e le Attività Culturali; gli Accademici Straordinari e Onorari, eletti secondo quanto stabilito nei precedenti artt. 4.9 e 4.10, sono nominati con decreto del Presidente dell'Accademia.
4.12 La qualità di Accademico si perde per dimissioni o decadenza. Le dimissioni devono essere comunicate per iscritto al Consiglio di Presidenza. La decadenza si verifica qualora un Accademico Ordinario effettivo non partecipi alle Assemblee Ordinarie o un Accademico Straordinario effettivo non partecipi alle Assemblee Plenarie per tre anni consecutivi senza fornire giustificazione scritta della propria assenza o senza essere in congedo. Il Consiglio di Presidenza, previa adeguata istruttoria e consultazione con l'interessato, valuta le giustificazioni dallo stesso avanzate e sulla base di tali giustificazioni delibera se archiviare la pratica o informare

*Segue Allegato 1*

l'Assemblea Ordinaria affinché deliberi in merito alla decadenza dell'Accademico. La qualità di Accademico Straordinario si perde altresì in caso di mancata conferma allo scadere del triennio.

**Art. 5 (Organi dell'Accademia)**

5.1 Organi dell'Accademia sono:

a) l'Assemblea,
b) il Consiglio di Presidenza,
c) il Presidente e il Vice-Presidente,
d) il Segretario,
e) il Tesoriere,
f) i Revisori dei Conti.

**Art. 6 (Assemblea)**

6.1 L'Assemblea può essere Ordinaria o Plenaria. Le Assemblee Ordinarie e Plenarie si tengono di regola presso la sede sociale o comunque nell'ambito del Comune di Firenze, salvo convocazioni straordinarie ai sensi del successivo articolo 6.7, che possono tenersi anche altrove in Italia.

6.2 Gli Accademici Ordinari e Straordinari costituiscono l'Assemblea Plenaria dell'Accademia. Questa è valida quando vi partecipa la maggioranza assoluta calcolata su un numero pari alla somma degli Accademici Ordinari effettivi e degli Accademici Straordinari effettivi e delibera a maggioranza assoluta degli aventi diritto al voto presenti. Gli Accademici Onorari possono partecipare alle Assemblee Ordinarie e Plenarie senza incidere sul numero legale delle medesime.

6.3 Gli Accademici Ordinari costituiscono l'Assemblea Ordinaria. Questa è valida quando vi partecipa la maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari effettivi e delibera a maggioranza assoluta degli aventi diritto al voto, salvo quanto previsto dagli artt. 12 e 14 rispettivamente per le modifiche statutarie e lo scioglimento. E' ammessa delega ad altro Accademico Ordinario ma ognuno non può ricevere più di due deleghe.

6.4 All'Assemblea Ordinaria compete l'elezione degli Accademici, l'elezione, fra i propri membri, dei membri del Consiglio di Presidenza, l'approvazione del bilancio consuntivo e preventivo oltre che ogni decisione in merito alle modifiche statutarie e allo scioglimento dell'Accademia e ogni decisione che il Consiglio di Presidenza decida di demandare alla decisione dell'Assemblea Ordinaria. Le elezioni avvengono a scrutinio segreto. L'Assemblea Ordinaria che deve eleggere i membri del Consiglio di Presidenza è convocata dal Presidente almeno un mese prima della scadenza del triennio di carica del Consiglio. L'Assemblea Ordinaria viene convocata dal Presidente almeno due volte all'anno: entro il mese di aprile per l'approvazione del bilancio consuntivo dell'anno precedente ed entro il mese di novembre per l'approvazione del bilancio preventivo. L'avviso di convocazione, inviato ai soci via posta cartacea o posta elettronica o altro analogo mezzo

*Segue Allegato 1*

almeno quindici giorni prima della data fissata per l'adunanza, deve contenere l'indicazione del giorno, dell'ora e del luogo della riunione e l'ordine del giorno. Nella prima di tali sedute, il Presidente, o altro Accademico da lui a ciò designato, rende conto dell'attività svolta dall'Accademia nell'anno precedente.

6.5 All'Assemblea Plenaria compete l'espressione di un parere su ogni questione che l'Assemblea Ordinaria o il Consiglio di Presidenza decida di demandare alla Assemblea Plenaria.

6.6 L'Assemblea Plenaria viene convocata dal Presidente almeno due volte all'anno, di regola appena prima o in coda all'Assemblea Ordinaria. L'avviso di convocazione, inviato ai soci via posta cartacea o posta elettronica o altro analogo mezzo almeno quindici giorni prima della data fissata per l'adunanza, deve contenere l'indicazione del giorno, dell'ora e del luogo della riunione e l'ordine del giorno.

6.7 Il Presidente può convocare in via straordinaria adunanze dell'Assemblea Plenaria e di quella Ordinaria presso la sede dell'Accademia, presso altre istituzioni scientifiche o in altra sede ritenuta idonea e opportuna. Allo stesso modo l'Assemblea Ordinaria può essere convocata dal Presidente quando ne faccia richiesta almeno un quinto degli Accademici Ordinari. Alle adunanze dell'Assemblea Plenaria possono essere invitati a partecipare studiosi e personalità. Tali assemblee possono essere pubbliche.

**Art. 7 (Il Consiglio di Presidenza)**

7.1 Il Consiglio di Presidenza è formato dal Presidente, dal Vice-Presidente, dal Segretario e dal Tesoriere.

7.2 Il Consiglio di Presidenza, in ragione della durata in carica dei suoi componenti, dura in carica tre anni e può essere confermato.

7.3 Il Consiglio di Presidenza ha il potere di amministrazione ordinaria e straordinaria dell'Accademia, salvo che, ai sensi dell'art. 6.4 del presente statuto, non intenda demandare la decisione all'Assemblea Ordinaria.

7.4 Il Consiglio di Presidenza si riunisce almeno due volte all'anno, una delle quali per redigere il bilancio consuntivo annuale, su convocazione da parte del Presidente o di almeno due suoi membri e delibera a maggioranza assoluta dei presenti, purché siano presenti almeno tre membri. In caso di parità prevale il voto del Presidente. Non è ammessa delega ma è ammessa la partecipazione a distanza tramite strumenti telematici, purché il Presidente sia in grado di verificare l'identità dei partecipanti remoti e questi possano adeguatamente partecipare alla riunione. Le convocazioni, che devono contenere l'indicazione del giorno, dell'ora e del luogo della riunione e l'ordine del giorno, devono essere inviate almeno una settimana prima tramite e-mail, fax o lettera ai recapiti all'uopo comunicati dai singoli membri del Consiglio. E' in ogni caso validamente costituita la riunione

*Segue Allegato 1*

non preceduta da convocazione purché tutti i membri del Consiglio siano presenti, anche tramite collegamento telematico, e nessuno si opponga alla trattazione degli argomenti all'ordine del giorno. Alle riunioni del Consiglio possono partecipare, con funzione consultiva, il Presidente del precedente Consiglio di Presidenza e, su invito del Presidente o del Consiglio, gli Accademici competenti a dare un contributo su specifici problemi.

**Art. 8 (Il Presidente e il Vice-Presidente)**

8.1 Il Presidente ha la rappresentanza legale dell'Accademia.

8.2 Il Presidente convoca e presiede la riunioni del Consiglio di Presidenza e convoca e presiede le Assemblee dell'Accademia. Spetta altresì al Presidente di vigilare e disciplinare la pubblicazione degli scritti dell'Accademia.

8.4 Il Vice-Presidente sostituisce il Presidente in ogni sua funzione e prerogativa, compresa la rappresentanza legale, in caso di assenza o impedimento di quest'ultimo.

8.5 Presidente e Vice-Presidente sono eletti dall'Assemblea Ordinaria, durano in carica tre anni e sono rieleggibili, con il limite che non è possibile svolgere più di due mandati consecutivi.

**Art. 9 (Il Segretario)**

9.1 Il Segretario redige il processo verbale delle adunanze delle Assemblee e del Consiglio di Presidenza e collabora con il Presidente, il Vice-Presidente e il Tesoriere.

9.2 Il Segretario tiene altresì l'elenco degli Accademici e cura la tenuta e l'aggiornamento del sito internet dell'Accademia, quando esistente.

9.3 Il Segretario è eletto dall'Assemblea Ordinaria, dura in carica tre anni ed è rieleggibile.

**Art. 10 (Il Tesoriere)**

10.1 Il Tesoriere tiene la cassa dell'Accademia, cura l'amministrazione economico-finanziaria dell'Accademia, predispone tutti gli atti relativi da sottoporre alla firma del Presidente e predispone la bozza del bilancio da discutere nella apposita riunione del Consiglio di Presidenza.

10.2 Il Tesoriere è eletto dall'Assemblea Ordinaria, dura in carica tre anni ed è rieleggibile.

**Art. 11 (Il Collegio dei Revisori dei Conti)**

11.1 Il Collegio dei Revisori dei Conti è formato da tre componenti effettivi e un supplente. Esso deve esprimere un parere vincolante sulla regolarità del bilancio consuntivo annuale e sorveglia l'amministrazione economico-finanziaria dell'Accademia.

11.2 I Revisori dei Conti hanno pertanto diritto a partecipare alla riunione del Consiglio di Presidenza che redige il bilancio consuntivo annuale e all'Assemblea Ordinaria che lo approva. Essi possono altresì avere libero accesso a tutta la documentazione economico-finanziaria dell'Accademia.

11.3 Il Collegio dei Revisori dei Conti dura in carica un

*Segue Allegato 1*

triennio e i suoi componenti sono rieleggibili. L'Assemblea Ordinaria nomina tra i suoi membri, ma al di fuori del Consiglio di Presidenza, due Revisori dei Conti effettivi e un supplente. Il Ministero per i Beni e le Attività Culturali nomina a sua volta un terzo Revisore dei Conti effettivo.

11.4 Il Collegio dei Revisori dei Conti è presieduto dal membro designato dal Ministero, salvo che questi non preferisca che la presidenza spetti ad altro membro, si riunisce su convocazione del suo presidente, senza particolari formalità, e delibera a maggioranza dei suoi componenti.

**Art. 12 (Modifiche statutarie)**

12.1 Il presente Statuto può essere modificato quando, a seguito di proposta del Consiglio di Presidenza o di proposta sottoscritta da almeno un terzo degli Accademici Ordinari, l'Assemblea Ordinaria, a questo scopo convocata, approvi le modifiche proposte con un numero di voti favorevoli non minore dei due terzi del numero degli Accademici presenti. Per l'approvazione delle modifiche di Statuto è ammesso l'istituto della delega ad Accademico Ordinario effettivo o senior. Ogni Accademico presente può avere due deleghe. L'adunanza dell'Assemblea non è valida se non vi prendono parte almeno i due terzi degli Accademici Ordinari effettivi, comprese eventuali deleghe.

**Art. 13 (Esercizio finanziario)**

13.1 L'anno accademico e l'anno finanziario decorrono dall'1 (uno) gennaio e terminano al 31 dicembre di ogni anno.

13.2 Il bilancio preventivo e il bilancio consuntivo sono predisposti dal Consiglio di Presidenza.

13.3 Entro 120 giorni dall'inizio dell'anno accademico l'Assemblea Ordinaria deve approvare il bilancio consuntivo dell'anno precedente.

13.4 Entro il mese di maggio di ogni anno, il Presidente trasmette al Ministero per i Beni e le Attività Culturali una relazione sull'attività svolta dall'Accademia nell'anno precedente.

**Art. 14 (Scioglimento e liquidazione)**

14.1 Lo scioglimento è deliberato dall'Assemblea Ordinaria con le modalità e i quorum costitutivi e deliberativi previsti per le modifiche statutarie. Il patrimonio dell'Accademia, su proposta del Consiglio di Presidenza, ratificata dall'Assemblea Ordinaria, dovrà essere devoluto a Enti con scopi simili, oppure a fini di pubblica utilità, salvo diversa destinazione imposta dalla legge.

**Art. 15 (Norme finali)**

15.1 Per quanto non previsto dal presente Statuto si fa riferimento alle norme di legge vigenti e ai principi generali dell'ordinamento giuridico italiano.

15.2 Le modalità di applicazione del presente Statuto sono stabilite da un Regolamento interno di funzionamento emanato dall'Assemblea Ordinaria.

*Segue Allegato 1*

**Disposizioni transitorie**

Tutti gli Accademici che, alla data di entrata in vigore del presente nuovo Statuto, sono "Emeriti" diventano di diritto "Accademici Seniores" ma mantengono la definizione di Emeriti e saranno elencati in una lista specifica con la dizione "Emeriti secondo lo Statuto del 2009". Gli Accademici Straordinari che, all'entrata in vigore del presente nuovo Statuto, siano già stati confermati dopo il primo quinquennio sono considerati Accademici Straordinari a vita.

Il Consiglio di Presidenza, compresi il Presidente e il Vice Presidente, in carica al momento dell'entrata in vigore del presente nuovo Statuto, rimane in carica e scadrà allo spirare del triennio dalla sua elezione.

F.to Romano Dallai

Enrico Lanza, Notaio (Sigillo)

Registrato a Prato
il 29 novembre 2018
al n° 13447/1T

*Allegato 2 "A"*

**Presenze Accademici assemblea plenaria dell'Accad_del 17 nov. 2018**

**Accademici Emeriti**

| | |
|---|---|
| Prof. Alessandra Arzone | DELEGA |
| Prof. Sebastiano Barbagallo | DELEGA |
| Prof.ssa Anna Maria Bonvicini Pagliai | |
| Prof. Giovanni Briolini | DELEGA |
| Prof. Luciano Bullini | |
| Prof. Marco Vittorio Covassi | Maria Vittoria Covassi |
| Prof. Piero Cravedi | |
| Prof. Romano Dallai | |
| Prof. Gavino Delrio | |
| Prof. Franco Frilli | |
| Prof. Giuliano Gasperi | |
| Prof.sa Barbara Giordana | Barbara Giordana |
| Prof. Vincenzo Girolami | |
| Prof. Michele Maroli | |
| Prof. Luigi Masutti | |
| Prof. Egidio Mellini | |
| Prof. Raffaele Monaco | |
| Prof. Giorgio Nuzzaci | |
| Prof. Massimo Olmi | |
| Prof. Giuseppe Osella | |
| Prof. Salvatore Ragusa di Chiara | |
| Prof. Leo Rivosecchi | |
| Prof. Luciano Santini | |
| Prof. Valerio Sbordoni | |
| Prof. Mario Solinas | |
| Prof. Luciano Suss | |
| Prof. Augusto Vigna Taglianti | |

*Segue Allegato 2 "A"*

| | |
|---|---|
| **ACCADEMICI ORDINARI** | |
| Prof. Alberto Alma | |
| Prof. Paolo Aldo Audisio | |
| Prof. Andrea Battisti | |
| Dott. Andrea Binazzi | |
| Prof. Marco Bologna | |
| Prof. Pietro Brandmayr | |
| Prof. Achille Casale | |
| Prof.sa Rita Cervo | |
| Prof.sa Marina Cobolli | |
| Prof. Enrico de Lillo | |
| Prof.sa Anna Maria Fausto | DELEGA |
| Prof. Ignazio Floris | |
| Prof. Francesco Frati | DELEGA |
| Prof. Santi Longo | |
| Prof. Pietro Luciano | |
| Prof. Stefano Maini | |
| Dott.ssa Carla Malva | |
| Prof. Bruno Massa | |
| Prof. Massimo Mazzini | |
| Prof. Alessandro Minelli | |
| Dott. Roberto Nannelli | |
| Prof.sa Giuseppina Pellizzari | |
| Prof. Francesco Pennacchio | DELEGA |
| Dr. Roberto Poggi | |
| Prof. Carmelo Rapisarda | |
| Prof. Giuseppe Rotundo | |
| Prof. Pio Federico Roversi | |

*Segue Allegato 2 "A"*

| | |
|---|---|
| Prof. Agatino Russo | |
| Prof. Antonio Tranfaglia | |
| Prof. Oreste Triggiani | DELEGA |
| Prof. Stefano Turillazzi | Stefano Turillazzi |

Io sottoscritto Alessandra Arzone delego l'Accademico Ordinario (o ~~Emerito~~) Alberto IALMA .....a rappresentarmi nella seduta dell'Assemblea Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, che si terrà presso la sede di Via Lanciola (Cascine del Riccio)- Firenze, il giorno 17 novembre 2018, per l'approvazione del nuovo Statuto e del nuovo Regolamento.

Firmato

.....Paolo Arzone

Io sottoscritto Sebastiano Barbagallo delego l'Accademico Ordinario Carmelo Rapisarda a rappresentarmi nella seduta dell'Assemblea Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, che si terrà presso la sede di Via Lanciola (Cascine del Riccio)- Firenze, il giorno 17 novembre 2018, per l'approvazione del nuovo Statuto e del nuovo Regolamento.

Firmato

Catania, 3 Nov. 2018

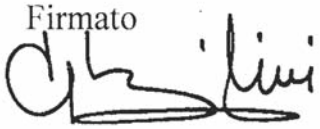
*Segue Allegato 2 "A"*

Io sottoscritta ANNA MARIA FAUSTO delego l'Accademico Ordinario MASSIMO MAZZINI a rappresentarmi nella seduta dell'Assemblea Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, che si terrà presso la sede di Via Lanciola (Cascine del Riccio)- Firenze, il giorno 17 novembre 2018, per l'approvazione del nuovo Statuto e del nuovo Regolamento.

Firma

Io sottoscritto Giovanni Briolini delego l'Accademico Ordinario Stefano Maini a rappresentarmi nella seduta dell'Assemblea Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, che si terrà presso la sede di Via Lanciola (Cascine del Riccio)- Firenze, il giorno 17 novembre 2018, per l'approvazione del nuovo Statuto e del nuovo Regolamento.

Firmato



Io sottoscritto Santi Longo delego l'Accademico Ordinario Agatino Russo a rappresentarmi nella seduta dell'Assemblea Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, che si terrà presso la sede di Via Lanciola (Cascine del Riccio)- Firenze, il giorno 17 novembre 2018, per l'approvazione del nuovo Statuto e del nuovo Regolamento.

Firmato

*Segue Allegato 2 "A"*

Portici 6 novembre 2018

Io sottoscritto Francesco Pennacchio, nato a Giugliano in Campania, il 24 settembre 1960, dove risiedo in via Concezione 1, delego l'Accademico Ordinario Carla Malva a rappresentarmi nella seduta dell'Assemblea Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, che si terrà presso la sede di Via Lanciola (Cascine del Riccio) - Firenze, il giorno 17 novembre 2018, per l'approvazione del nuovo Statuto e del nuovo Regolamento.

Francesco Pennacchio

Io sottoscritto TRIGGIANI ORESTE.. delego l'Accademico Ordinario (o Emerito) NUZZACI GIORGIO.....a rappresentarmi nella seduta dell'Assemblea Ordinaria dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, che si terrà presso la sede di Via Lanciola (Cascine del Riccio)- Firenze, il giorno 17 novembre 2018, per l'approvazione del nuovo Statuto e del nuovo Regolamento.

Firmato

50 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 51-56*

**COMMEMORAZIONE**

# BREVE RICORDO DI FAUSTA PEGAZZANO

ROBERTO NANNELLI (*)

(*) *Accademico ordinario*
Commemorazione tenuta nella Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze 17 novembre 2018

Solo chi ha conosciuto la Signorina Pegazzano, così si faceva chiamare da colleghi e collaboratori Fausta Pegazzano, può comprendere la difficoltà a reperire notizie sulla sua carriera formativa data la particolare riservatezza sulla sua vita privata.

Fausta Pegazzano era nata a La Spezia il 5 ottobre 1920; figlia di Erasmo Pegazzano, un colonnello dei Carabinieri e di Silvia Pegazzano, una signora molto devota terziaria francescana; Fausta aveva due sorelle di maggiore età. I genitori di Fausta erano cugini e la "Signorina" diceva di aver saputo che si erano potuti sposare solo dopo aver ricevuto la dispensa papale. Spesso ricordava che il nonno materno era un ingegnere che aveva partecipato alla progettazione e realizzazione della ferrovia litoranea per la Francia. Sicuramente il patrimonio genetico della famiglia Pegazzano doveva essere dotato di particolari doti di longevità in quanto entrambi genitori erano morti dopo aver superato il secolo di vita e anche le sorelle erano decedute tutte ultranovantenni.

Fausta aveva frequentato il liceo e ricordava che nel 1938, quindi diciottenne, aveva partecipato alle selezioni di nuoto pinnato in previsione delle olimpiadi del 1940 che poi non furono tenute in conseguenza dell'inizio della Seconda Guerra Mondiale. Fausta si era poi iscritta all'Università di Pisa frequentando la Facoltà di Scienze Naturali. Lei diceva che a quel tempo solo altre due ragazze frequentavano il suo corso di laurea. Grazie all'aiuto di Luciano Santini sono riuscito a sapere che si era laureata l'8 luglio 1942, quindi in pieno periodo di guerra. Purtroppo non siamo riusciti a trovare il titolo della sua tesi di laurea ma sicuramente doveva riguardare un argomento entomologico considerando che il suo primo lavoro intitolato "Le ghiandole ceripare del *Ceroplastes sinensis* Del Guercio e *C. rusci* L." è pubblicato sugli Atti della Società Toscana di Scienze Naturali, Memorie, vol. 51, nel 1942.

Non sono riuscito a sapere se il periodo bellico lo avesse trascorso a Pisa o a La Spezia; da alcuni carteggi ho scoperto che 1946 aveva trovato lavoro presso l'Istituto Sieroterapico di Pisa e nel 1947 aveva frequentato l'Osservatorio per la malattie delle piante di Pisa che al tempo era associato alla Facoltà di Agraria con l'Istituto di Entomologia diretto dal Prof. Russo. Sempre nel 1947 aveva partecipato al concorso per Sperimentatore per la Stazione di Entomologia (la ex Regia Stazione) e aveva preso servizio nel settembre del 1948. (Foto 1 e 2).

I suoi lavori dal 1947 al 1951 sono sulle cocciniglie ad esclusione di un lavoro pubblicato su Redia nel 1948, in collaborazione con G. Faldi, che riguardava l'azione degli insetticidi organici clorurati sul *Dacus oleae.* Altri lavori pubblicati fra il 1952 e il 1959 sono dedicati a prove di difesa di fruttiferi e olivo. In quel periodo conseguì anche la libera docenza in Entomologia Agraria. Nel 1953 era stata incaricata dal Ministero dell'Agricoltura, come funzionario della Stazione di Entomologia, per la partecipazione ad una missione negli Stati Uniti nell'ambito di un programma di assistenza tecnica intitolato "Lotta contro gli insetti". Nel 1959 gli viene riconosciuta la promozione ad Aiuto Direttore di prima classe.

La proverbiale meticolosità e precisione in tutte le cose che caratterizzava Fausta Pegazzano, orientò il Direttore della Stazione a darle l'incarico di seguire i tesisti che frequentavano la Stazione e i corsi universitari di Entomologia del Prof. Melis. (Foto 3 e 4).

Dal 1960 fu anche incaricata dal Direttore di occuparsi della cura e conservazione della Collezione di Acari di Berlese presente nella Stazione. Negli anni precedenti la Collezione era stata riordinata da Giocondo Lombardini (un professore di scuola media appassionato di acari e collaboratore della Sezione Entomologica del Museo della Specola) che aveva riposto i circa 13.000 vetrini nelle scatole originali dopo il ritorno a Firenze alla fine della guerra. La collezione era stata frettolosamente portata dal Prof. Melis nelle cantine della Villa dei Marchesi Frescobaldi nel timore che la collezione fosse razziata dal passaggio delle truppe

– Pubblicato marzo 2019

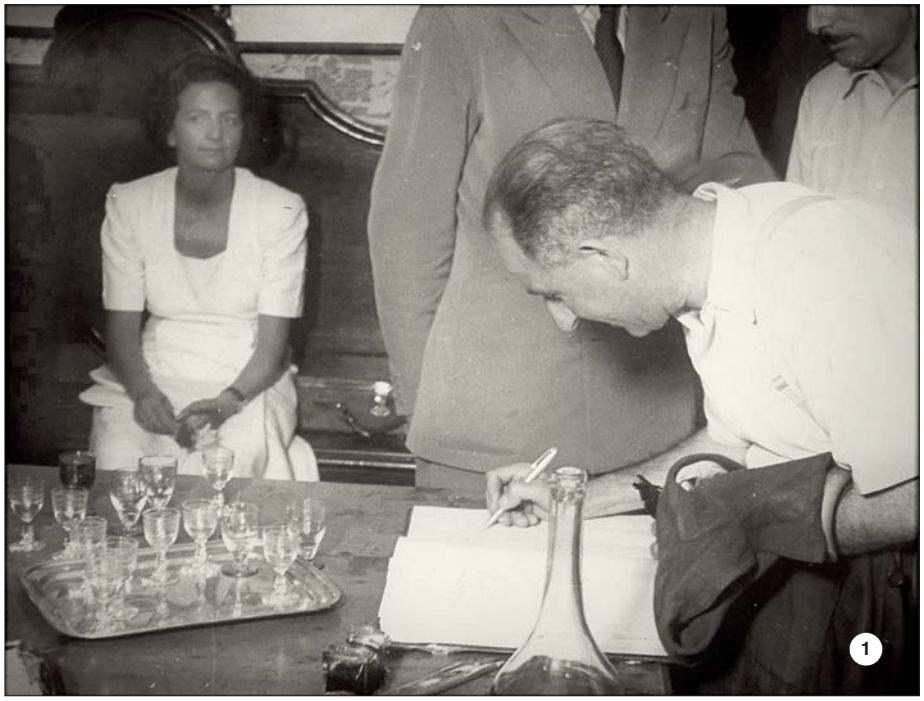


Foto 1 e 2 (1948) – Fausta Pegazzano da poco arrivata alla Stazione di Entomologia con il Prof. Venturi in occasione della "Riunione degli specialisti per la difesa delle derrate alimentari dai parassiti animali" (6-18 settembre 1948). Nella parte centrale della foto 2 è riconoscibile un giovanissimo Baccio Baccetti.

tedesche in ritiro. La collezione fino dagli anni '60 era molto frequentata da acarologi di tutto il mondo in conseguenza della scomparsa della collezione acarologica di Oudemans distrutta nel bombardamento di Amsterdam. L'incarico di curatrice della collezione e la frequentazione degli acarologi stranieri che soggiornavano a Firenze per lo studio del materiale di Berlese, convinsero Fausta Pegazzano ad occuparsi di acari, sollecitata anche dal Direttore della Stazione per l'insorgenza dei danni alle produzioni agricole causate dagli acari fitofagi non più tenuti a freno dagli acari fitoseidi predatori molto sensibili agli esteri fosforici e agli anticrittogamici dithiocarbammati, usati nel periodo 1960-70, che stimolavano la fertilità dei Tetranichidi.

La frequente presenza a Firenze del Prof. Alessandro Filipponi, dell'Istituto Superiore di Sanità, per studiare le numerose specie di acari Macrochelidi della collezione Berlese portò Fausta Pegazzano ad occuparsi di questo importante gruppo di acari attivi nel controllo di uova e pupe di mosche.

Nei primi anni del '70 avviene la riforma delle Stazioni Sperimentali del Ministero dell'Agricoltura e la creazione degli Istituti Sperimentali come organi tecnici del Ministero. La Stazione di Entomologia prendeva il nome di Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria e nell'ambito della riforma venivano anche create le Sezioni specialistiche e, fra queste, quella di Acarologia. Logicamente la Signorina Pegazzano partecipò al concorso per la Direzione e

Foto 3 e Foto 4 (1955-1960) – Riunione conviviale in un ristorante di Firenze con il Prof. Melis, i colleghi sperimentatori della Stazione e i rispettivi familiari.

nel 1977 ricevette la nomina ufficiale. In quegli anni partecipò a diverse missioni tecniche per convegni dell'OILB come specialista di acari legati all'olivo e alla vite. (Foto 5 e 6).

Dal 1972 al 1976 la Sezione di Acarologia, grazie ai numerosi concorsi per sperimentatore previsti dalla riforma degli Istituti Sperimentali, fu incrementata con l'arrivo di Marisa Castagnoli, il sottoscritto e Marialivia Liguori. Ricordo benissimo che in quegli anni numerosi e importanti acarologi americani conosciuti da Fausta Pegazzano nei primi congressi internazionali di Acarologia negli Stati Uniti e in Inghilterra vennero a Firenze per studiare il materiale di Berlese: alcune specie presenti nella collezione risultavano nuove per gli specialisti dei differenti gruppi sistematici ed alcune di esse furono proprio dedicate a Pegazzano. Nel 1978 gli era stata assegnata l'onorificenza di "Commendatore Ordine al Merito della Repubblica italiana".

La produzione scientifica si può brevemente articolare in tre principali periodi. Nei primi anni di permanenza nella Stazione di Entomologia, Fausta Pegazzano si interessa di cocciniglie e fino al 1960 i suoi lavori sono incentrati sui coccidi dei fruttiferi e della vite. Dal 1961 inizia ad interessarsi degli acari Tetranichidae e parallelamente dei Mesostigmata Macrochelidae in collaborazione con Alessandro Filipponi.

All'inizio degli anni '70 comincia a interessarsi degli acari fitofagi dell'olivo e in particolare dei Prostigmata della fam. Tenuipalpidae, in collaborazione

Foto 5 e 6 – Escursione negli oliveti della Maremma toscana e sulla scalinata del Duomo di Massa Marittima in occasiona della gita fatta nell'ambito del progetto "Difesa Biologica e Integrata in Olivicoltura", promosso e coordinato da Raffaele Cavalloro nel giugno del 1980.

con Marisa Castagnoli descrive una nuova specie infeudata all'olivo.

Pegazzano e Castagnoli divenute molto esperte di questo gruppo di Prostigmata si interessano alle faunistiche dei Tenuipalpidae sulle piante dei generi *Pinus* e *Quercus* in Italia e sull'olivo. Nel 1986 Pegazzano e Castagnoli curano il capitolo degli Acari nel volume "Entomologie oleicole" curato dal Prof. Yves Arambourg della Stazione di Zoologia e lotta biologica di Antibes. Il volume venne realizzato con il contributo di tutti i partecipanti ai due corsi internazionali di Entomologia oleicola tenuti ad Antibes nel 1983 e 1985.

A partire dal 1970 Pegazzano e Castagnoli cominciarono una minuziosa ricognizione di tutto il materiale della collezione Berlese compresa la bibliografia di ogni specie descritta da Berlese stesso. Tutto il loro lavoro risulta poi condensato nell'importante catalogo cartaceo della collezione, pubblicato nel 1985 ed estremamente utile per la conservazione di questo patrimonio.

Nel frattempo, a partire dal 1983 stava esplodendo in tutta Europa il problema "Varroa" e Fausta Pegazzano venne incaricata di partecipare al "1° Meeting di Esperti in acarologia su *Varroa jacobsoni"* organizzato dalla Commissione delle Comunità Europee, Direttorato Generale per l'Agricoltura, tenuto a Wageningen, Olanda, nel febbraio del 1983. Nello stesso anno il sottoscritto e Fausta Pegazzano, sollecitati dai colleghi della Sezione di Apicoltura di Roma (Marina Tonini D'Ambrosio e Marco Accorti) realizzammo la prima pubblicazione in italiano su *Varroa* che riassumeva tutte le conoscenze al momento acquisite su questa specie particolarmente pericolosa per l'apicoltura.

Nel 1986 era entrata a far parte del nostro sodalizio.

Fausta era molto legata alla madre e tutti i sabato mattina tornava a La Spezia per assisterla in quanto ormai novantenne, ma straordinariamente lucida e attiva; poi ogni domenica si dedicava alle uscite in barca a vela che lei diceva era stata la sua passione fin da ragazzina. Ricordava sempre che i suoi primi risparmi dello stipendio da sperimentatore li aveva impiegati proprio per comprarsi una barca. La sua passione per le uscite in mare, principalmente per fare lunghe nuotate al largo, anche in primavera e autunno, si è mantenuta fino oltre i settanta anni e poiché usciva sempre da sola raccontava che un paio di volte aveva rischiato di non riuscire a risalire sulla barca, anzi una volta che la scaletta si era staccata dal bordo della barca ed era affondata, nei ripetuti tentativi di issarsi a bordo si era slogata un polso e dal dolore aveva rischiato di affogare.

Nel settembre del 1981 un sabato pomeriggio mentre con la madre stava recandosi alla messa fu investita in pieno da uno scuterista nel viale pedonale antistante la chiesa. Mentre la madre rimase illesa, Fausta subì numerosi traumi anche al cranio e per cinque giorni rimase in coma fra la vita e la morte nell'ospedale di La Spezia. La sua forte fibra le permise di uscire dal coma e fu quindi trasferita in ospedale specialistico di Genova; dopo circa 10 mesi fu capace di tornare a Firenze ad occuparsi di acari. Nel 1985 con il compimento dei 65 anni fu posta in pensione ma continuava assiduamente a frequentare l'Istituto per e i suoi studi sugli acari e la cura della Collezione Berlese. (Foto 7, 8 e 9)

Superati gli 85 anni purtroppo iniziarono alcuni problemi neurologici e non potendo più vivere da sola accettò volontariamente il ricovero in una adeguata casa di riposo vicino alla sua di Porta Romana. Con l'avanzare del tempo

Foto 7 – Agosto 1990, a CeskéBudejovice, Cecoslovacchia VIII Congresso Internazionale di Acarologia.

Foto 8 – Marzo 1997, nel chiostro dell'Istituto di Zoologia a Cascine del Riccio; il gruppo degli acarologi (Marisa Castagnoli, Marialivia Liguori e Roberto Nannelli) allievi di Pegazzano con la collega americana Flora Gorirossi.

Foto 9 – Ottobre 1997. In occasione della visita all'Istituto di Zoologia del Cardinale Silvano Piovanelli (il Cardinale, Fausta Pegazzano la bibliotecaria Sig. Giovanna Simonelli e il Direttore dell'Istituto Marco Covassi).

pur rimanendo autosufficiente perse la capacità di conoscenza anche con chi era stato il più stretto collaboratore.

Il 28 agosto 2013 è deceduta (a 93 anni) in una residenza assistita dopo sei giorni dal trasferimento dalla casa di riposo dove aveva vissuto nei sette anni precedenti. Purtroppo la notizia della sua morte ci è pervenuta indirettamente dopo circa un anno e mezzo dalla scomparsa, in quanto i suoi parenti più stretti, i nipoti, ormai anche loro molto anziani, non ci hanno opportunamente informato dell'evento.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 57-61*

# INTERAZIONE OSPITE-PARASSITOIDE: ANALISI DEI FATTORI DI VIRULENZA NEL MODELLO *DROSOPHILA*

GIUSEPPE GARGIULO[a]

[a] *Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Bologna, Italia*;
email: giuseppe.gargiulo@unibo.it
Lettura tenuta nella Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 24 febbraio 2018

*Host-parassitoid interaction: analysis of virulence factors in the* Drosophila *model*

Parasitic wasps during oviposition release, along with the egg, venom and ovarian secretions; some wasps also secrete free viral particles of symbiotic polydnaviruses (PDVs). Viral proteins perform a coordinated action with the wasp secretions in order to block the immune response and destroy the endocrine balance of the host. Among the most widely conserved PDV proteins, there are the ankyrin motif proteins (ANKs). These ANK proteins share similarity with insects and mammalian IκB (inhibitor of NF-κB) proteins. However, they lack of regulatory domains for signal-mediated degradation and turnover; this peculiar structure confers them an immunosuppressive capacity. To deeply understand ANK proteins functions, an essential contribution is provided by the use of model organisms such as *Drosophila melanogaster*. We used *Drosophila* to investigate the role of two ANK proteins, *Tn*BVANK1 e *Tn*BVANK3, encoded by the PDV associated with the wasp *Toxoneuron nigriceps*, which parasitizes the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. The expression of *TnBVank1* or *TnBVank3* genes in the *Drosophila* prothoracic gland, which synthesizes the ecdysone, deeply affects the ecdysone biosynthesis causing a block of the transition from the larval to pupal stages. Interestingly, these two genes target different parts of the ecdysone biosynthetic pathway, while *Tn*BVANK1 blocks the cholesterol trafficking, *Tn*BVANK3 causes a reduced expression of the steroidogenic genes. These findings suggest that *Tn*BVANK1 and *Tn*BVANK3 may act in the natural host as virulence factors exerting synergistic and non-overlapping functions to disrupt the ecdysone biosynthesis.

KEY WORDS: Parasitic wasps, polydnaviruses, *Drosophila melanogaster*, ANK proteins, ecdysone biosynthesis.

## INTRODUZIONE

Le vespe parassite rappresentano il più grande gruppo di insetti parassitoidi che attaccano e parassitano un ampio numero di specie di insetti nei quali inducono una serie di alterazioni fisiologiche e di sviluppo, che sono essenziali per creare un ambiente adatto allo sviluppo della loro progenie (PENNACCHIO e STRAND, 2006). Questa regolazione dell'ospite è un complesso processo che è mediato da una rete di interazioni molecolari, innescate e controllate da fattori prodotti e rilasciati nell'ospite dalle femmine durante l'ovideposizione (cioè veleno, simbionti microbici, secrezioni ovariche) e/o dall'embrione (dai teratociti, cellule derivanti dalla dissociazione della membrana embrionale) o dalle larve (PENNACCHIO e STRAND, 2006). Tra i simbionti microbici, i polydnavirus (PDV) sono potenti agenti immunosoppressivi associati ad alcune vespe icneumonidi e braconidi che parassitizzano larve di lepidotteri e rispettivamente classificati nei generi icnovirus (IV) e bracovirus (BV) (PENNACCHIO e STRAND, 2006, STRAND e BURKE, 2015). I PDV sono integrati come provirus nel genoma della vespa e si replicano solo nelle cellule epiteliali del calice ovarico per produrre i virioni che vengono iniettati nell'ospite all'atto della ovideposizione. I PDV non si replicano nell'ospite ma sono in grado di infettare i sui tessuti esprimendo potenti fattori di virulenza coinvolti nella regolazione dell'ospite (HERNIOU *et al.,* 2013, STRAND e BURKE, 2015). Il genoma segmentato dei PDV è costituito da più molecule circolari di DNA di dimensioni diverse, e comprende sia regioni non codificanti che geni con una struttura eucariotica, spesso organizzati in famiglie geniche (HERNIOU *et al.,* 2013, STRAND e BURKE, 2015). Una delle famiglie geniche più conservate nei PDV, e presenti sia negli icnovirus che nei bracovirus, codifica per proteine con ripetizioni di anchirine (ANK), che sono virtualmente espresse in tutti i tessuti dell'ospite parassitizzato e che sono associate a numerosi effetti patologici, che vanno dalle alterazioni immunitarie a quelle dello sviluppo (FALABELLA *et al.,* 2007, STRAND e BURKE, 2013). Le proteine ANK virali mostrano omologia aminoacidica con i membri della famiglia delle proteine IκB (inibitore di NF-κB), che controllano la segnalazione dei fattori trascrizionali NF-κB (fattore nucleare κB) nella risposta immunitaria innata sia negli insetti che nei vertebrati (SILVERMAN e MANIATIS, 2001). Le proteine della famiglia IκB legandosi alle proteine NF-kB ne regolano il trasporto nucleare. A differenza delle proteine IκB,

– Pubblicato marzo 2019

le proteine ANK virali non hanno le sequenze di regolazione per la loro degradazione sia indotta che basale. Queste proteine sembrano legarsi irreversibilmente ai fattori NF-κB bloccando il loro trasporto nel nucleo e quindi la loro funzione di attivatori trascrizionali di geni antimicrobici. Pertanto, per alcuni membri dei geni *ank* dei PDV è stata proposta e dimostrata la funzione di soppressori del sistema immunitario dell'ospite (Thoetkiattikul *et al.,* 2005, Falabella *et al.,* 2007, Bitra *et al.,* 2012).

La funzione dei geni dei PDV nel controllare lo sviluppo dell'ospite è stata di minor oggetto di studio e quindi le nostre conoscenze sono limitate. Ciò è dovuto alla complessità dei meccanismi di sviluppo e all'azione concomitante di vari fattori di virulenza, che spesso hanno effetti ridondanti e sovrapposti (Beckage e Gelman, 2004, Pennacchio e Strand, 2006, Gueguen *et al.,* 2013).

L'identificazione dei fattori di virulenza dei PDV coinvolti nella regolazione dello sviluppo dell'ospite, rappresenta un interessante argomento di indagine che potrebbe fornire vantaggiose opportunità per l'isolamento di nuovi geni e di molecole con potenziale attività insetticida. Il fatto che i geni *ank* siano largamente presenti nel genoma di molti PDV ha suggerito che i fattori di virulenza da essi prodotti possano svolgere molteplici funzioni nella regolazione dell'ospite.

La specie parassitoide oggetto del nostro studio è *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera, Braconidae), un parassitoide endofago degli stadi larvali di *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). La sua attività parassitoide è associata ad un polydnavirus (*Tn*BV) che viene iniettato al momento dell'ovideposizione insieme alle uova e che è responsabile della alterazione della risposta immunitaria e del bilancio endocrino dell'ospite. L'associazione ospite-parassitoide *Heliothis virescens*-*Toxoneuron nigriceps* fornisce un prezioso modello sperimentale per studiare le basi molecolari dell'arresto dello sviluppo delle larve mature, che è dovuto ad un'azione combinata del *Tn*BV e dei teratociti, che rispettivamente alterano la sintesi degli ecdisteroidi nelle ghiandole protoraciche (Pennacchio *et al.,* 1997, Pennacchio *et al.,* 1998) e il metabolismo degli ecdisteroidi.

Allo scopo di acquisire conoscenze sulla possibile funzione svolta dai geni *ank* nel controllare lo sviluppo dell'ospite, ci siamo avvalsi della *Drosophila melanogaster* come sistema modello per eseguire una fine analisi funzionale di due dei tre geni *ank* presenti nel genoma di *Tn*BV: i geni *TnBVank1* e *TnBVank3*. Le potenti tecniche di genetica molecolare che possono essere applicate a tale modello (del Valle Rodriguez *et al.,* 2011) ci hanno consentito di studiare l'effetto dell'espressione di tali geni durante lo sviluppo.

### *Tn*BVank1 e *Tn*BVank3 agiscono come fattori di virulenza bloccando la sintesi dell'ecdisone

In *Drosophila*, come negli altri insetti olometaboli lo sviluppo avviene attraverso una serie di transizioni finemente temporizzate. Dopo la schiusa dell'uovo, la larva va incontro a tre stadi di sviluppo separati da mute, e seguiti dalla formazione della pupa e la metamorfosi. La durata di ciascuno stadio di sviluppo e quindi la tempistica di ogni transizione di sviluppo è influenzata da segnali nutrizionali e ambientali ed è dettata dall'ormone ecdisone. La metamorfosi inizia dopo che la larva, una volta raggiunta la dimensione appropriata nota come peso critico, si impupa. In *Drosophila* le larve raggiungono il peso critico durante la prima metà del loro terzo stadio di sviluppo e questo è associato all'attivazione della steroidogenesi che porterà alla formazione di un picco di sintesi dell'ecdisone. Poichè la via metabolica che porta alla sintesi dell'ecdisone è ben conservata negli insetti (Niwa e Niwa, 2014), abbiamo utilizzato la *Drosophila* per studiare il possibile effetto dell'espressione dei geni *TnBVank1* e *TnBVank3* nella biosintesi di tale ormone. In *Drosophila* la ghiandola ad anello è il principale sito di sintesi e rilascio degli ormoni dello sviluppo. Questa ghiandola (Fig. 1, A) è composta dalla ghiandola protoracica (PG), che sintetizza ecdysone (E); il corpus allatum (CA) che produce l'ormone giovanile; e il corpora cardiaca (CC), che svolge un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi metabolica (Kim e Rulifson, 2004).

La biosintesi dell'ecdisone avviene nelle cellule steroidogeniche della PG a partire dal colesterolo (C) (Fig. 1, B). Gli insetti non sono in grado di sintetizzare il colesterolo che è assunto dalla dieta (Gilbert e Warren, 2005), ed entra nelle cellule steroidogeniche attraverso la via endocitica delle lipoproteine a bassa densità (LDL) mediata dal recettore LDLR (Rodenburg e Van der Horst, 2005). Vari geni coinvolti nella sintesi dell'ecdisone sono stati identificati e caratterizzati in *Drosophila* (Fig. 1B) (Gilbert e Warren, 2005, Niwa e Niwa, 2014). La prima reazione enzimatica della via biosintetica, la conversione del colesterolo in 7-deidrocolesterolo (7dC) è catalizzata dall'enzima Neverland (Nvd). 7dC è convertito in 5β-ketodiol (KD) attraverso una fase biosintetica non completamente caratterizzata (Black Box), in cui sono coinvolte le proteine Shroud (Sro), Spook (Spo) e Spookier (Spok). Phantom (Phm) trasforma KD in ketotriol (KT), Disembodied (Dib) converte KT in 2-deoxyecdysone (2dE) e Shadow (Sad) converte 2dE in ecdysone (E). Una volta sintetizzato, l'ecdisone è rilasciato nell'emolinfa e nei tessuti periferici viene convertito nella sua forma attiva 20-idrossiecdisone (20E) dall'enzima Shade (Shd).

Allo scopo di indurre l'espressione dei geni *TnBVank1*

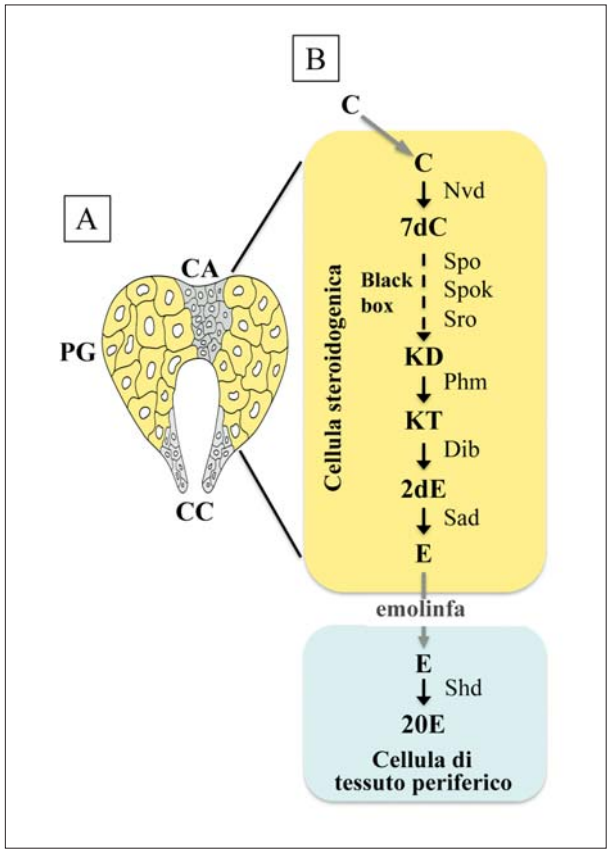



Fig. 1 – (A) Disegno raffigurante la ghiandola ad anello di *Drosophila*, composta dalla ghiandola protoracica (PG), il corpus allatum (CA) e i corpora cardiaca (CC).
(B) Schema della via biosintetica che dal colesterolo porta alla formazione dell'ecdisone.

e *TnBVank3* specificamente nella PG abbiamo utilizzanto il sistema binario Gal4/UAS (Brand e Perrimon, 1993). Tale tecnica consente l'espressione genica condizionale basata sulle proprietà transattivatrici della proteina Gal4 di lievito, che legandosi alle sequenze attivatrici UAS attiva l'espressione di geni posti sotto il controllo di tali sequenze. Questa tecnica è ampiamente usata in *Drosophila* per controllare l'espressione spaziale e temporale sia di geni omologhi che eterologhi introdotti nel suo genoma come transgeni. Abbiamo prodotto linee transgeniche indipendenti portanti i geni *TnBVank1* e *TnBVank3* posti sotto il controllo delle sequenze UAS. I transgeni *UAS-TnBVank1* e *UAS-TnBVank3* sono stati singolarmente sovraespressi nella PG utilizzando la linea transgenica *phantom-Gal4* che esprime la proteina Gal4 specificamente e ad alto livello nelle cellule della PG (Mirth *et al.,* 2005). Dall'incrocio tra individui appartenenti a questa linea con individui delle linee transgeniche *UAS-TnBVank1* e *UAS-TnBVank3* è stato possibile ottenere una progenie larvale in cui il transgene specifico è espresso nella PG.

I risultati da noi ottenuti hanno evidenziato che sia l'espressione del gene *TnBVank1* che del gene *TnBVank3* nella PG producono una drastica riduzione della sintesi dell'ecdisone causando una alterazione dello sviluppo con il blocco della transizione dallo stadio larvale a quello pupale (Valzania *et al.,* 2014, Ignesti *et al.,* 2018). Tale fenotipo è completamente penetrante e mima quello osservato nelle larve di *H. virescens* parassizzate da *T. nigriceps* (Pennacchio *et al.,* 1994). Le larve non si impupano e continuano a nutrirsi aumentando enormemente di dimensione e la loro prolungata vita larvale si può protrarre fino a 3-4 settimane, (Fig. 2). Questo fenotipo può essere recuperato se al cibo delle larve viene aggiunto l'ecdisone nella sua forma attiva, il 20-idrossiecdisone. Pertanto, il fenotipo prodotto dall'espressione dei geni *ank* nella PG non è causato da una alterazione irreversibile dello sviluppo, ma dall'assenza dell'ecdisone.

La localizzazione della proteina *Tn*BVANK1 nelle cellule della PG esprimenti *TnBVank1* è stata rilevata in esperimenti di immunoistochiomica utilizzando

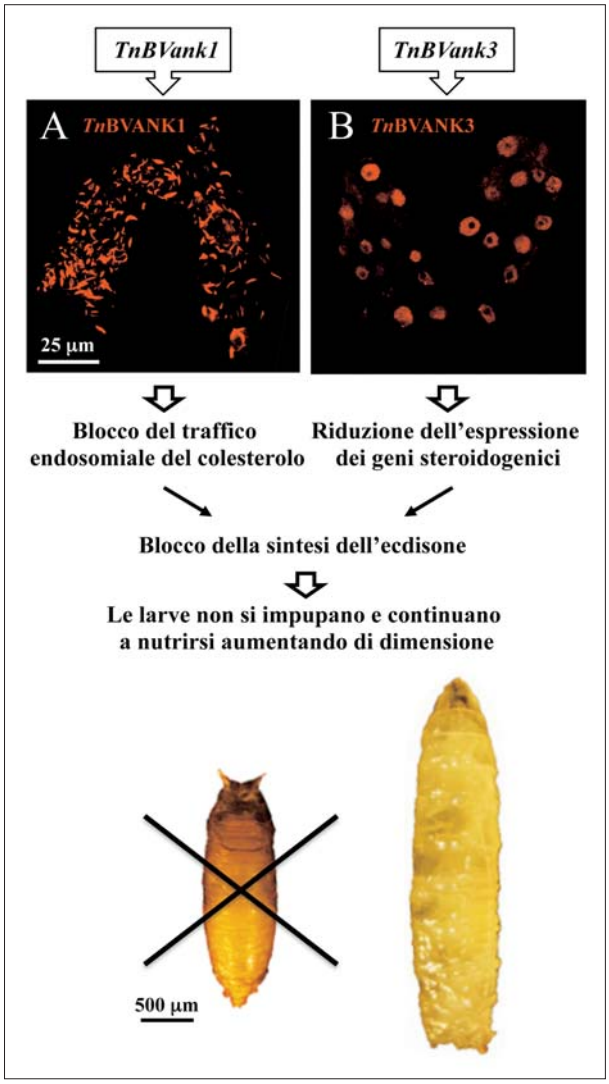



Fig. 2 – Effetto dell'espressione dei geni *TnBVank1* e *TnBVank3* nella ghiandola protoracica di *Drosophila.* (A, B) Immagini di microscopia confocale di ghiandole protoraciche isolate da larve al terzo stadio di sviluppo, mostranti la localizzazione delle proteine *Tn*BVANK1 (A) e *Tn*BVANK3 (B).

un anticorpo policlonale diretto contro due peptidi sintetici di *Tn*BVANK1 (Duchi *et al.,* 2010). Come mostrato in Fig. 2A, la proteina è fortemente espressa ed è presente solo nel citoplasma delle cellule della PG. Gli studi da noi condotti hanno dimostrato che *Tn*BVANK1 interagisce con gli endosomi alterandone la funzione. La proteina *Tn*BVANK1 agisce come un fattore di virulenza che impedendo il traffico vescicolare dei precursori degli ecdisteroidi nelle cellule steroidogeniche della PG causa il blocco della sintesi dell'ecdisone e quindi l'arresto dello sviluppo (Valzania *et al.,* 2014).

La localizzazione di TnBVANK3 nelle cellule della PG che esprimono il gene *TnBVank3* è stata analizzata mediante esperimenti di immunoistochimica utilizzando un anticorpo anti-HA (anti-emagglutinina) in quanto nella produzione del transgene *TnBVank3* abbiamo introdotto al 3' del gene le sequenze codificanti per l'epitopo HA in modo tale da ottenere una proteina chimerica il cui profilo di espressione può essere seguito grazie alla presenza di tale epitopo all'estremità N-terminale. La proteina *Tn*BVANK3 mostra una localizzazione nucleare in tutte le cellule della PG (Fig. 2, B). Questo ha suggerito un suo possibile coinvolgimento nel controllare l'espressione dei geni componenti la via biosintetica dell'ecdisone. Abbiamo analizzato i livelli di espressione dei geni steroidogenici *nvd*, *spok*, *sro*, *phm*, *dib* e *sad* (Fig. 1, B) di PG esprimenti il gene *TnBVank3*. Rispetto a larve di controllo, abbiamo riscontrato una significativa riduzione della trascrizione di tali geni con un effetto più severo sui geni *nvd*, *spok* and *sro* (Ignesti *et al.,* 2018).

La via biosintetica dell'ecdisone si realizza grazie all'induzione dell'espressione dei vari geni steroidogenici che è sotto il controllo di varie vie di segnalazione (Niwa e Niwa, 2016). L'ormone protoracicotropo (PTTH) prodotto dal cervello attraverso la sua segnalazione al recettore Torso nelle cellule della PG stimola la sintesi di ecdisone (McBrayer *et al.,* 2007, Rewitz *et al.,* 2009). La via di segnalazione insulina/TOR (bersaglio della rapamicina), che è coinvolta nel controllo del tasso di crescita e della dimensione corporea, promuove la crescita delle cellule della PG e la loro attività biosintetica (Yamanaka *et al.,* 2013).

Mediante una analisi sia genetica che molecolare abbiamo dimostrato che l'espressione di *TnBVank3* nella PG causa la riduzione della trascrizione dei geni componenti la via di segnalazione insulina/TOR producendo un effetto negativo sulla biosintesi dell'ecdysone (Ignesti *et al.,* 2018). Oltre ad una azione indiretta nella sottoregolazione dei geni steroidogenici, non è da escludere una possibile azione diretta da parte di *Tn*BVANK3 sul controllo di tali geni. Inoltre, resta da analizzare se *Tn*BVANK3 possa avere un impatto anche su altre vie di segnalazione coinvolte nella regolazione della steroidogenesi.

## Conclusioni

L'analisi funzionale dei geni *TnBVank1* e *TnBVank3* mediante espressione nel modello *Drosophila* ha evidenziato il loro ruolo nell'alterare la sintesi dell'ecdisone. È interessante notare che le proteine codificate da tali geni agiscono in specifici passaggi della via biosintetica dell'ecdisone. *Tn*BVANK1 agisce nel citoplasma, bloccando il traffico endosomiale del colesterolo, mentre *Tn*BVANK3 si localizza nel nucleo e provoca una ridotta espressione dei geni steroidogenici, L'elevata somiglianza tra i fenotipi dell'ospite naturale indotti dall'infezione di PDV con quelli prodotti in *Drosophila* dalle proteine *Tn*BVANK1 e *Tn*BVANK3 suggerisce che gli effetti complementari e sinergici di questi due fattori di virulenza possano essere adottati dalle vespe parassite per garantire un blocco completo della biosintesi dell'ecdisone dell'ospite.

## BIBLIOGRAFIA


Beckage N.E., Gelman D.B., 2004 – *Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control.* - Annu. Rev. Entomol., 49: 299-330.

Bitra K., Suderman R.J., Strand M.R., 2012 – *Polydnavirus Ank proteins bind NF-kappaB homodimers and inhibit processing of Relish.* - PLoS Pathog., 8: e1002722.

Brand A.H., Perrimon N., 1993 – *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.* – Development, 118: 401-415.

del Valle Rodriguez A., Didiano D., Desplan C., 2011 – *Power tools for gene expression and clonal analysis in* Drosophila*.* - Nat Methods, 9: 47-55.

Duchi S., Cavaliere V., Fagnocchi L., Grimaldi M.R., Falabella P., Graziani F., Gigliotti S., Pennacchio F., Gargiulo G., 2010 – *The impact on microtubule network of a bracovirus IkappaB-like protein.* - Cell. Mol. Life Sci., 67: 1699-1712.

Falabella P., Varricchio P., Provost B., Espagne E., Ferrarese R., Grimaldi A., de Eguileor M., Fimiani G., Ursini M.V., Malva C., Drezen J.M., Pennacchio F., 2007 – *Characterization of the IkappaB-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies.* - J. Gen. Virol., 88: 92-104.

Gilbert L.I., Warren J.T., 2005 – *A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone.* - Vitam. Horm., 73: 31-57.

Gueguen G., Kalamarz M.E., Ramroop J., Uribe J., Govind S., 2013 – *Polydnaviral ankyrin proteins aid parasitic wasp survival by coordinate and selective inhibition of hematopoietic and immune NF-kappa B signaling in insect hosts.* - PLoS Pathog., 9: e1003580.

Herniou E.A., Huguet E., Theze J., Bezier A., Periquet G., Drezen J.M., 2013 – *When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnaviruses.* - Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 368: 20130051.

Ignesti M., Ferrara R., Romani P., Valzania L., Serafini G., Pennacchio F., Cavaliere V., Gargiulo G., 2018 – *A polydnavirus-encoded ANK protein has a negative impact on steroidogenesis and development.* - Insect Biochem. Mol. Biol., 95: 26-32.

Kim S.K., Rulifson E.J., 2004 – *Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by Drosophila corpora cardiaca cells.* – Nature, 431: 316-320.

McBrayer Z., Ono H., Shimell M., Parvy J.P., Beckstead R.B., Warren J.T., Thummel C.S., Dauphin-Villemant C., Gilbert L.I., O'Connor M.B., 2007 – *Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in* Drosophila*.* - Dev. Cell., 13: 857-871.

Mirth C., Truman J.W., Riddiford L.M., 2005 – *The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in* Drosophila melanogaster*.* - Curr. Biol., 15: 1796-1807.

Niwa R., Niwa Y.S., 2014 – *Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond.* - Biosci. Biotechnol. Biochem., 78: 1283-1292.

Niwa Y.S., Niwa R., 2016 – *Transcriptional regulation of insect steroid hormone biosynthesis and its role in controlling timing of molting and metamorphosis.* - Dev. Growth Differ., 58: 94-105.

Pennacchio F., Falabella P., Sordetti R., Paola V., Malva C., Bradleigh Vinson S., 1998 – *Prothoracic gland inactivation in Heliothis virescens (F.) (Lepidoptera:Noctuidae) larvae parasitized by* Cardiochiles nigriceps *Viereck (Hymenoptera:Braconidae).* - J. Insect Physiol., 44: 845-857.

Pennacchio F., Sordetti R., Falabella P., Vinson S.B., 1997 – *Biochemical and ultrastructural alterations in prothoracic glands of* Heliothis virescens *(F.) (Lepidoptera: Noctuidae) last instar larvae parasitized by* Cardiochiles nigriceps *Viereck (Hymenoptera: Braconidae).* - Insect Biochem. Mol. Biol., 27: 439-450.

Pennacchio F., Strand M.R., 2006 – *Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera.* - Annu. Rev. Entomol., 51: 233-258.

Pennacchio F., Vinson S.B., Tremblay E., Tanaka T., 1994 – *Biochemical and developmental alterations of* Heliothis virescens *(F.) (lepidoptera, noctuidae) larvae induced by the endophagous parasitoid* Cardiochiles nigriceps *viereck (Hymenoptera, braconidae).* - Arch. Insect Biochem. Physiol., 26: 211-233.

Rewitz K.F., Yamanaka N., Gilbert L.I., O'Connor M.B., 2009 – *The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis.* – Science, 326: 1403-1405.

Rodenburg K.W., Van der Horst D.J., 2005 – *Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members.* - Biochim. Biophys. Acta. 1736: 10-29.

Silverman N., Maniatis T., 2001 – *NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity.* - Genes Dev., 15: 2321-2342.

Strand M.R., Burke G.R., 2013 – *Polydnavirus-wasp associations: evolution, genome organization, and function.* - Current opinion in virology, 3: 587-594.

Strand M.R., Burke G.R., 2015 – *Polydnaviruses: From discovery to current insights.* - Virology, 479-480: 393-402.

Thoetkiattikul H., Beck M.H., Strand M.R., 2005 – *Inhibitor kappaB-like proteins from a polydnavirus inhibit NF-kappaB activation and suppress the insect immune response.* - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102: 11426-11431.

Valzania L., Romani P., Tian L., Li S., Cavaliere V., Pennacchio F., Gargiulo G., 2014 – *A polydnavirus ANK protein acts as virulence factor by disrupting the function of prothoracic gland steroidogenic cells.* - PLoS One, 9: e95104.

Yamanaka N., Rewitz K.F., O'Connor M.B., 2013 – *Ecdysone control of developmental transitions: lessons from* Drosophila *research.* - Annu. Rev. Entomol., 58: 497-516.

62 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 63-67*

# LA MIRMECOFILIA NELLE FARFALLE DIURNE EUROPEE

EMILIO BALLETTO[a] - FRANCESCA BARBERO[a] - SIMONA BONELLI[a] - LUCA PIETRO CASACCI[a, b]

[a] *Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Via Accademia Albertina 13, 10123 Torino, Italia. emilio.balletto@unito.it*
[b] *Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Wilcza 64, 00-679, Warsaw Poland.*
Lettura tenuta nella Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 9 giugno 2018.

*Myrmecophily in European butterflies*

The authors provide a synopsis of the currently available information on European *Maculinea*-type butterfly-ant interactions.

KEY WORDS: *Origanum*, carvacrol, communication, cuticular hydrocarbons, stridulations.

## LA MIRMECOFILIA

Per gli insetti, ma non soltanto, le formiche sono nemici poderosi, capaci di portarsi al formicaio qualsiasi essere vivente che abbia dimensioni appropriate, intero o tagliato a pezzi, secondo la convenienza. D'altra parte, i formicai sono un ambiente potenzialmente ideale per qualunque artropode che abbia lungo sviluppo, in quanto 1) garantiscono temperatura e umidità costanti anche in inverno, 2) sono molto ben difesi contro gli intrusi, 3) contengono abbondanti riserve di cibo e 4) sono duraturi nel tempo. Per poter sfruttare le risorse del formicaio, gli organismi mirmecofili (=amanti delle formiche) devono superare le difese del nido e farsi accettare all'interno della colonia.

Anche se solo in pochi casi sono state studiate in dettaglio, le associazioni mirmecofile sono largamente diffuse nel mondo degli Artropodi, e sono note almeno negli: 1) Isopoda (DEKONINCK *et al.,* 2007); 2) Aranea (cfr. CUSHING, 1997; ELGAR e ALLAN 2006); 3) Psuedoscorpionida (PARMENTIER *et al.,* 2014); 4) Acarina (PARMENTIER *et al.,* 2014); 5) Diplopoda e Chilopoda (GLASIER *et al.,* 2018); 6) Collembola (CASTAÑO-MENESES *et al.,* 2014); 7) Thysanura (HÖLLDOBLER e WILSON 1990); 8) Orthoptera Komatsu *et al.,* 2016; 9) Blattodea (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990); 10) Homoptera (WAY, 1963); 11) Hemiptera (PARMENTIER *et al.,*2014); 12) Psocoptera (HÖLLDOBLER e WILSON 1990); 13) Neuroptera (TAUBER *et al.,* 2014); 14) Coleoptera (cfr. HÖLLDOBLER, 1969; GEISELHARDT *et al.*, 2007);15) Lepidoptera (HINTON, 1949, PIERCE *et al.*, 2002); 16) Diptera (PARMENTIER *et al.,*2014); e 17) Hymenoptera (PARMENTIER *et al.,*2014).

## FARFALLE MIRMECOFILE

Nel caso delle farfalle diurne (Papilionoidea) oltre 4000 specie, quasi tutte Lycaenidae e Riodinidae, sono note per avere rapporti mirmecofili di vario genere. Per quanto riguarda ad esempio i licenidi, solo il 25% delle circa 600 specie note mancano di qualsiasi forma di associazione con le formiche, mentre il 45% delle specie sono mirmecofili facoltativi e il 30% sono obbligatoriamente commensali o parassiti di formiche (FIEDLER, 1991).

Le larve delle farfalle mirmecofile presentano diversi adattamenti a questo tipo di vita, quali l'inspessimento della cuticola (200-300 μm invece di 10-15 μm) e la presenza di particolari ghiandole dorsali note come organi dorsali del nettare, organi poro-cupola (Fig. 1A, B) e organi tentacolari. Inoltre sia le larve, sia le pupe sono in grado di emettere stridulazioni, tramite meccanismi ormai ben noti almeno nelle pupe (Fig. 1C). L'estroflessione degli organi tentacolari (Fig. 1D), presenti solo nei mirmecofili facoltativi, avviene quando le larve sono in condizioni di stress ed emettono sostanze chimiche; anche se il meccanismo non è chiaro, tali comportamenti inducono nelle formiche reazioni simili a quelle causate dall'emissione dei feromoni d'allarme. L'organo nettarifero dorsale, presente al centro delle parti postero-dorsali delle larve di tutti i mirmecofili, emette una gocciolina di liquido zuccherino almeno quando è stimolato dalle formiche ed induce in queste ultime la messa in atto di comportamenti protettivi (pulitura ecc.). Gli organi poro-cupola sembrano essere capaci di sopprimere l'insorgere di azioni aggressive.

## IL 'SISTEMA *MACULINEA*'

Fra le farfalle diurne europee, solo le 5 specie del genere *Maculinea* (Fig. 2A) sono mirmecofile obbligate. Dopo l'accoppiamento, le femmine iniziano a deporre le uova sulle foglie o sui fiori

– Pubblicato marzo 2019

immaturi della pianta nutrice, secondo la specie. La larva penetra comunque nel tubo fiorale, raggiunge l'ovario, si nutre degli ovuli mutando 3 volte fino a raggiungere il 4° stadio. In seguito la larva pratica un'apertura nella corolla e si lascia cadere fino a terra, appesa ad un filo di seta. A questo punto il bruco deve obbligatoriamente essere trovato da una formica operaia (specie specifica almeno a livello locale, ma sempre del genere *Myrmica*) (Fig. 2B, C). Mentre qualsiasi altra formica raccoglierebbe il bruco per cibarsene, la formica della specie ospite lo raccoglie delicatamente fra le mandibole e lo trasferisce nel formicaio. A questo punto le larve possono svilupparsi attraverso due modalità comportamentali diverse:

1) Nel caso delle specie predatrici (*Maculinea arion*, *M. teleius*) il bruco passa la maggior parte del tempo in una celletta separata, dalla quale esce a tratti per nutrirsi delle larve della formica.
2) In quello delle specie 'cuculo' (o cuckoo: *M. alcon*, *M. rebeli*) il bruco vive assieme alla formica ospite, che continua ad accudirlo e nutrirlo per trofallassi durante tutto il resto dello sviluppo.

Lo sfarfallamento avviene nella successiva primavera-estate. Appena liberatasi dalla crisalide (Fig 2B) la farfalla dovrà velocemente lasciare il formicaio, ora popolato da acerrimi nemici.

Le specie di questo genere sono monofaghe o oligofaghe e depongono sui boccioli fiorali ancora chiusi (Patricelli *et al.,* 2011). Le femmine gravide hanno però un compito più difficile delle altre farfalle monofaghe. Devono infatti trovare delle piante su cui deporre (Fig. 2) che consentano non solo alla prole di svilupparsi nelle prime settimane, ma anche di essere adottata dalle formiche ospiti. Quindi uno dei fattori chiave per garantire il successo riproduttivo e la permanenza di una popolazione di *Maculinea* è rinvenire una pianta nutrice idonea. Le formiche del genere *Myrmica* e hanno un raggio di foraggiamento che non supera i 2 m dal formicaio. Un bruco che si trovi a una distanza maggiore sarà destinato a perire. Nel caso di *M. arion* i cui bruchi si nutrono di *Origanum vulgare*, una nota pianta aromatica, abbiamo dimostrato che:

a) mentre la quantità di timolo emessa dalla pianta rimaneva costante, le piante che avevano fra le radici un nido di *Myrmica* producevano carvacrolo in misura statisticamente molto maggiore. Inoltre: il gene che codifica per l'enzima monoterpene sintasi (coinvolto nella sintesi del timolo e carvacrolo) è sovraespresso in questo caso di 11 volte; mentre i geni specificamente sulla linea del carvacrolo lo sono rispettivamente di 24 volte (CYP71D178/179/182) e 48 volte (CYP71D178) (Fig. 3A);
b) le femmine 'gravide', testate in un tubo a Y per tutte le varie possibilità di scelta, sceglievano in modo statisticamente molto significativo sempre il ramo da cui giungeva il flusso d'aria contenente carvacrolo (Fig. 3B);
c) mentre gli elettroantennogrammi mostrano che i sensilli antennali rispondono in modo scarsissimo ai composti volatili emessi dalle piante che non hanno formiche nelle radici (solo timolo); essi rispondono significativamente ai composti emessi da piante cresciute con formiche (timolo+carvacrolo). Inoltre mostrano maggior risposta al carvacrolo che non al timolo (Fig. 3C).

In conclusione: l'origano secerne carvacrolo, un composto insetticida, come difesa contro le formiche, la cui presenza potrebbe incoraggiare l'insediamento di parassiti (es. afidi). Tuttavia le formiche del genere *Myrmica* sono molto più resistenti alla presenza di carvacrolo di tutte le altre specie di formica presenti in quell'area. Un terzo attore quindi (la farfalla) è capace di sfruttare nel proprio 'interesse' la reazione metabolica dell'origano contro la presenza di un possibile vettore parassitario (Patricelli *et al*., 2015).

Tuttavia: perché la formica operaia non si mangia la larvetta appena la trova, o questa non viene fatta a pezzi appena giunge all'interno del formicaio? Evidentemente la larva di 4° stadio è in grado d'inserirsi nel sistema di comunicazione del suo ospite. Dobbiamo quindi domandarci: come comunicano fra loro le formiche? Sintetizzando molto, si avvalgono di un doppio sistema:

a) un canale chimico rappresentato dagli idrocarburi epicuticolari, un bouquet di sostanze chimiche (odore di colonia) che consente di discriminare fra compagni di nido ed estranei (Singer 1998, Hölldobler e Wilson, 1990, Lenoir *et al.*, 2001);
b) un canale acustico, basato sull'emissioni di stridulazioni che consente l'individuazione della casta dell'emittente, poiché le regine producono stridulazioni diverse da quelle delle operaie per mezzo di un diverso organo stridulatore. Le stridulazioni delle regine generano benevole reazioni d'aiuto da parte delle operaie, rafforzando in tal modo il loro status nella colonia (Barbero *et al.,* 2009; Casacci *et al.,* 2013).

Forzare il codice: in altre parole, affinché il bruco possa essere accettato all'interno della colonia occorre che esso sia in grado di forzare il doppio sistema di comunicazione del suo ospite. Ciò avviene tramite un meccanismo a 2 fasi.

a) *Penetrazione*. In molti casi, i parassiti delle formiche possono invadere liberamente la sfera dell'ospite tramite meccanismi d'insignificanza

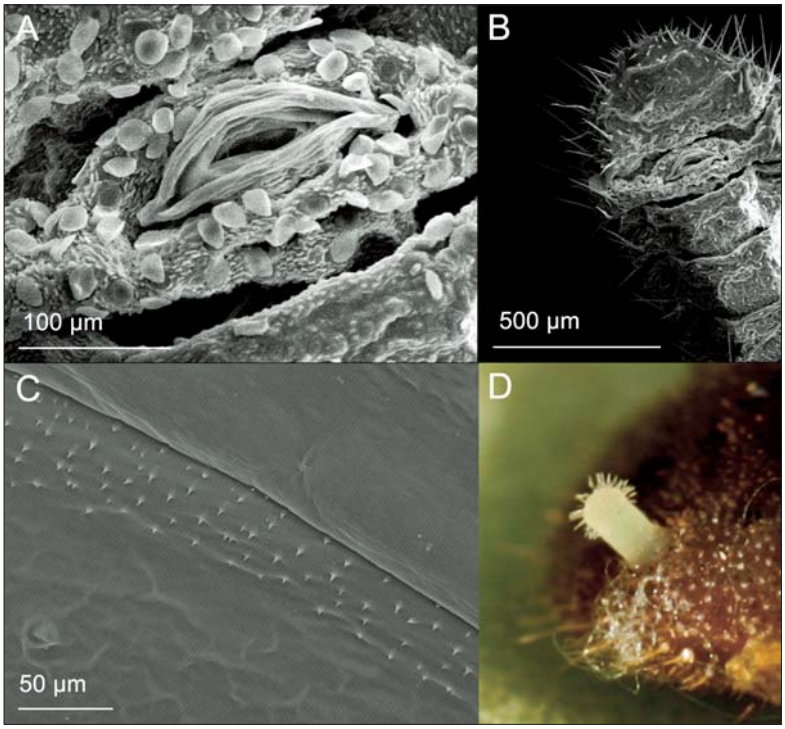



Figura 1 – A, B) Organo dorsale del nettare e organi poro-cupola a diversi ingrandimenti su una larva di 4° stadio di *Maculinea rebeli*; C) struttura deputata alla produzione dei suoni nella pupa di *Maculinea rebeli*; D) dettaglio degli organi tentacolari di una larva di ultimo stadio di *Scolitantides orion* (foto di L. Camerin e M. Gherlenda).

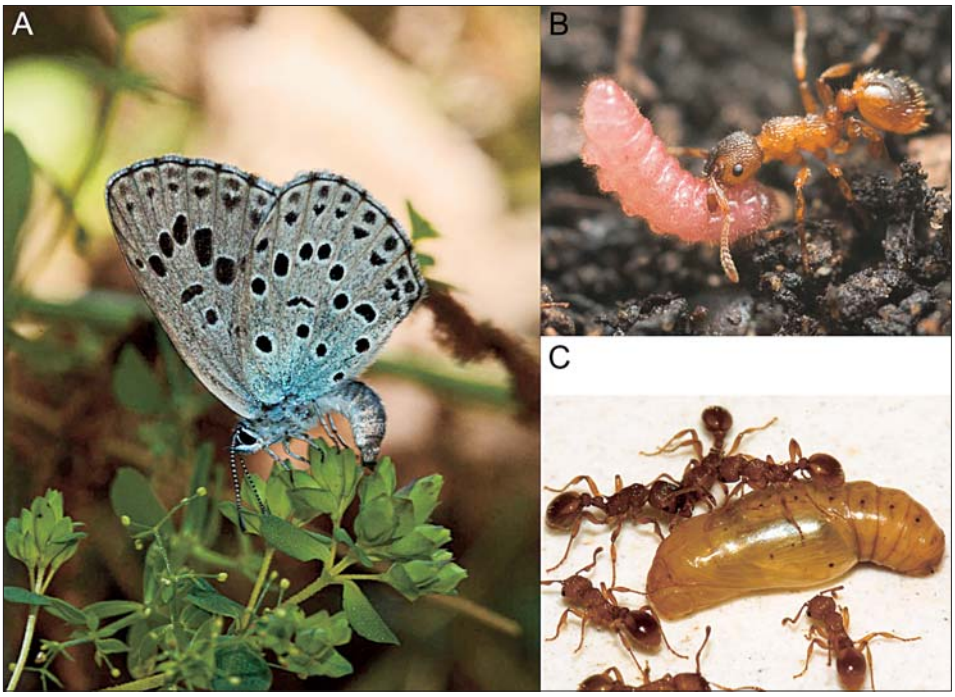



Figura 2 – A) Femmina di *Maculinea arion* in fase di deposizione delle uova su una pianta di *Origanum vulgare* (foto di C. Arillo); B) adozione di larva di 4° stadio di *Maculinea* da un'operaia foraggera del genere *Myrmica* (foto di M. Zaccagno); C) pupa di *Maculinea* accudita da operaie di *Myrmica* in un formicaio artificiale (foto di L. Camerin e M. Gherlenda).

chimica (Lenoir *et al.* 2001). Se ciò può funzionare nel caso di parassiti che s'introducano nei formicai attivamente, questo non può essere il caso per i bruchi delle farfalle, che devono essere 'deliberatamente' raccolti e trasportati dalle formiche, le quali sono 'ingannate' dal bouquet d'idrocarburi presenti sulla loro cuticola (Casacci, 2011).

b) *Integrazione. Il canale chimico*. La somiglianza fra il profilo chimico del bruco e quello delle formiche ospiti tende ad affinarsi col tempo. Questo processo, tuttavia, è particolarmente efficiente nel caso delle 'specie cuculo'. *M. alcon* rapidamente modifica il suo profilo chimico entro le prime 48 ore d'integrazione, raffinandolo poi gradualmente fino alla 4° settimana e raggiungendo una somiglianza col profilo delle formiche pari al 76%. Al contrario il processo è molto meno efficiente nelle specie predatrici. Le larve di *M. teleius* dopo 3 settimane assomigliano alle formiche operaie solo per il 39% (Casacci, 2011).

*Integrazione. Il canale acustico*. È noto da tempo

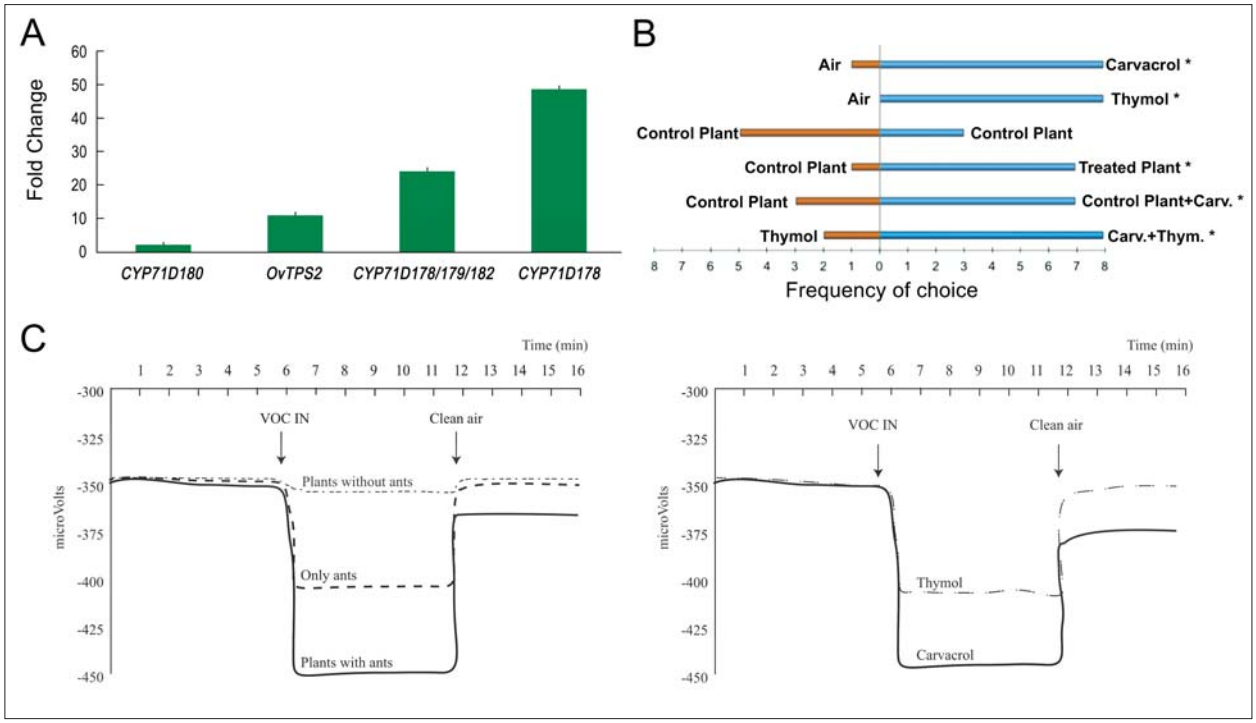



Figura 3 – A) La presenza delle formiche del genere *Myrmica* provoca un'induzione di 10 volte per un gene monoterpene sintasi (OvTPS2) che codifica per una proteina che catalizza la formazione di γ-terpinene, un precursore diretto di timolo e carvacrolo. Grandi aumenti si sono verificati anche nei livelli di trascrizione di tre geni per il citocromo P450 coinvolti nella biosintesi di carvacrolo e timolo: CYP71D180, CYP71D179 / 182 e CYP71D178. B) Scelte olfattometriche delle femmine gravide di *Maculinea arion* sottoposte a diversi trattamenti; C) elettro-antennogrammi delle risposte antennali di *Maculinea arion* a due principali monoterpeni aromatici emessi da *O. vulgare*, agli odori delle piante coltivate con *Myrmica* e all'odore di colonie di formiche di *Myrmica scabrinodis* (modificati da Patricelli *et al.*, 2015).

che sia le larve sia le pupe di *Maculinea* emettono stridulazioni (DE VRIES, 1991). Studi più recenti hanno dimostrato che le emissioni sonore sono specie-specifiche e che mentre i suoni prodotti dalle larve e dalle pupe non differiscono statisticamente fra loro, entrambi sono più simili a quelli delle formiche regine che a quelli delle operaie, e che in tal modo i bruchi assumono il rango più elevato all'interno della colonia (BARBERO *et al.,* 2009). Se il nido viene disturbato, infatti, le regine e le larve di farfalla vengono portate in salvo per prime (CASACCI *et al.,* 2013). Anche le stridulazioni si affinano col tempo: quelle emesse in pre-adozione sono diverse da quelle in post-adozione, ma mentre quelle delle specie cuculo (*M. alcon*) divengono più simili a quelle delle regine (dal 15% al 75%), quelle emesse dalle specie predatrici (*M. teleius*) divengono più simili a quelle delle operaie (dal 18% al 30%). Esperimenti di playback hanno dimostrato che le prime riscuotono anche maggior attenzione dalle operaie (SALA *et al*., 2014).

Come possono aver avuto origine tutti questi adattamenti?

a) Per quanto riguarda il canale chimico (idrocarburi cuticolari) le osservazioni effettuate anche in altri mirmecofili suggeriscono che il mimetismo abbia avuto origine a partire da processi di *chemical insignificance* (in cui gli individui sono "chimicamente invisibili", ovvero le quantità di idrocarburi cuticolari sono estremamente basse e non rilevabili dalle formiche).
b) Riguardo le possibili origini del canale acustico, abbiamo analizzato le stridulazioni di 4 specie non mirmecofile (*Cacyreus marshalli*, *Lycaena helle*, *L. dispar*, *L. phlaeas*) e di 5 stabilmente mirmecofile (*Polyommatus icarus*, *P. bellargus*, *Scolitantides orion*, *Plebejus trappi*, *P. argus* quest'ultima quasi obbligatoriamente tale), confrontandole con quelle le specie di *Maculinea alcon.* Tutte le specie hanno dimostrato di emettere suoni specie-specifici, ma i loro parametri acustici possono essere disposti lungo un gradiente di mirmecofilia crescente (RIVA *et al.,* 2017). Nelle specie non mirmecofile (e.g. *Lycaena* spp.), le emissioni acustiche hanno probabilmente effetto antipredatorio (BURA *et al.*, 2009), mentre in altri casi sono segnali territoriali verso i conspecifici (YACK *et al.*, 2001). "Similarities in sound profiles neatly match the spectrum of observed strengths and specificities in myrmecophily across the study species, much more closely than does phylogeny" (SCHÖNROGGE *et al.,* 2017). Possiamo quindi ipotizzare che la funzione mimetica delle stridulazioni abbia avuto origine da un fenomeno di *exaptation*.

BIBLIOGRAFIA CITATA


Barbero F., Thomas J.A., Bonelli S., Balletto E., Schönrogge K., 2009 – *Queen ants make distinctive sounds that are mimicked by a butterfly social parasite.* - Science, 323: 782-785.

Bura V.L., Fleming A.J., Yack J.E., 2009 – *What's the buzz? Ultrasonic and sonic warning signals in caterpillars of the great peacock moth* (Saturnia pyri). - Naturwissensch., 96 (6):713-718.

Casacci L.P., Thomas J.A., Sala M., Treanor D., Bonelli S., Balletto E., Schönrogge K., –2013. *Ant pupae employ acoustics to communicate social status in their colony's hierarchy*. - Curr. Biol., 23: 323-327.

Castaño-Meneses G., Palacios-Vargas J. G., Delabie J. H., Santos R. D. J., Mariano C. S., – 2014. *Springtails (Collembola) from nests of Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae) ants in Brazilian cacao plantations.* - Fla. Entomol., 97 (4): 1862-1864.

Casacci L.P., 2011 – *Eco-ethological and evolutionary processes in the* Maculinea-Myrmica *system* Tesi di Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica e Conservazione della Biodiversità Università degli Studi di Torino, 125 pp.

Cushing P.E., 1997 – *Myrmecomorphy and myrmecophily in spiders: A Review.* - Fla. Entomol., 80 (2): 165-193.

Dekoninck W., Lock K., Janssens F., 2007 – *Acceptance of two native myrmecophilous species,* Platyarthrus hoffmannseggii *(Isopoda: Oniscidea) and* Cyphoderus albinus *(Collembola: Cyphoderidae) by the introduced invasive garden ant* Lasius neglectus *(Hymenoptera: Formicidae) in Belgium.* - Eur. J. Entomol., 104 (1): 159.

DeVries P.J., 1991 – *Call Production by Myrmecophilous Riodinid and Lycaenid Butterfly Caterpillars (Lepidoptera): Morphological, Acoustical, Functional, and Evolutionary Patterns*. - Amer. Mus. Nov., 3025: 1-23.

Komatsu T., & Maruyama M., 2016 – *Taxonomic recovery of the ant cricket* Myrmecophilus albicinctus *from* M. americanus *(Orthoptera, Myrmecophilidae)*. - ZooKeys, 589: 97.

Elgar M.A., Allan R.A., 2006 – *Colony specific mimicry of the weaver ant* Oecophylla smaragdina by the myrmecophilous salticid spider Cosmophasis bitaeniata. - J. Ethol., 24: 239-246.

Fiedler K., 1991 – *Systematic, evolutionary, and ecological implications of myrmecophily within the Lycaenidae (Insecta: Lepidoptera: Papilionoidea)*. - Bonn. Zool. Mon., 31: 1-210.

Geiselhardt S.F, Peschke K., Nagel P., 2007 – *Review of myrmecophily in ant nest beetles (Coleoptera: Carabidae:* Paussinae*): linking early observations with recent findings*. - Naturwissenschaften, 94: 871-894.

Glasier J.R.N., Poore A. G. B., Eldridge D. J., 2018 – *Do mutualistic associations have broader host ranges than neutral or antagonistic associations? A test using myrmecophiles as model organisms*. - Insect. Soc., 65 (4): 639-648.

Hinton H.E., 1949 – *Myrmecophilous Lycaenidae and other Lepidoptera-a summary*. - Proc. Soc. Lond. Entomol. - Nat. Hist. Soc., 50: 111-175.

Hölldobler B., 1969 – *Host Finding by Odor in the Myrmecophilic Beetle* Atemeles pubicollis *Bris. (Staphylinidae)*. - Science, 166 (3906): 757-758.

Hölldobler B., Wilson E.O., 1990 – *The Ants*. Springer Verlag, Berlin, 746 pp.

Howard R.W., McDaniel C.A., Blomquist G.J., 1980 – *Chemical mimicry as an integrating mechanism: cuticular hydrocarbons of a termitophile and its host*. - Science, 210:431-433.

Lenoir A., D'Ettorre P., Errard C., Hefetz A., 2001 – *Chemical ecology and social parasitism in ants*. - Annu. Rev. Entomol., 46: 573-599.

Parmentier T., Dekoninck W., Wenseleers T. 2014 – *A highly diverse microcosm in a hostile world: a review on the associates of red wood ants (*Formica rufa *group)*. - Insect. Soc., 61 (3): 229-237.

Patricelli D., Barbero F., Occhipinti A., Bertea C.M., Bonelli S., Casacci L.P., Zebelo S.A., Crocoll C., Gershenzon J., Maffei M.E., Thomas J.A., Balletto E., 2015 – *Plant defences against ants provide a pathway to social parasitism in butterflies*. - Proc. R. Soc. (B), 282: 20151111.

Patricelli D., Barbero F., La Morgia V., Casacci L. P., Witek M., Balletto E., Bonelli S., 2011 – *To lay or not to lay: oviposition of* Maculinea arion *in relation to* Myrmica *ant presence and host plant phenology.* - Anim. Behav., 82 (4): 791-799.

Pierce N.E., Braby M.F., Heath A., Lohman D.J., Mathew J., Rand D.B., Travassos M.A., 2002 – *The ecology and evolution of ant association in the Lycaenidae (Lepidoptera)*. - Annu. Rev. Entomol., 47: 733-771.

Riva F., Barbero F., Bonelli S., Balletto E., Casacci L.P., 2017 – *The acoustic repertoire of lycaenid butterfly larvae*. - Bioacoustics, 26 (1):77-90.

Schönrogge K., Barbero F., Casacci L.P., Settele J., Thomas J.A., 2017 – *Acoustic communication within ant societies and its mimicry by mutualistic and socially parasitic myrmecophiles*. - Anim. Behav., 134: 249-256.

Sala M., Casacci L.P., Balletto E., Bonelli S., Barbero F., 2014 – *Variation in butterfly larval acoustics as a strategy to infiltrate and exploit host ant colony resources*. - PLoS One, 9 (4): e49341.

Singer T.L., 1998 – *Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects*. - Amer. Zool., 38 (2): 394-405.

Tauber C.A., Winterton S.L., 2014 – *Third instar of the myrmecophilous* Italochrysa insignis *(Walker) from Australia (Neuroptera: Chrysopidae: Belonopterygini)*. - Zootaxa, 3811(1): 95-106.

Yack J, Smith M, Weatherhead P. 2001 – *Caterpillar talk: acoustically mediated territoriality in larval Lepidoptera*. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 98 (20): 11371–11375.

Way M.J., 1963 - *Mutualism between ants and honeydew-producing Homoptera.* - Annu. Rev. Entomol., 8 (1): 307-344.

68 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 69-74*

# IL *NEMICO CONDIVISO* E L'ENTOMOLOGIA APPLICATA: ALCUNE CHIAVI DI LETTURA

ROBERTO A. PANTALEONI[a] - MAURO RUSTICI[b]

[a] *Sezione di Entomologia, Dipartimento di Agraria, Università degli Studi, via Enrico De Nicola, 07100 Sassari SS, Italia*;
email: pantaleo@uniss.it
[b] *Dipartimento di Chimica e Farmacia, Università degli Studi, Via Vienna 2, 07100 Sassari SS, Italia.*
Lettura tenuta nella Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 novembre 2018.

*The* shared enemy *and the applied entomology: some perspectives*

The community module of the "shared enemy", based on the essential ideas of enemy-free space and apparent competition, is not so familiar among the applied ecologists and entomologists, despite that is one of the most common indirect interactions in the ecological community.

Here, a brief theoretical sketch of the shared enemy is provided, even with the help of some study cases. Finally, some biocontrol tools for the pest management are discussed under the perspective of the shared enemy.

KEY WORDS: apparent competition, community modules, biological control.

## INTRODUZIONE

Anche se non in competizione diretta tra di loro, le popolazioni di due diverse specie si influenzano reciprocamente quando condividono uno stesso nemico, sia questo un predatore, un parassitoide, un parassita o un pascolatore. Questa interazione indiretta, chiamata "del nemico condiviso", è estremamente diffusa in natura e rappresenta la base per la progettazione e l'applicazione di alcune metodologie di controllo biologico classico e conservativo.

Dopo aver fornito un breve inquadramento teorico del nemico condiviso, anche con l'illustrazione di qualche esempio tratto dalla letteratura, si tenterà di usarne il concetto come "chiave" per interpretare alcuni aspetti applicativi del controllo biologico.

## INTERAZIONI ECOLOGICHE DIRETTE ED INDIRETTE

I rapporti intercorrenti tra i componenti di una biocenosi sono estremamente diversificati, intricati, e soggetti inoltre a notevoli dinamiche spazio-temporali. In particolare, le interazioni tra due specie possono essere dirette ed indirette. Le prime, quelle dirette, avvengono senza alcuna intermediazione di una terza specie. Sono generalmente identificate dagli effetti positivi (+), negativi (–), o indifferenti (0) registrati dai due organismi interagenti. Su questa base sono grossolanamente suddivise nelle seguenti categorie: (–/–) competizione; (0/–) amensalismo; (0/0) neutralismo; (0/+) commensalismo; (+/+) mutualismo; (+/–) predazione. La predazione va qui intesa in senso molto largo e deve ricomprendere ogni interazione nella quale uno dei due soggetti si nutre a spese dell'altro (inclusi quindi predazione in senso stretto, parassitismo, parassitoidismo, pascolamento) o comunque, ancora più genericamente, trae vantaggio dall'altro danneggiandolo.

Le interazioni indirette avvengono invece con l'intermediazione di una terza specie. Si prenda ad esempio la classica catena tritrofica pianta/fitofago/entomofago. Ovviamente, l'azione dell'entomofago sul fitofago favorisce indirettamente (nel senso qui definito) la pianta (MOON *et al.*, 2010).

## MODULI ECOLOGICI

Ogni rappresentazione grafica anche dei soli rapporti di predazione intercorrenti tra i componenti di una comunità ecologica assume, per usare la definizione di HOLT & HOCHBERG (2001), l'aspetto aggrovigliato di un piatto di spaghetti. Se tentassimo di, e riuscissimo a, illustrare addirittura tutte le interazioni dirette interne ad una biocenosi otterremo un risultato assolutamente inesplicabile. Non parliamo neppure di affrontare le innumerevoli interazioni indirette.

In realtà, mentre cominciamo a comprendere le dinamiche di popolazione in una o due specie interagenti, siamo ben lontani dal riuscire ad interpretare i meccanismi di ciò che avviene a livello delle comunità ecologiche. La loro stessa complessità rappresenta l'ostacolo principale al raggiungimento di questo obiettivo. Per questa ragione HOLT (1997) ha proposto l'idea di lavorare sui cosiddetti "moduli ecologici"

– Pubblicato marzo 2019

[community modules], vale a dire su "strutture" di poche specie (in generale 3-6) che siano ricorrenti in natura e che presentino meccanismi d'interazione sufficientemente definiti. I moduli possono essere considerati come gli elementi costitutivi delle comunità e la loro analisi può consentire di isolare determinati processi chiave che ne influenzano le dinamiche. Questi moduli inoltre possono essere costruiti come utili estensioni multi-specie di alcune basilari interazioni a coppie, come per esempio la dinamica ospite/parassitoide, con l'inserimento di interazioni indirette.

## Il *nemico condiviso*

Il modulo del nemico condiviso [shared natural enemy] è costituito da due vittime che condividono un limitatore naturale. Evidentemente la dinamica di una qualunque delle due specie vittima influenzerà la dinamica del consumatore e per questa via, indirettamente, la dinamica dell'altra vittima. Data la rarità di specie strettamente monofaghe e la conseguente abbondanza di organismi che si nutrono a spese di almeno due vittime, il modulo del nemico condiviso è estremamente diffuso in natura (Jeffries & Lawton, 1984; Holt & Lawton, 1994), dalla zona intercotidale marina (Menge, 1995) alle foreste tropicali centroamericane (Morris *et al.*, 2004).

Questo modulo può agire a qualunque livello della catena alimentare. Le due vittime possono così essere due piante consumate dalla stessa specie di fitofago, due prede aggredite da un predatore, due vittime che condividono un parassitoide od anche un vero parassita, ma anche due parassitoidi attaccati da un iperparassitoide, due predatori vittime di un predatore di secondo livello, etc. etc. Il meccanismo può essere allargato, senza eccessivo sforzo concettuale, fino a sostituire una delle vittime (se non entrambe) con una risorsa alimentare generica.

La prima enunciazione, anche sotto forma di modello matematico, del concetto di nemico condiviso risale ad oltre sessant'anni fa (Williamson, 1957), ma è stata esplicitamente definita una ventina di anni dopo da Holt (1977). I primi modelli mostravano come le due vittime si influenzassero negativamente l'un l'altra, cioè come esse risultassero "apparentemente" in competizione non per una "classica" risorsa limitante (cibo, rifugio) ma per uno spazio libero da nemici (enemy-free space). Proprio per questo il modulo ecologico del nemico condiviso è stato frequentemente chiamato della "competizione apparente". Si è ben presto visto però che le interazioni indirette tra le due vittime potevano anche essere di segno diverso dal (–/–) della competizione. L'amensalismo (0/–) risulta frequente, forse addirittura più frequente, con una delle due vittime che pur fornendo al nemico utili risorse non ne è in pratica influenzata (Chaneton & Bonsall, 2000). Più raramente è stato possibile osservare, od ottenere come risultato di modelli matematici, anche casi di commensalismo (0/+), mutualismo (+/+) e "predazione" (+/–) apparenti (Abrams *et al.*, 1998; Heimpel *et al.*, 2003).

## Alcuni esempi dalla letteratura

### *Competizione apparente tra parassitoidi per mezzo di un iperparassitoide*

Nelle Isole Åland, arcipelago all'entrata del golfo di Botnia, situato tra la Finlandia, cui appartiene, e la Svezia, il Lepidottero Ninfalide *Melitaea cinxia* ha come unico parassitoide larvale l'Imenottero Braconide *Cotesia melitearum*, che a sua volta è attaccato dall'iperparassitoide generalista *Gelis agilis*. Bozzoli di un secondo parassitoide, *Cotesia glomerata*, ottenuti in laboratorio da un allevamento di *Pieris brassicae*, sono stati esposti in aree ove erano presenti *C. melitearum* e *G. agilis*. Dopo una sola generazione la popolazione di *C. melitearum* è drasticamente diminuita, così come previsto dalla teoria. La distribuzione di bozzoli di *C. glomerata* in primavera aveva evidentemente fatto aumentare la popolazione di *G. agilis*, che nella generazione successiva si è riversato su *C. melitearum* [van Nouhuys & Hanski, 2000].

### *Amensalismo apparente tra fitofagi per mezzo di un parassitoide*

Ancora nelle Isole Åland, utilizzando un esperimento in campo, è stata testata l'ipotesi che i due Lepidotteri Ninfalidi congenerici *Melitaea cinxia* e *M. athalia* interagissero indirettamente attraverso il parassitoide pupale condiviso *Pteromalus apum*. I risultati non hanno però mostrato una competizione apparente simmetrica con un tasso di parassitoidismo simile in entrambe le specie. Infatti, mentre la popolazione di *M. cinxia* veniva limitata in presenza del secondo ospite, il tasso di attacco su *M. athalia* non differiva in presenza o in assenza di *M. cinxia*. La ragione è stata individuata nel fatto che le pupe (stadio attaccato dal parassitoide) di *M. cinxia* sono protette da cortine di seta tessute dalle larve mature, mentre quelle di *M. athalia* sono esposte. I parassitoidi, di conseguenza, ove i due ospiti sono presenti insieme, attaccano maggiormente quello più accessibile. Il fenomeno è dimostrato sul breve termine, mentre le conseguenze a lungo termine restano da definire [van Nouhuys & Kraft, 2012].

### *Amensalismo apparente tra erbivori vertebrati per mezzo di un predatore inva*sivo

Sui Monti Grampiani in Scozia, l'arvicola acquatica, *Arvicola amphibius*, è specie nativa che colonizza la

vegetazione "alta" lungo i corsi d'acqua. Il coniglio, *Oryctolagus cuniculus*, invece, introdotto durante il XVIII secolo, colonizza praterie asciutte dove scava le proprie profonde tane. Le due specie quindi non entrano in competizione alimentare e l'arrivo del coniglio non provocò alcuna diminuzione nelle popolazioni di arvicola. Con l'introduzione accidentale del visone americano, *Neovison vison*, una trentina di anni fa, la situazione è drammaticamente cambiata e l'arvicola si è localmente estinta ovunque fossero contemporaneamente presenti conigli. Il motivo sta nel fatto che i visoni predano i conigli, ma questi, per il loro tasso di natalità e la possibilità di rifugiarsi in tane complesse, non subiscono evidenti diminuzioni di popolazione. In altre parole, le popolazioni di visoni vengono sostenute da una specie che non possono controllare, il coniglio, ed impongono una mortalità molto pesante a una specie più vulnerabile, l'arvicola. Anche se i conigli non competono direttamente con le arvicole, hanno un forte impatto indiretto su di loro. Le arvicole riescono infatti a sopravvivere solo nelle aree in cui il visone non è "sostenuto" dal coniglio [Oliver *et al.*, 2009].

*Commensalismo apparente tra predatori per mezzo di un parassitoide*

I tassi di attacco da parte dell'Imenottero Braconide *Dinocampus coccinellae* sugli ospiti *Coleomegilla maculata* e *Harmonia axyridis*, entrambi Coleotteri Coccinellidi, sono stati studiati in laboratorio e in campo in Nord America, ove la prima vittima è nativa, la seconda introdotta. La specie invasiva, pur venendo attaccata nella stessa proporzione della nativa, è risultata poco idonea allo sviluppo del parassitoide. Molte delle uova deposte non producevano prole, né danneggiavano l'ospite. Introducendo questi dati in un semplice modello del nemico condiviso, utilizzando i parametri ricavati dalle sperimentazioni, si è ottenuta l'indicazione che la presenza della specie invasiva favorisce in questo caso la specie nativa grazie allo "spreco" di uova del parassitoide sull'ospite invasivo "inadatto" [Hoogendoorn & Heimpel, 2002].

*Competizione apparente di una "risorsa generica" sulla preda di un onnivoro*

In Martinica, la formica *Solenopsis geminata* è nota essere un efficace predatore delle uova del punteruolo del banano *Cosmopolites sordidus* (Coleottero Curculionide). Il numero di formiche è risultato superiore in bananeti inerbiti rispetto a piantagioni di banane con suolo nudo (sistema tradizionale) ed il tasso di predazione è cresciuto proporzionalmente. Usando l'analisi di isotopi stabili, si è potuto dimostrare che la formica ha usato risorse provenienti dalle piante C4 dell'inerbimento (il banano è pianta C3). L'aggiunta di una nuova risorsa primaria nel sistema ha cambiato l'origine del carbonio consumato dai predatori e aumentato le loro densità. L'aumento dell'abbondanza delle formiche ha portato ad un aumento della predazione delle uova del fitofago [Mollot *et al.*, 2012].

## Applicazioni nel controllo biologico

Come rilevavano Holt & Lawton (1994), uno degli aspetti più sconcertanti nell'interpretazione e studio del modulo del nemico condiviso è la ripetuta riscoperta delle sue principali conseguenze ecologiche ed evolutive da parte di numerosi autori, ognuno apparentemente ignaro dei precedenti lavori. Non è chiaro il motivo per cui questa interazione ecologica, così comune in natura, sia in generale così trascurata. Eppure le idee essenziali dello spazio libero dal nemico e della competizione apparente non sono nuove. Già trentacinque anni fa Jeffries & Lawton (1984) furono in grado di elencare 20 articoli che trattavano in termini generali e concettuali lo spazio libero dal nemico, elencando inoltre 81 articoli che fornivano esempi di conseguenze ecologiche ed evolutive, tratti dalla letteratura marina, d'acqua dolce, terrestre e paleontologica, e includendo organismi che andavano dai microbi ai mammiferi e dal fitoplancton ai pesci. Gli entomologi da soli sembravano essersi imbattuti autonomamente in idee essenziali almeno 20 volte (Lawton, 1986). Connell (1990) e Reader (1992), infine, hanno evidenziato le prove della competizione apparente tra piante tramite erbivori condivisi quasi trent'anni fa. Nonostante la situazione sia molto migliorata negli ultimi decenni, col riconoscimento dell'importanza delle vittime alternative nei processi di dinamica delle popolazioni, rimane un senso di scollegamento tra gli studi realizzati e le implicazioni più generali. Non essendo inserite in un quadro concettuale di riferimento, molte ricerche contribuiscono meno alla sperimentazione e allo sviluppo della teoria di quanto si possa desiderare.

Alcune pratiche, anche molto diffuse, di controllo biologico degli organismi dannosi in agricoltura possono facilmente essere "interpretate" col meccanismo del nemico condiviso. Una loro interpretazione teorica potrebbe facilitarne lo sviluppo ed il perfezionamento, portando ad una feconda dialettica tra elaborazioni modellistiche ed evidenze di campo. Qui verranno considerati solo alcuni aspetti del controllo biologico classico (valutazione degli effetti indesiderati) e del controllo biologico conservativo (habitat management, colture trappola).

*Controllo biologico classico*

Nonostante gli indubbi successi, ed i molti vantaggi del controllo biologico classico molti ecologi hanno espresso una forte preoccupazione rispetto alla pratica di limitare gli organismi invasivi esotici introducendo

nemici esotici provenienti dalla stessa area geografica (Howarth, 1983, 1991; Simberloff & Stiling, 1996; e molti altri successivi). Dopo un iniziale "crescendo" la litania degli effetti indesiderati, per usare le espressioni di qualcuno (Holt & Hochberg, 2001; Parry, 2008), fu mitigata dal dibattito scientifico. Oggi è opinione comune che sia necessario regolamentare l'introduzione di agenti di controllo esotici per ridurre i rischi dovuti al loro rilascio, ma senza rinunciare alla possibilità di una gestione permanente delle specie bersaglio su ampie aree, evitando il ricorso ai pesticidi (ed i loro effetti indesiderati), sostenendo costi non ricorrenti, e, per i programmi di successo, ottenendo un incredibilmente vantaggioso rapporto costi/benefici (Messing & Wright, 2006; Parry, 2008; De Clercq *et al.*, 2011; Hajek *et al.*, 2015).

Proprio con l'obiettivo di realizzare interventi di controllo biologico classico con effetti indesiderati il più ridotti possibile si è tentato di rendere predicibili alcune conseguenze degli interventi stessi attraverso una modellizzazione del modulo ecologico del nemico condiviso (Holt & Hochberg, 2001; Harmon & Andow, 2004). Sono state esplorate così, oltre alle conseguenze delle interazioni dirette tra limitatore di nuova introduzione e vittime native preesistenti, le conseguenze delle interazioni indirette tra vittima esotica invasiva e vittime native. Due delle cinque convincenti conclusioni fornite da Holt & Hochberg (2001) riguardano conseguenze di interazioni indirette. Non viene però mai preso in considerazione il fatto, per altro incontrovertibile, che, ben prima dell'eventuale introduzione di un limitatore esotico, l'organismo esotico invasivo può avere forti interazioni indirette con gli organismi nativi attraverso la presenza di nemici nativi, più o meno generalisti, che siano in grado di sfruttarlo come "nuova" risorsa e che fungano da nemico condiviso per le vittime native (Fig. 1).

Quando poi la vittima esotica non dovesse essere particolarmente influenzata dall'azione dei nemici nativi (amensalismo apparente), le vittime native rischiano l'estinzione, almeno su scala locale (Holt & Hochberg, 2001; Budroni *et al.*, 2018). Se in più gli ospiti esotico e nativo hanno un diverso voltinismo, le popolazioni dei membri nativi del modulo, che si trovano di fronte ad una disponibilità "pulsante" dell'ospite esotico, fluttuano fortemente e, in determinate condizioni, può verificarsi un'estinzione, questa volta del parassitoide. In altre parole il semplice arrivo di un organismo esotico può influenzare la comunità nativa in modo drammatico, l'introduzione volontaria di un limitatore naturale esotico andrebbe valutata in questi casi anche per il potenziale effetto riequilibrante che essa potrebbe avere sull'intera comunità ospite.

*Controllo biologico conservativo*

Molte pratiche di gestione ambientale, in senso largo, si basano sui meccanismi ecologici del nemico condiviso. Uno dei principali obiettivi di *beetle banks*, *flower strips*, *cover crop* ed in generale di tutte le cosiddette infrastrutture ecologiche è rendere disponibili fonti di cibo per gli insetti utili, siano queste rappresentate da nettare e polline o da prede ed ospiti alternativi (Landis *et al.*, 2000; Norris & Kogan, 2005; Gurr *et al.*, 2017). Si tratta, in altre parole, dell'attivazione di un amensalismo apparente che favorisce i nemici naturali, grazie alla risorsa alternativa, a danno dei fitofagi (Fig. 2).

Anche le tecniche delle colture trappola richiamano, su un livello della catena alimentare più basale, il modulo del nemico condiviso, in particolare quando queste sono utilizzate come *sink* o *dead-end* (commensalismo apparente) (Hokkanen, 1991; Shelton

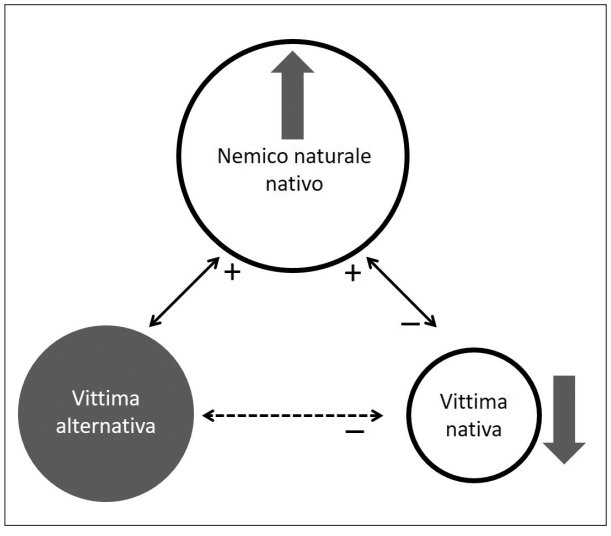



Fig. 1 – Modulo ecologico del nemico condiviso, nel caso di amensalismo apparente tra un organismo invasivo esotico (vittima alternativa) ed un sistema nativo nemico/vittima.

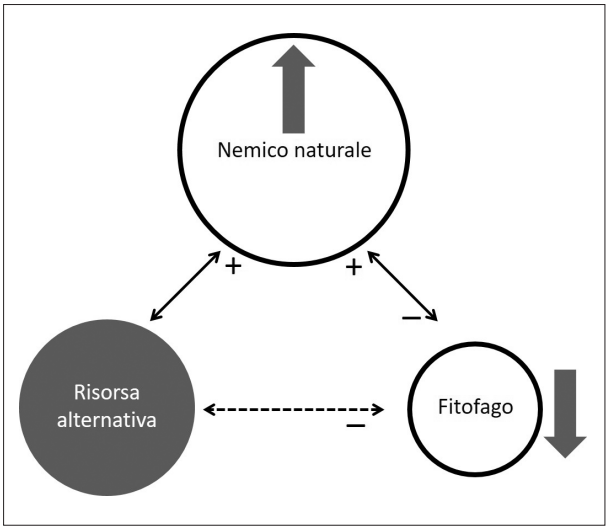



Fig. 2 – Modulo ecologico del nemico condiviso, nel caso di interventi di gestione ambientale in cui una risorsa alternativa viene inserita nel sistema per favorire un nemico naturale a scapito di un fitofago.

& BADENES-PEREZ, 2006). In questo caso si favorisce un commensalismo apparente tra coltura trappola (o altro "attrattore", anche artificiale) e coltura principale, con il fitofago che rappresenta il nemico condiviso (Fig. 3).

In entrambi i casi è però necessario distinguere tra gli effetti delle interazioni a breve e quelli a medio-lungo termine (Fig. 4). Una coltura trappola che non funga da *sink* può essere comunque efficace nella protezione di una coltura "produttiva" se la coltura trappola dovrà rimanere "attiva" solo per un breve periodo, quando l'entrata nel sistema della nuova risorsa distoglie gli attacchi del nemico da quella focale. Se invece rimanesse nel sistema più a lungo gli effetti sulla coltura produttiva sarebbero negativi in quanto la popolazione del nemico verrebbe incrementata su scala territoriale. Allo stesso modo, nel caso della gestione ambientale, una risorsa alimentare introdotta nell'agroecosistema potrebbe mostrare nel breve periodo un effetto negativo sui nemici, distogliendoli dalle prede focali. In altre parole l'eterogeneità temporale della presenza delle varie popolazioni che fanno parte del modulo è essenziale per definirne correttamente gli effetti.

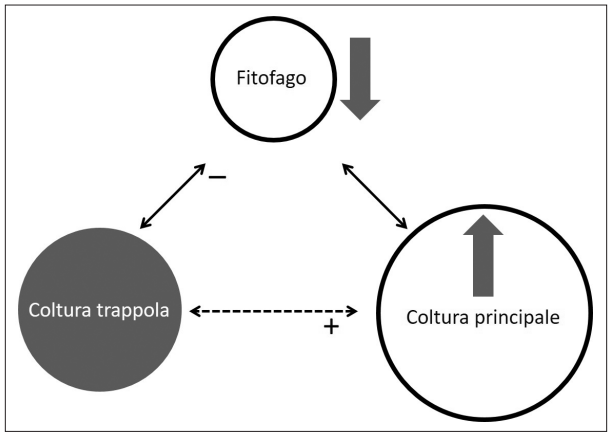



Fig. 3 – Modulo ecologico del nemico condiviso, nel caso di colture trappola che, fungendo da *sink* (o *dead-end*) per il fitofago da combattere, attivano un sistema di commensalismo apparente favorendo la coltura principale.

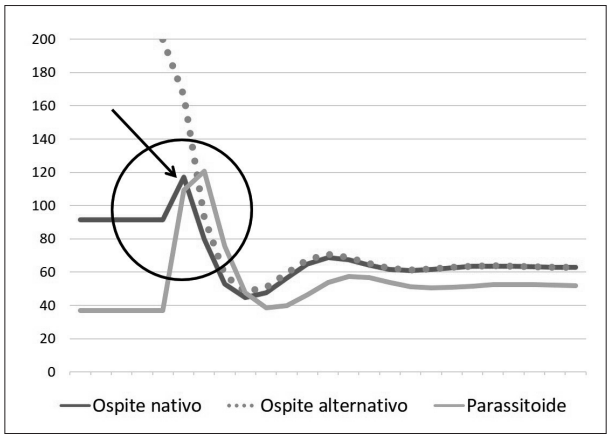



Fig. 4 – In un sistema "nativo" ospite/parassitoide viene introdotto, con un livello di popolazione elevato, un ospite alternativo che non entra in diretta concorrenza per le risorse col primo ospite. Senza ospite alternativo, le due popolazioni preesistenti si trovavano in equilibrio. All'arrivo dell'ospite alternativo entrambe le specie native mostrano un aumento di popolazione; infatti il parassitoide può accedere a una nuova risorsa ed indirizza una parte dei suoi attacchi verso questa diminuendo la pressione sull'ospite nativo. Tuttavia, nel tempo le popolazioni si stabilizzano su nuovi equilibri, con il parassitoide che presenta una popolazione leggermente più alta dell'iniziale, l'ospite nativo che diminuisce e l'ospite alternativo che, avendo ricevuto nella simulazione gli stessi valori parametrici del nativo, si porta al medesimo livello di questo. [Per questa illustrazione è stato utilizzato il modello ospite/parassitoide a generazioni discrete di MAY *et al*. (1981) con funzione densità dipendente di RICKER (1954) e funzione d'incontro di GETZ & MILLS (1996). L'estensione del sistema con l'inserimento del secondo ospite (nemico condiviso) è tratta da HASSEL (2000: 116), mentre i parametri adottati sono quelli impiegati in BUDRONI *et al.* (2018)].

## CONCLUSIONI

Gli entomologi agrari sono culturalmente e tradizionalmente abituati a focalizzarsi sul modulo ecologico lineare "coltura agraria/organismo dannoso/organismo utile" e sulla conseguente interazione indiretta della "cascata trofica" che intercorre tra coltura ed organismo utile. Ciò è ampiamente giustificato dai processi produttivi messi in atto soprattutto nell'agricoltura industriale, ma è ampiamente insufficiente non appena si tenti di gestire gli agroecosistemi con processi che richiedano minor input energetici attraverso una modulazione degli equilibri biologici volta a prevenire "strutturalmente" i danni alle produzioni. Prendere in considerazione le interazioni ecologiche indirette di tipo ramificato, anziché lineare, come quella del nemico condiviso, è un primo passo lungo una strada, quella dell'agricoltura a basso input energetico, impervia, in parte ancora sconosciuta che sarà percorribile solo grazie a conoscenze sofisticate ed approfondite degli agroecosistemi.

## RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro riporta i risultati dei progetti COSME-SAGRO (L. 7/2007) [cod. 25114] e SDULCIS (CIPE 31/2015) [cod. 821008], entrambi finanziati dalla Regione Autonoma della Sardegna.

## BIBLIOGRAFIA

ABRAMS P.A., HOLT R.D., ROTH J.D., 1998 – *Apparent competition or apparent mutualism? Shared predation when populations cycle.* - Ecology, 79: 201-212.

BUDRONI M.A., LORU L., PANTALEONI R.A., RUSTICI M., 2018. – *Effects of an asynchronous alien host on a native host-parasitoid system.* - Ecol. Complex., 33: 84-92.

CHANETON E.J., BONSALL M.B., 2000 – *Enemy-mediated apparent competition: empirical patterns and the evidence.* - Oikos, 88: 380-394.

CONNELL J.H., 1990 – *Apparent versus "real" competition*

*in plants.* In: Perspectives on Plant Competition, Grace J.B. & Tilman D. Ed., Academic Press, New York, pp. 445-474.

De Clercq P., Mason P.G., Babendreier D., 2011 – *Benefits and risks of exotic biological control agents.* - BioControl, 56: 681-698.

Getz W.M., Mills N.J., 1996 – *Host-parasitoid coexistence and egg-limited encounter rates.* - Am. Nat., 148: 333-347.

Gurr G.M., Wratten S.D., Landis D.A., You M., 2017 – *Habitat management to suppress pest populations: progress and prospects.* - Annu. Rev. Entomol., 62: 91-109.

Hajek A.E., Hurley B.P., Kenis M., Garnas J.R., Bush S.J., Wingfield M.J., van Lenteren J.C., Cock M.J., 2016 – *Exotic biological control agents: A solution or contribution to arthropod invasions?* - Biol. Invasions, 18: 953-969.

Harmon J., Andow D.A., 2004 – *Indirect effects between shared prey: Predictions for biological control.* - BioControl, 49: 605-626.

Hassell M., 2000 – *The Spatial and Temporal Dynamics of Host-Parasitoid Interactions.* Oxford University Press, VI+200 pp.

Heimpel G.E., Neuhauser C., Hoogendoorn M., 2003 – *Effects of parasitoid fecundity and host resistance on indirect interactions among hosts sharing a parasitoid.* - Ecol. Lett., 6: 556-566.

Hokkanen H.M., 1991 – *Trap cropping in pest management.* - Annu. Rev. Entomol., 36: 119-138.

Holt R.D., Hochberg M.E., 2001 – *Indirect interactions, community modules and biological control: a theoretical perspective.* In: Evaluating indirect ecological effects of biological control, Wajnberg E., Scott J.K. & Quimby P.C. Eds., CABI, Oxon, pp. 13-37.

Holt R.D., Lawton J.H., 1994 – *The ecological consequences of shared natural enemies.* - Annu. Rev. Ecol. Syst., 25: 495-520.

Holt R.D., 1977 – *Predation, apparent competition, and the structure of prey communities.* - Theoret. Pop. Biol., 12: 197-229.

Holt R.D., 1997 – *Community modules.* In: Multitrophic Interactions in Terrestrial Ecosystems, Gange A.C. & Brown V.K. Eds., Blackwell Science, Oxford, pp. 333-349.

Hoogendoorn M., Heimpel G.E., 2002 – *Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid.* - Biol. Control, 25: 224-230.

Howarth F.G., 1983 – *Classical biocontrol: panacea or Pandora's box.* - P. Hawaii. Entomol. Soc., 24: 239-244.

Howarth F.G., 1991 – *Environmental impacts of classical biological control.* - Annu. Rev. Entomol., 36: 485-509.

Jeffries M.J., Lawton J.H., 1984 – *Enemy free space and the structure of ecological communities.* - Biol. J. Linn. Soc., 23: 269-286.

Landis D.A., Wratten S.D., Gurr G.M., 2000 – *Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture.* Annu. Rev. Entomol., 45: 175-201.

Lawton J.H., 1986. *The effect of parasitoids on phytophagous insect communities.* In Insect Parasitoids. 13th Symposium of the Royal Entomological Society of London, Waage J. & Greathead D. Ed., Academic Press, London, pp. 265-287.

May R.M., Hassell M.P., Anderson R.M., Tonkyn D.W., 1981 – *Density dependence in host-parasitoid models.* - J. Anim. Ecol., 50: 855-865.

Menge B.A., 1995 – *Indirect effects in marine rocky intertidal interaction webs: patterns and importance.* - Ecol. Monogr., 65: 21-74.

Messing R.H., Wright M.G., 2006 – *Biological control of invasive species: solution or pollution?* - Front. Ecol. Environ., 4: 132-140.

Mollot G., Tixier P., Lescourret F., Quilici S., Duyck P.F., 2012 – *New primary resource increases predation on a pest in a banana agroecosystem.* - Agr. Forest Entomol., 14: 317-323.

Moon D.C., Moon J., Keagy A., 2010 – *Direct and Indirect Interactions.* - Nature Educ. Knowl., 3: 50.

Morris R.J., Lewis O.T., Godfray H.C.J., 2004 – *Experimental evidence for apparent competition in a tropical forest food web.* - Nature, 428: 310-313.

Norris R.F., Kogan M., 2005 – *Ecology of interactions between weeds and arthropods.* - Annu. Rev. Entomol., 50: 479-503.

Oliver M., Luque-Larena J.J., Lambin X., 2009 – *Do rabbits eat voles? Apparent competition, habitat heterogeneity and large-scale coexistence under mink predation.* - Ecol. Lett., 12: 1201-1209.

Parry D., 2008 – *Beyond Pandora's box: quantitatively evaluating non-target effects of parasitoids in classical biological control.* - Biol. Invasions, 11: 47-58.

Reader R.J., 1992 – *Herbivory as a confounding factor in an experiment measuring competition among plants.* - Ecology, 73: 373-376.

Ricker W.E., 1954 – *Stock and recruitment.* - J. Fish. Res. Board Can., 11: 559-623.

Shelton A.M., Badenes-Perez F.R., 2006 – *Concepts and applications of trap cropping in pest management.* - Annu. Rev. Entomol., 51: 285-308.

Simberloff D., Stiling P., 1996 – *Risks of species introduced for biological control.* - Biol. Conserv., 78: 185-192.

van Nouhuys S., Hanski I., 2000 – *Apparent competition between parasitoids mediated by a shared hyperparasitoid.* - Ecol. Lett., 3: 82-84.

van Nouhuys S., Kraft T.S., 2012 – *Indirect interaction between butterfly species mediated by a shared pupal parasitoid.* - Popul. Ecol., 54: 251-260.

Williamson M.H., 1957 – *An elementary theory of interspecific competition.* - Nature, 180: 422-425.

Seduta pubblica, Firenze 23 febbraio 2018

Tavola Rotonda su:

# DISCESE TERMICHE E TEMPERATURE BASSE E ULTRABASSE PER LA CREAZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI DI INTERESSE AGROFORESTALE

Coordinatore:

Pio Federico Roversi, Accademico

76 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 77-80*

# EMBRIOLOGIA E CRIOCONSERVAZIONE DI INSETTI

PIO FEDERICO ROVERSI[a] - FRANCESCO PAOLI[a] - SILVIA LANDI[a]

[a] *CREA - Centro di ricerca per la Difesa e la Certificazione, Via Lanciola 12/a, 50125, Firenze, Italia*;
e-mail: piofederico.roversi@crea.gov.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

## *Insect embryology and cryopreservation*

Water is the universal solvent of living organisms and in purity it begins to freeze when the temperature drops below 0°C, temperature at which ice begins to be formed in the tissues. In the cryopreservation of arthropod embryos an innovative technique has been proposed which exploits the ability of high concentration cryoprotective substances to pass, during the cooling phase, from the liquid to the solid state, forming a glassy texture and thus preventing the formation of ice crystals.

The investigations on *Drosophila* have highlighted the essentiality of protecting these organisms with adequate concentrations of cryoprotectives and carrying out a process of vitrification and not of freezing.

With specific reference to the Lepidoptera, the first published research occurred only in 2007. Identifying the cryoprotectant with less toxicity and the embryonic stage with greater survival rates in pre-descent thermal treatments allowed the cryopreservation of eggs of a Lepidoptera, *Galleria mellonella* (L.), and the recovery of a laboratory colony starting from adults developed from eggs stored in an ultra-freezer for 48h at -140°C and subsequently subjected to a thermal rise of 6,000°C / min.

As a part of preliminary studies on the embryonic development of Insects for the development of cryopreservation protocols, a careful study of *Drosophila suzukii* embryogenesis was recently carried out, identifying the easily identifiable morphological markers *in vivo* necessary to identify the process of dorsal closure considered the most suitable for treatments.

The conservation of arthropods at ultra-low temperatures based on cryopreservation by vitrification of embryonic stages will allow the creation of living collections of germplasm of species and genotypes of agricultural, forestry and environmental interest.

KEY WORDS: Insect embryology, cryopreservation, vitrification, long term storage.

L'acqua è il solvente universale degli organismi viventi ed in purezza inizia a congelare quando la temperatura scende al di sotto di 0°C, temperatura in corrispondenza della quale inizia a formarsi ghiaccio nei tessuti, evento che superato un certo livello risulta di norma letale. Quando l'organismo è esposto a basse temperature le molecole d'acqua tendono infatti ad avvicinarsi tra loro disponendosi per formare i cristalli di ghiaccio nei quali vengono incluse le sole molecole d'acqua mentre le altre molecole presenti nei fluidi che circondano i cristalli vengono confinate portando alcune parti ad elevate concentrazioni di soluti che possono così raggiungere livelli tossici per l'organismo. I violenti flussi di acqua determinati da queste irregolari concentrazioni di soluti possono inoltre di per sé divenire causa di danni e rottura delle membrane. La formazione del ghiaccio inizia negli spazi intercellulari dove accrescendosi aumenta la disidratazione delle cellule. Con il congelamento le cellule finiscono inoltre per rimanere schiacciate dai cristalli di ghiaccio. Non bisogna poi dimenticare che i cristalli di ghiaccio presenti in una soluzione possono modificarsi con graduale scomparsa dei cristalli di minori dimensioni e comparsa di cristalli di maggiore dimensioni, fenomeno indicato con il termine di ricristallizzazione che si accompagna ad ulteriori danni meccanici alle cellule per sfondamento delle membrane. In estrema sintesi il congelamento di organismi viventi può portare a danni fisici e chimici di diverso tipo e ordine di gravità.

In relazione all'utilizzo di temperature ultrabasse, allo stadio attuale sono due le metodiche utilizzate per la conservazione degli embrioni di diverse specie animali, il congelamento e la vitrificazione. Il congelamento, conosciuto da oltre 30 anni, richiede una lenta procedura di raffreddamento ed una costosa strumentazione computerizzata per la riduzione programmata della temperatura. Di recente nella crioconservazione degli embrioni è stata proposta una tecnica innovativa che sfrutta la capacità di sostanze crioprotettive ad alta concentrazione di passare, durante la fase di raffreddamento, dallo stato liquido a quello solido formando una trama vetrosa ed impedendo in tal modo la formazione di cristalli di ghiaccio (FULLER *et al.,* 2004).

Una problematica di particolare rilievo legata al ricorso alle strategie di vitrificazione, con strutturazione delle molecole d'acqua in un solido amorfo, è rappresentata dalla fragilità derivante dalla trasformazione

– Pubblicato marzo 2019

dell'organismo in tempi brevissimi con velocità di discesa termica dell'ordine di 10.000°C/min in qualcosa di assimilabile in estrema sintesi alla realizzazione di una delicata "scultura vetrosa", che successivamente nella altrettanto veloce fase di riscaldamento deve essere riportata alla sua funzionalità, evitando che l'instaurarsi di tensioni interne derivanti da differenti gradienti termici dei tessuti causi rotture e conseguente compromissione della vitalità.

Da quanto detto deriva che tanto più l'organismo si trova in una fase iniziale della sua ontogenesi e presenta una minore complessità anatomica, tanto minori sono i rischi di danni nel corso dei processi di crioconservazione.

La conservazione e la successiva moltiplicazione di materiale caratterizzato geneticamente, sia di ceppi di batteri e funghi di diversa origine che di insetti, acari e nematodi da impiegare in programmi di controllo biologico richiede, secondo la metodologia tradizionale, un notevole impegno di tempo, di attrezzature e di personale specializzato. Questa fase, inoltre, non sempre assicura il mantenimento di alcune delle proprietà fisio-patologiche dei microrganismi stessi fra cui la patogenicità né, per quanto riguarda insetti, acari e nematodi, può assolutamente garantire il mantenimento delle caratteristiche di partenza. La tecnica della conservazione a basse temperature, basata sul congelamento di organismi viventi a varie temperature e con diverse modalità, potrebbe consentire la realizzazione di "collezioni viventi" in grado di offrire risposte idonee al superamento di vari problemi tecnici, fra cui il mantenimento nel tempo delle caratteristiche genetiche e biologiche del materiale in allevamento e la riduzione degli spazi e dell'impegno umano.

Nello specifico, per quanto attiene agli insetti, la problematica del mantenimento nel tempo delle specie si ripropone con crescente importanza per le entità normalmente mantenute in allevamenti intensivi con finalità economico-produttive, come nel caso del baco da seta (*Bombix mori*), o di impiego in programmi di lotta biologica (predatori e parassitoidi) oppure largamente utilizzate come "esca" per l'isolamento di funghi e nematodi entomopatogeni nonché come "supporto" per lo sviluppo di parassitoidi utili (es. *Nezara viridula, Galleria mellonella*). Analogamente, nel caso degli acari fitoseidi, già prodotti a scopo commerciale per la difesa contro alcuni fitofagi, uno dei problemi più importanti da risolvere è la possibilità del loro stoccaggio e la conservazione delle loro caratteristiche predatorie. Quindi, la possibilità offerta dalla crioconservazione di 'sospendere' gli allevamenti degli organismi utili e di 'riattivarli' al momento del bisogno potrebbe risultare di grande interesse applicativo.

Sebbene la temperatura sia il fattore che più incide sul rallentamento del metabolismo cellulare, limitati sono i dati riguardanti la possibile risposta di organismi e microrganismi di interesse agro-forestale a condizioni di conservazione mediante stoccaggio a temperatura ultra-bassa (cryopreservation) o in condizioni meno estreme di temperatura comunque tali da determinare condizioni di crescita rallentata (slow growth storage).

Con riferimento agli Insetti molti degli studi sono stati incentrati sui fattori in grado di adeguare la risposta alla basse temperature invernali di insetti di ambienti temperati con particolare riferimento alla preprogrammazione o precondizionamento, che operando con modifiche fisiologiche e biochimiche sulla base di fattori di condizionamento che possono agire sull'organismo o sui progenitori rende possibile la sopravvivenza per brevi o lunghi periodi a basse temperature altrimenti letali. Già nel 1961 SALT aveva rilevato in un Imenottero Braconide, *Bracon cephi* parassitoide di un coleottero dannoso alle graminacee, l'aumento della resistenza alle basse temperature proprio in coincidenza con l'entrata in diapausa. Nel seguito vari ricercatori si sono indirizzati a scandagliare le possibilità di sfruttare diapausa e quiescenza per facilitare lo stoccaggio prevalentemente a breve termine di organismi utili e delle loro vittime da utilizzare in programmi di lotta biologica, in taluni casi incorporando questi accorgimenti in programmi industriali di allevamento massale. Gran parte delle ricerche sono state però indirizzate a verificare le potenzialità di utilizzo di temperature prossime a 0°C, per lo più di poco superiori.

Solo a partire dalla fine degli anni '70 inizi degli anni '80 gli studi hanno iniziato a riguardare la risposta di insetti a temperature ultrabasse e i danni del congelamento, incentrandosi prevalentemente ma non in modo esclusivo sulle possibilità di stoccaggio di embrioni e uova di Ditteri (LEOPOLD e RINEHART, 2010).

Organismo da laboratorio per eccellenza, la *Drosophila* ha permesso di evidenziare la non idoneità dei metodi di crioconservazione basati su protocolli che prevedevano una lenta discesa termica e il successivo stoccaggio in azoto liquido a -196°C, fino a quel momento adottati per altri organismi animali, (MAZUR *et al.,* 1992). È stato infatti solo dopo la scoperta che l'immersione in azoto liquido forniva la necessaria estrema velocità di raffreddamento e l'abbinamento con un successivo quasi altrettanto rapido riscaldamento, che la metodologia per lo stoccaggio a freddo di artropodi e nematodi è divenuta disponibile.

Le indagini sulla *Drosophila* hanno evidenziato l'essenzialità di proteggere questi organismi con adeguate concentrazioni di crioprotettivi e realizzare un processo di vitrificazione e non di congelamento (MAZUR *et al.,* 1992; STEPONKUS e CALDWELL, 1993). In questa fase gli studi sullo stoccaggio a temperature

ultrabasse hanno iniziato a toccare anche insetti entomofagi utili, alcuni tutt'oggi allevati commercialmente come *Aphidoletes aphydimiza* distribuito in programmi di controllo biologico per il controllo di afidi di colture di pregio in serra (MILES e BALE, 1995).

Con specifico riferimento ai Lepidotteri, solo nel 2007 sono stati pubblicati i risultati della prima ricerca che, previa identificazione del crioprotettivo con minore tossicità e dello stadio embrionale con maggiori percentuali di sopravvivenza nei trattamenti prediscesa termica, ha permesso di crioconservare uova di un Lepidottero, *Galleria mellonella* (L.), e di ricostituire una colonia di laboratorio a partire da adulti sviluppatisi da uova decorionate, trattate con crioprotettivi, stoccate in un ultracongelatore per 48h a -140°C e successivamente sottoposte a risalita termica pari a 6.000°C/min (ROVERSI *et al.,* 2007, COSI *et al,* 2010).

Più di recente le indagini sono state incentrate su *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), specie aliena recentemente introdotta in Italia, che sta causando ingenti danni alla frutticoltura mediterranea (CALABRIA *et al*., 2010). Le femmine fecondate depongono le uova all'interno dei frutti mediante ovopositore in via di maturazione e le larve si nutrono della polpa portando al rapido disfacimento dei frutti. Il controllo è reso difficoltoso dall'elevata polifagia, dalla brevità del ciclo biologico e dalla necessità di effettuare i trattamenti in prossimità della raccolta. La lotta biologica con la tecnica del maschio sterile (SIT) è attualmente oggetto di studio e per questo scopo sono state create linee sterili di *D. sukukii* (SCHETELIG e HANDLER, 2013). In tale contesto la crioconservazione delle uova mediante vitrificazione potrebbe fornire un idoneo ausilio nell'ottimizzazione della produzione massale del dittero. Un elemento critico di tale tecnica è rappresentato dall'individuazione degli stadi di sviluppo da trattare; l'impiego dei crioprotettivi può determinare danni letali sia nei primi stadi di sviluppo con organi non ancora formati che successivamente per difficoltà a penetrare la cuticola (RAJAMOHAN e LEOPOLD, 2007).

LANDI *et al.* (2015) hanno svolto un accurato studio sull'embriogenesi di questo fitofago, individuando i marker morfologici facilmente identificabili in vivo determinandone i tempi di sviluppo. Lo studio è stato effettuato su una popolazione mantenuta in cella climatizzata a 25°C, UR 75%, fotoperiodo 12:12. Le uova vive, trattate con Halocarbon Oil 27 (Sigma) per rendere il corion trasparente, sono state osservate ad intervalli di 30 minuti allo stereo microscopio durante l'intero sviluppo embrionale (WIESCHAUS e NÜSSLEIN-VOLHARD, 1986). I diversi stadi embrionali sono stati fotografati trattando le uova in accordo con il metodo riportato da HAVELKA *et al.* (2007). I dati acquisiti sono stati comparati con quanto già noto in letteratura su *Drosophila melanogaster* (WEISHAUS e NÜSSLEIN-VOLHRD, 1986; HARTENSTEIN, 1993). Questa metodologia ha permesso di individuare 17 stadi dello sviluppo embrionale. L'embriogenesi di *D. suzukii* si completa in circa 23-25 ore a 25°C. Tali risultati sono in contrasto con quanto riportato da KANZAWA (1939) per il quale lo sviluppo embrionale di *D. suzukii* si completava in sole 13 ore alla medesima temperatura. Viceversa, i tempi di sviluppo registrati sono comparabili con quelli di *D. melanogaster* che completa l'embriogenesi in 21 ore (HARTENSTEIN, 1993). Le fasi di blastula, gastrula, allungamento della banda germinativa, accorciamento della banda germinativa, chiusura dorsale e morfogenesi finale sono raggiunti rispettivamente dopo 4.00, 4.20, 8.30, 11.40, 15.00 e 23.00 ore. I tempi di sviluppo di blastula e di morfogenesi finale sono più lunghi in *D. suzukii* rispetto a *D. melanogaster*: a questi è da imputare la maggior tempistica complessiva di sviluppo embrionale. Inoltre, gli autori hanno evidenziato che il 25.6% delle uova era deposta in stadi di sviluppo avanzati a causa della ritenzione delle uova negli ovidutti.

La fase di chiusura dorsale (stadi 14-15), considerata la più idonea per l'applicazione del protocollo di crioconservazione (STEPONKUS *et al.*, 1990; MAZUR *et al.*, 1992), viene raggiunta a 25°C dopo 14-15 ore dalla deposizione. Dopo tale intervallo di tempo circa il 50% delle uova sono allo stadio 14 e l'altro 50% allo stadio 15.

Nel complesso si ritiene che la conservazione di artropodi a temperature ultrabasse basata sulla crioconservazione mediante vitrificazione di stadi embrionali potrà consentire la realizzazione di collezioni viventi di germoplasma di specie e genotipi di interesse agrario, forestale e ambientale e offrire risposte idonee alle necessità di mantenimento sul medio e lungo periodo delle caratteristiche genetiche delle popolazioni allevate evitando anche fenomeni di deriva genetica, ben noti a tutti quelli che si occupano di mantenere in condizioni di laboratorio organismi utili per programmi di controllo biologico o comunque di interesse per la conservazione di linee in purezza utilizzate in studi di laboratorio.

## BIBLIOGRAFIA

CALABRIA G., MÁCA J., BÄCHLI, G., SERRA L., PASCUAL M., 1012 – *First records of the potential pest species* Drosophila suzukii *(Diptera: Drosophilidae) in Europe*. - J. Appl. Entomol., 136: 139-147.

COSI E., ABIDALLA M.T., ROVERSI P.F., 2010 – *The effect of Tween 80 on eggshell permeabilization in* Galleria mellonella *(L.) (Lepidopetra, Pyralidae)*. - Cryoletters, 31: 291-300.

FULLER B.J., LANE J., BENSON E.E., 2004 – *Life in the frozen state*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 672.

HARTENSTEIN V., 1993 – *Atlas of Drosophila Development*. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Bethesda (MD), http://www.sdbonline.org/sites/fly/atlas/00atlas.htm

HAVELKA J., LANDA V. JR., LANDA V., 2007 – *Embryogenesis of* Aphidoletes aphidimyza *(Diptera: Cecidomyiidae): morphological markers for stanging of living embryos*. - Eur. J. Entomol., 104: 81-87.

KANZAWA T., 1939 – *Studies on the fruit flies*. Yamanashikenritsu Noji-shikenjo Gyomu-nenpo pp. 49. - Rev. Appl. Entomol., 29: 622 [Abstract].

LANDI S., GARGANI E., PAOLI F., SIMONI S., ROVERSI P.F., 2015 – *Morphological markers for cryopreservation in the embryonic development of* Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). - Journal of Economic Entomology, 108 (4): 1875-1883.

LEOPOLD R.A., RINEHART J.P., 2010 – *A template for insect cryopreservation. In: Low temperature biology of insects.* Edited by D.L. Delinger and R.E. Lee, Cambridge University Press. pp. 325-341.

MAZUR P., COLE K.W., HALL J.W., SCHREUDERS P.D., MAHOWALD A.P., 1992 – *Cryobiological Preservation of* Drosophila *Embryos*. - Science 258: 1932-1935.

MILES J.E., BALE J.S., 1995 – *Analysis of chilling injury in* Aphidoletes aphidimiza. - Cryobiology, 32: 45-73.

RAJAMOHAD, A., LEOPOLD R.A., 2007 – *Cryopreservation of Mexican fruit flies by vitrification: stage selection and avoidance of thermal stress*. - Cryobiology, 54: 44-54.

ROVERSI P.F., COSI E., IRDANI T., 2008 – *Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth* Galleria mellonella *(Lepidoptera: Pyralidae)*. - Cryobiology, 56: 1-7.

SALT R.W., 1961 – *Principles of insect cold-hardiness*. - Annual Review of Entomology, 6: 55-73.

SCHETELIG M.F.,HANDLER A.M., 2013 – *Germline transformation of spotted wing drosophilid,* Drosophila suzukii, *with a piggyback transposon vector.* - Genetica, 141: 189-193.

STEPONKUS P.L., CALDWELL S., 1993 – *An optimized procedure for the cryopreservation of* Drosophila melanogaster *embryos.* - Cryoletters, 14: 377-380.

STEPONKUS P.L., MYERS S.P., LYNCH D.V., GARDNER L., BRONSHTEYN V., LEIBO S.P., RALL W.F., PITT R.E., LIN T.T., MACINTYRE R.J., 1990 – *Cryopreservation of* Drosophila melanogaster *embryos.* - Nature, 345: 170-172.

WEISCHAUS E., NÜSSLEIN-VOLHARD C., 1986 – *Looking at embryos*. *In* Drosophila *a practical approach*. Ed. Roberts DB Oxford University Press, GB, pp. 179-214.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 81-88*

# LA CRIOCONSERVAZIONE DI SPECIE ARBOREE: DAL LABORATORIO ALLA CRIOBANCA

MAURIZIO LAMBARDI[a]

[a] IVALSA, *Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze).* E-mail: lambardi@ivalsa.cnr.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

*Cryopreservation of woody species: from the laboratory to the cryobank*

Plant cryopreservation has greatly evolved in recent years, being today a safe cost-effective complementary approach to the traditional *ex situ* conservation of plant biodiversity. A milestone in the cryopreservation of woody plant material dates back to 1990, when Akira Sakai and co-workers developed the Plant Vitrification Solution n° 2 (PVS2) which showed to be very effective for the induction of cell vitrification during ultra-rapid freezing in liquid nitrogen. Since then, the number of PVS2-based protocols, mainly developed for the cryopreservation of shoot tips, increased yearly while, at the same time, new and effective encapsulation- and droplet-based methods were proposed. A range of different cryo-techniques is now available for the cryostorage of woody plant germplasm, allowing the safe long-term conservation in liquid nitrogen of different organs and tissues coming from tissue culture or directly collected from plants in the field, such as (i) shoot tips, obtained *in vitro* by axillary or apical buds and used naked or incapsulated in Ca-alginate beads. They are the most used explants with broad-leaf trees, provided that optimized protocols of micropropagation have been achieved; (ii) somatic embryogenic callus, largely used with conifer species for which efficient micropropagation procedures from mature stock plants are rarely available; (iii) seeds and embryonic axes, useful material for the long-term preservation of both seed-propagated, and vegetatively-propagated species, provided that the latter have polyembrionic seeds, like in citrus fruits; (iv) dormant buds, i.e. uni-nodal segments that can be cryopreserved and then, after thawing, used to recover accessions by chip-budding onto rootstocks. Two practical examples of cryobanks for the conservation of polyembrionic seeds from ancient Citrus accessions, and dormant buds from ancient apple cultivars of the Veneto region are described.

KEY WORDS: dormant buds, embryogenic callus, polyembrionic seeds, shoot tips, vitrification.

## INTRODUZIONE

La conservazione della biodiversità delle specie vegetali è oggi una priorità a livello mondiale e comprende azioni che impediscono o riducono fortemente la perdita di risorse genetiche dovuta a fattori naturali (quali la desertificazione e i cambiamenti climatici), oppure indotte dal comportamento umano (deforestazione, specializzazione delle colture, urbanizzazione). Si stima oggi che, delle circa 391.000 specie vegetali conosciute e descritte, oltre il 20% siano da considerare minacciate o già prossime all'estinzione (*www.bgci.org /plant-conservation/threats/;* RBG KEW, 2016). Le conseguenze di questa perdita di risorse genetiche sono drammatiche se si considera la possibile scomparsa di caratteri unici ed importanti, così come di prodotti naturali utili per la salute e la nutrizione. Allo scopo di contrastare questa erosione di risorse genetiche, a partire dagli anni '70 dello scorso millennio è stato iniziato un importante lavoro, a livello mondiale, di collezione, caratterizzazione e conservazione *ex situ* della biodiversità vegetale in banche del seme e collezioni clonali in campo. Nel 2010 sono state stimate in 7,4 milioni le accessioni tenute in conservazione da organizzazioni internazionali, da istituzioni nazionali e autorità regionali e da compagnie private (FAO, 2010); 90% di queste accessioni (per la metà relative a cereali) sono conservate in circa 1750 banche del seme, sparse nel mondo.

Relativamente alle specie arboree, la conservazione delle risorse genetiche è tradizionalmente effettuate in banche del seme (per le specie prevalentemente riprodotte per via gamica) o in collezioni clonali in campo (per le specie, quali i fruttiferi, largamente propagati per via vegetativa). Sebbene sia innegabile il ruolo fondamentale che svolgono nella conservazione della biodiversità vegetale le banche del seme e le collezioni clonali, questi approcci tradizionali presentano alcune limitazioni e inconvenienti. Lo stoccaggio a bassa temperatura (tipicamente -18°C) di semi parzialmente disidratati non è applicabile con specie a seme non ortodosso o sub-ortodosso, cioè specie con semi che subiscono un rapido deterioramento e diminuzione della germinazione se con-

– Pubblicato marzo 2019

servati come tali o dopo una sostanziale riduzione del contenuto di acqua, necessaria per preservarne la germinabilità durante la conservazione a lungo termine a basse temperature. Ad esempio, molte specie tropicali, ma anche vari alberi da frutto e da foresta delle zone temperate (quali castagno, noce, ippocastano, acero, quercia e altri) hanno grandi semi non ortodossi, "recalcitranti" alla conservazione a -18°C. Per quanto riguarda le collezioni clonali, la FAO ha stimato che le accessioni in collezioni clonali nel 2010 ammontassero a oltre 700.000, rappresentando così circa il 9% delle risorse genetiche totali conservate nel mondo. Questi arboreti clonali costituiscono un patrimonio straordinario e insostituibile di risorse genetiche, ma richiedono vaste aree e costi elevati di manutenzione per gli interventi periodici di potatura, concimazione, irrigazione e controllo dei patogeni. Ciò rende la loro manutenzione spesso problematica per le istituzioni pubbliche, quando non supportate da adeguati finanziamenti statali o regionali. Inoltre, gli alberi delle collezioni clonali sono costantemente soggetti al rischio di perdite a causa di eventi meteorologici eccezionali (come gelate e inondazioni) o malattie gravi.

Oggi le biotecnologie vegetali offrono importanti opzioni per la raccolta, la caratterizzazione molecolare, l'eliminazione dei patogeni, la propagazione, la documentazione, la conservazione e lo scambio di risorse genetiche vegetali controllate geneticamente e sanitariamente (Benson, 1999). In questo contesto, l'applicazione delle tecnologie *in vitro* alla conservazione delle risorse genetiche vegetali si è notevolmente evoluta in anni recenti, consentendo lo sviluppo di procedure efficaci di conservazione sia a medio termine delle colture di germogli a temperature al di sopra del congelamento (Lambardi e Ozudogru, 2013), sia a lungo termine di organi e tessuti provenienti da coltura *in vitro* o direttamente dal campo e stoccati a temperatura criogenica (Lambardi e De Carlo, 2003; Panis and Lambardi, 2006; Lambardi e Benelli, 2007; Benelli *et al.*, 2013). La crioconservazione applicata alle piante, in particolare, dalla sua introduzione negli anni '60, è considerata oggi uno straordinario metodo di conservazione a lungo termine del materiale biologico, in totale sicurezza in quanto non induce alterazioni genetiche e preserva il potenziale rigenerativo del materiale mantenuto a temperatura ultra-bassa. L'azoto è il gas criogenico utilizzato in crioconservazione di espianti vegetali, poiché è economico, non è tossico e consente la conservazione di campioni a -196°C (in fase liquida) o a circa -160°C (nella fase vapore) in uno spazio molto limitato. La crioconservazione permette lo stoccaggio del materiale vegetale per un tempo teoricamente illimitato.

## Tappe fondamentali della crioconservazione di specie arboree

Il primo tentativo di crioconservare materiale vegetale da specie arboree risale al 1960, quando Akira Sakai, un pioniere del settore a cui si devono importanti avanzamenti della tecnica, dimostrò che micro-talee di un anno di pioppo e salice sopravvivevano all'ultra-raffreddamento a -196°C se erano stati esposti a -30°C per 6-24 ore prima dell'immersione in azoto liquido (AL) (Sakai, 1960). Così come riportato in questo esperimento, la crioconservazione delle piante ha inizialmente seguito la tecnica del "congelamento a due fasi", in cui si ottiene una disidratazione ottimale delle cellule mediante una prima esposizione del materiale vegetale ad una temperatura prossima ai -40°C (meglio se raggiunta gradualmente con un lento raffreddamento), seguita dalla sua immersione in AL. Questo approccio, sebbene efficace nel prevenire il danno causato dalla formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari, è piuttosto laborioso e oneroso, a causa del costo delle apparecchiature di abbattimento della temperatura a velocità controllata. Per questo motivo, i progressi nella tecnologia hanno successivamente prodotto procedure nuove, semplici ed efficaci, che inducono vitrificazione degli espianti mediante "congelamento a una fase", cioè con l'immersione diretta in AL (Engelmann, 2004; Panis e Lambardi, 2006). Una gamma di metodi criogenici sono oggi disponibili con questo approccio per la conservazione di vari espianti di specie arboree, provenienti da colture *in vitro* (microgemme, callo embriogenico) o direttamente raccolti da alberi in campo (semi, polline, gemme dormienti; Fig. 1).

### *Metodi basati sull'uso della soluzione PVS2*

Agli inizi degli anni '90, cioè 30 anni dopo il lavoro pionieristico di Sakai con la crioconservazione di pioppo e salice, due procedure diverse venivano proposte quasi contemporaneamente, la "vitrificazione con PVS2" (Sakai *et al.*, 1990) e l' "incapsulamento-disidratazione" (Fabre e Dereuddre, 1990). Entrambe le tecniche hanno immediatamente attirato l'attenzione degli scienziati per la grande semplificazione della procedura di crioconservazione di espianti vegetali, dovuta alla possibilità di indurre vitrificazione cellulare anche con immersione diretta dei campioni in AL. Il termine vitrificazione si riferisce al processo fisico di transizione di una soluzione acquosa in uno stato amorfo e vetroso (non cristallino) durante raffreddamento ultra-rapido. Quando il processo di vitrificazione riguarda il citosol cellulare, la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari è impedito e il tessuto rimane vitale e idoneo alla reintroduzione in condizioni standard di coltura *in vitro*. Il passo principale del metodo proposto da Sakai è il trattamento degli espianti

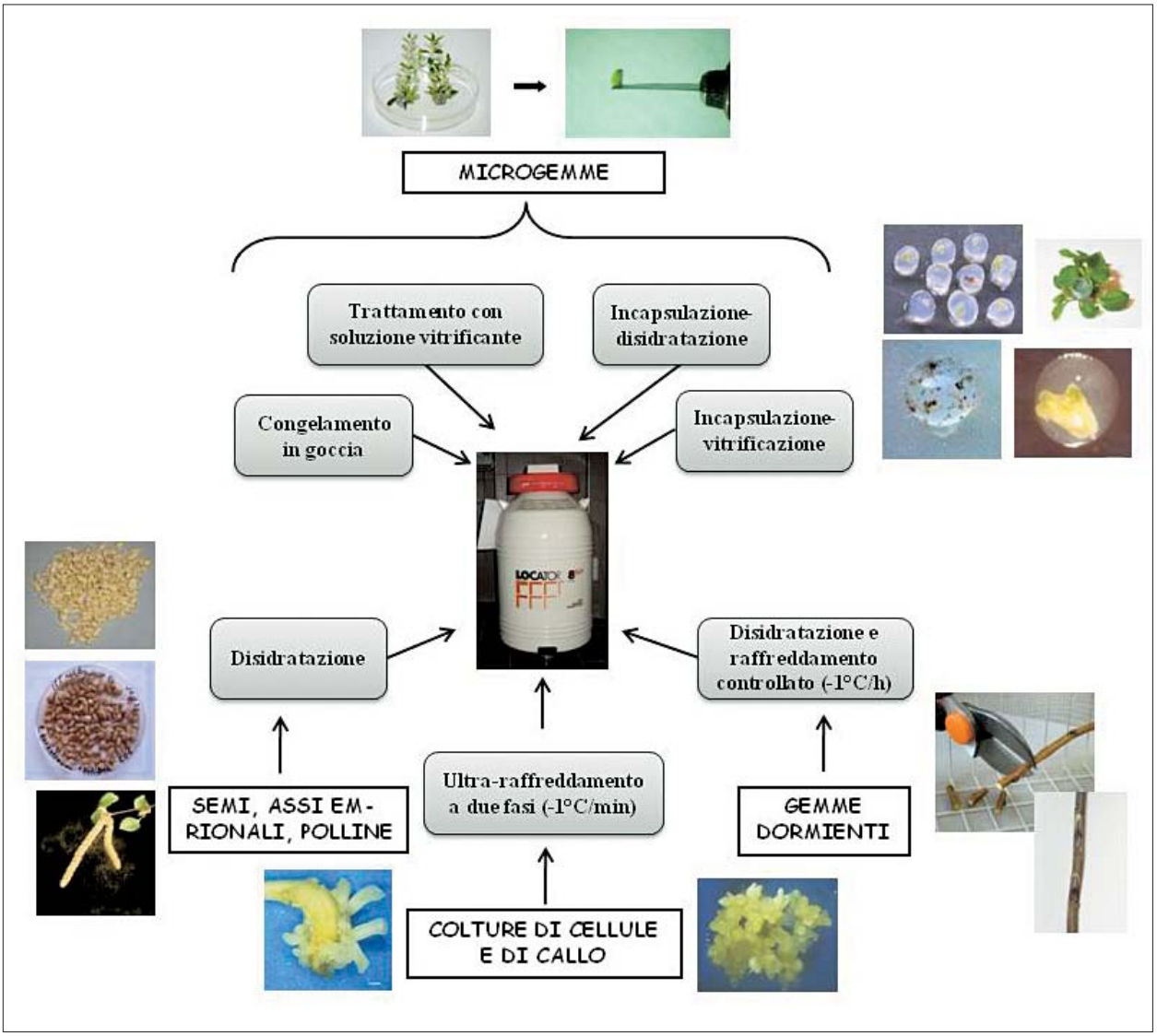



Fig. 1 – Metodi per la crioconservazione di vari organi e tessuti di specie arboree, direttamente raccolti da piante oppure prelevati da coltura *in vitro* (da LAMBARDI e DE CARLO, 2009; modificato).

in una soluzione di vitrificazione altamente concentrata, costituita da una combinazione di crioprotettori, che induce disidratazione osmotica delle cellule. Il PVS2 (Plant Vitrification Solution n. 2, contenente 30% glicerolo, 15% etilenglicole e 15% DMSO in substrato liquido MS - MURASHIGE e SKOOG, 1962 - contenente saccarosio 0,4 M; SAKAI *et al.*, 1991) è ancora oggi la miscela vitrificante più usata nei laboratori di crioconservazione vegetale (SAKAI e ENGELMANN, 2007). Tuttavia, nel tempo, altre soluzioni vitrificanti sono state proposte come varianti del PVS2 (KIM *et al.*, 2009), tra le quali il PVS3 (50% glicerolo e 50% saccarosio in substrato MS), in particolare, si è dimostrato più efficace del PVS2 in alcune applicazioni (SAKAI *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009). Gli espianti vengono trattati nella soluzione vitrificante selezionata per periodi di tempo variabili (da 15 minuti a 2 ore) all'interno di cryovial da 2 ml e, successivamente, queste sono immerse direttamente in AL. Questa procedura determina vitrificazione delle molecole d'acqua intra- ed extra-cellulari. A quasi 30 anni dalla sua prima applicazione, il metodo di vitrificazione basato sul trattamento con PVS2 è ancora oggi il protocollo di crioconservazione di gran lunga più utilizzato, specialmente per la conservazione di microgemme da vitrocoltura di specie da frutto (BENELLI *et al.*, 2013). Il successo della procedura può essere attribuito alla semplicità del protocollo, all'alta riproducibilità e al fatto di essersi dimostrato efficace per una vasta gamma di specie arboree.

*Metodi basati sull'incapsulamento degli espianti*

La principale caratteristica dei metodi di crioconservazione basati sull'incapsulazione è lo stoccaggio a temperatura ultra-bassa degli espianti da vitrocoltura inglobati in capsule di alginato di calcio, a formare i

cosiddetti "semi sintetici o artificiali" (Redenbaugh, 1993). Murashige (1977) fu il primo a produrre una definizione ufficiale di seme sintetico: "un singolo embrione somatico incapsulato, cioè un prodotto clonale che può essere manipolato e usato come un vero seme per il trasporto, lo stoccaggio e la semina e che evolve in una plantula *in vitro* o *ex vitro*". L'uso iniziale di singoli embrioni somatici per produrre semi sintetici imitava i semi naturali, dove l'endosperma che circonda l'embrione zigotico viene sostituito dalla capsula di alginato che circonda l'embrione somatico e che può contenere sostanze nutritive addizionate. Più tardi, la tecnologia fu estesa all'incapsulamento di vari propaguli derivati da coltura *in vitro*, come microgemme, segmenti nodali e campioni di callo, che determinarono una nuova definizione di seme sintetico (Aitken-Christie *et al.*, 1995): "embrioni somatici, germogli o altri tessuti incapsulati artificialmente che possono essere utilizzati per la semina in condizioni *in vitro* o *ex vitro*" (per una revisione sull'uso di espianti non embriogenici per la produzione di semi sintetici, vedi Standardi e Micheli, 2013). Nel metodo "incapsulamento-disidratazione", sviluppato da Fabre e Dereuddre (1990), i semi sintetici contenenti microgemme sono trattati con un'alta concentrazione di saccarosio, disidratati fino ad un contenuto di umidità del 20-30% (mediante esposizione a flusso d'aria sterile o in gel di silice) e, quindi, immersi in AL all'interno di cryovial. Sebbene la procedura possa essere considerata piuttosto lunga e laboriosa, la presenza di una matrice nutritiva che circonda l'espianto può favorire la sua ricrescita dopo lo scongelamento. La tecnica di "incapsulamento-vitrificazione", inoltre, combina l'incapsulamento degli espianti con l'esposizione dei semi sintetici ad una soluzione vitrificante. Il metodo è stato applicato con successo a varie specie di frutta (Sakai ed Engelmann, 2007; Benelli *et al.*, 2013).

*La tecnica del congelamento in goccia*

In anni recenti, un nuovo approccio di "congelamento a una fase" ha acquisito grande popolarità: si tratta della tecnica di crioconservazione basata sull'inclusione degli espianti "in goccia". Questa tecnica fu proposta per la prima volta molto prima dei metodi basati sull'uso del PVS2 e sull'incapsulamento, quando Kartha e colleghi (1982) riferirono della possibilità di includere meristemi di manioca (*Manihot esculenta*) in piccole gocce di DMSO, preparate su strisce di alluminio. Le strisce erano quindi immerse direttamente in AL che produceva un velocissimo congelamento della goccia e dell'espianto ivi incluso. Dopo un lungo periodo, durante il quale è stato praticamente dimenticato, negli anni 2000 il metodo è stato riconsiderato da vari gruppi nel mondo operanti in crioconservazione e il numero di pubblicazioni basati sul metodo dell'inclusione in gocce di DMSO o di PVS2 sono andate aumentatando ogni anno (Grapin *et al.*, 2011). Nella procedura più comune, il metodo si basa sull'inclusione degli espianti in gocce da 5-10 µL di DMSO o PVS2, preparate in gruppi di 4-5 su strisce di fogli di alluminio da 8x30 mm (tali, cioè, da poter essere inserite in cryovial). Dopo questo trattamento (generalmente più breve rispetto alle altre tecniche di vitrificazione), le strisce vengono inserite in cryovial contenenti AL e queste, a loro volta, immerse in AL. Il metodo basato sul congelamento "in goccia" ha ripetutamente dimostrato di essere un sistema molto efficace per indurre la tolleranza degli espianti al congelamento ultra-rapido in AL, presumibilmente perché, rispetto alle altre tecniche di "congelamento a una fase", consente una più repentina decrescita della temperatura fino a -196°C degli espianti immersi in un quantitativo molto piccolo di crioprotettivo (Sakai e Engelmann, 2007).

Recentemente è stata proposta una tecnica innovativa, basata sull'uso di barrette di alluminio solide, anche queste di dimensioni tali da consentirne l'introduzione in cryovial da 2 ml. Qui gli espianti (microgemme) sono posti in 10 piccoli pozzetti della barretta e quindi incorporati in alginato di calcio. La crioconservazione degli espianti, prima dell'immersione diretta in AL, viene quindi ottenuta posizionando le barrette nel flusso d'aria sterile di una cappa a flusso laminare ("D-cryo-plate") o mediante immersione in PVS2 ("V-cryo-plate") per periodi di tempo selezionati sperimentalmente. Per quanto riguarda le specie arboree, le prime applicazioni promettenti sono state recentemente riportate in cachi (Matsumoto *et al.*, 2015) e *Prunus* spp. (Vujović *et al.*, 2015).

## Espianti da coltura *in vitro* per la crioconservazione di specie arboree

La crioconservazione delle specie arboree si serve largamente di espianti provenienti da colture *in vitro*, vale a dire microgemme ascellari o apicali, prelevate da colture di germogli micropropagati, e porzioni di callo embriogenico.

*Microgemme ascellari e apicali*

Le microgemme sono di gran lunga gli espianti più usati per la crioconservazione di specie arboree riprodotte clonalmente. Il mantenimento della rispondenza genetica alla pianta madre è assicurato quando si prelevano microgemme apicali o ascellari (Fig. 2, in alto), asportate da colture di germogli micropropagati. In condizioni sterili, la microgemma viene ridotta in dimensione per ottenere il meristema apicale, circondato da alcuni foglie primordiali (Fig. 2, in basso). Per quanto riguarda la dimensione finale dell'espianto, varia da un minimo di 0,3 a 2 mm, a seconda della

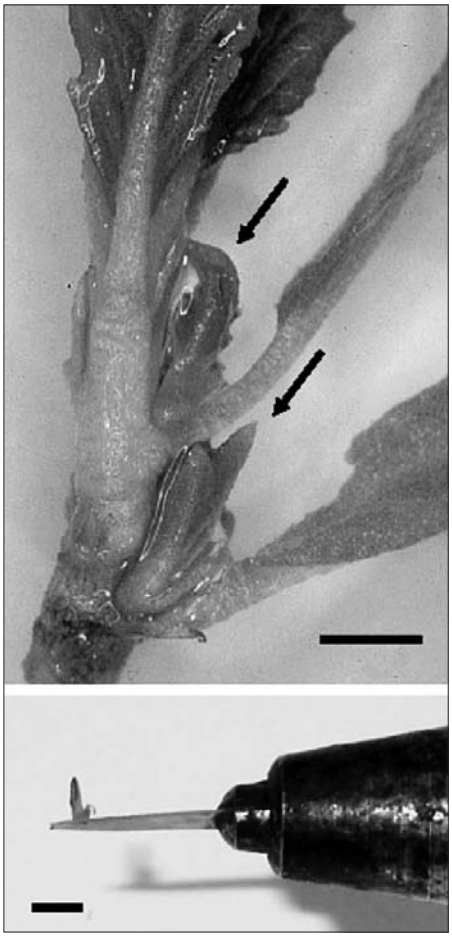


Fig. 2 – *Sopra*: microgemme ascellari sviluppate *in vitro* (frecce) e usate nella crioconservazione di pioppo bianco (*Populus alba*). *Sotto*: un espianto ottenuto da microgemma ascellare, pronto per l'applicazione di trattamenti preparatori alla diretta immersione in AL (da LAMBARDI *et al.*, 2000). Barre, 1 mm.

specie (LAMBARDI e DE CARLO, 2003). La quantità di foglie primordiali mantenute attorno al meristema centrale (da 2 a 4 coppie, in media) influisce sulla sopravvivenza delle microgemme in post-crioconservazione, in quanto riduce il rischio di dessicazione del meristema durante l'escissione e lo protegge da danni durante la manipolazione dell'espianto. D'altra parte, la presenza di troppe foglie può interferire sulla penetrazione dei crioprotettivi nella parte interna della microgemma; per questo motivo viene generalmente applicato un taglio trasversale nella parte apicale della microgemma. I principali vantaggi dell'utilizzo di microgemme da coltura *in vitro* per la crioconservazione di specie arboree sono:

– possono essere utilizzate nude o incapsulate in alginato di Ca in un'ampia gamma di metodi di crioconservazione ("vitrificazione basata su PVS2", "incapsulamento-disidratazione", "incapsulamento-vitrificazione", "congelamento in goccia");
– molte decine di espianti possono essere ottenuti da un singolo vaso di germogli in micropropagazione;
– migliaia di microgemme possono essere crioconservate anche in un contenitore di AL di medie dimensioni (100 litri o meno);
– possono essere utilizzate anche per il recupero di piante esenti da organismi patogeni mediante crioterapia (WANG *et al*., 2009).

Tra le problematiche che determinano, si ricordano:

– le tecniche criogeniche basate sull'impiego di microgemme sono scarsamente efficienti in specie caratterizzate da bassi tassi di proliferazione in micropropagazione (ad esempio, castagno, noce, quercia, olivo);
– i tassi di ricrescita post-crioconservazione sono spesso dipendenti dalla cultivar;
– il recupero *in vitro* di una linea di coltura di germogli in proliferazione da microgemme crioconservate può richiedere diverse subcolture e, quindi, un tempo piuttosto lungo;
– il passaggio "dal campo-all'AL-al campo" delle accessioni in collezione richiede molto tempo poiché sono necessari due cicli di micropropagazione, vale a dire prima e dopo la crioconservazione; per questo motivo, nelle specie frutticole che possono essere riprodotte mediante innesto a gemma, l'uso in crioconservazione di gemme dormienti, raccolte direttamente dalle piante in campo, è generalmente preferito (vedi più avanti).

Qualunque sia la tecnica utilizzata, la sopravvivenza delle microgemme in post-crioconservazione può essere fortemente influenzata dalla durata dei trattamenti che inducono la vitrificazione, ovvero il tempo di permanenza in PVS2 (o altra miscela crioprotettiva) o il livello di disidratazione delle microgemme incapsulate. In effetti, la durata di questi trattamenti dovrebbe essere abbastanza lunga da consentire la vitrificazione cellulare durante il congelamento ultra-rapido in AL, senza produrre effetti tossici (con protocolli basati su PVS2) o plasmolisi cellulare (con protocolli basati sulla disidratazione). Inoltre, sebbene i trattamenti sopra descritti svolgano un ruolo fondamentale nell'indurre la vitrificazione cellulare, ulteriori passaggi che li precedono possono contribuire a ottimizzare la tecnica di conservazione, come (i) l'acclimatazione delle colture di germogli a basse temperature (generalmente 4-5°C per le specie arboree di clima temperato) per alcune settimane, (ii) l'acclimatazione delle microgemme (dopo l'escissione) a 4°C per un periodo che va da 24 a 96 ore, (iii) il pre-trattamento delle stesse con una miscela di crioprotettori composta da 2 M glicerolo e 0,4 M saccarosio (MATSUMOTO et al., 1994) per 20-30 minuti (LAMBARDI e DE CARLO, 2003).

*Crioconservazione di callo embriogenico*

Nella coltura *in vitro*, il callo embriogenico (nelle conifere indicato come "masse embriogeniche somatiche") è composto da cellule de-differenziate in grado di evolvere in embrioni somatici quando coltivate in

condizioni di coltura e substrato contenente uno specifico regolatore di crescita (in genere il 2,4-D). L'embriogenesi somatica è un sistema di rigenerazione *in vitro* di importanza strategica per l'applicazione ai programmi di trasformazione genetica o come metodo di propagazione altamente efficiente, ad esempio in pini (Montalbàn *et al.*, 2016) e in altre specie di conifere (Klymaszewska *et al.*, 2016). Tuttavia, la subcoltura periodica del callo embriogenico aumenta il rischio di contaminazione e riduce nel tempo il suo potenziale di produrre embrioni somatici. Inoltre, l'induzione *in vitro* di cellule embriogeniche richiede molto lavoro ed è particolarmente difficile quando si lavora con specie per le quali sono disponibili espianti adatti solo durante un periodo limitato dell'anno, come nelle conifere dove vengono prodotte le prime cellule embriogeniche da poche cellule del sospensore di embrioni zigotici, escissi e introdotti *in vitro* in uno specifico e stretto periodo di immaturità (Lambardi, 2000; Klymaszewska *et al.*, 2016). In base al tipo di callo embriogenico, le tecniche di crioconservazione applicate sono sia il "congelamento a due fasi" (con abbassamento termico in genere di -1°C/min), largamente utilizzato con callo embriogenico di conifere, sia il "congelamento a una fase", preferito con le latifoglie. La crioconservazione del callo embriogenico è stata di recente ampiamente descritta da Ozudogru e Lambardi (2016).

### Organi direttamente raccolti in campo: due esempi di criobanca di specie arboree

Oltre agli espianti provenienti da vitrocoltura, anche taluni organi (semi, assi embrionali, gemme dormienti) e tessuti (polline), prelevati direttamente da piante in campo, possono essere efficacemente impiegati per la crioconservazione di specie arboree. Di seguito si riportano due esempi di criobanche costituite presso il CNR-IVALSA di Firenze per la conservazione di antico germoplasma di agrumi e melo.

#### *La criobanca di semi poliembrionici di* Citrus

La crioconservazione di semi interi o embrioni escissi è un'altra importante strategia per la salvaguardia del germoplasma di specie arboree a propagazione gamica, specialmente se provenienti da specie con semi sub-ortodossi o non ortodossi che non possono essere conservati a temperatura di -18°C. Inoltre, il seme può rappresentare un importante strumento anche per la conservazione del germoplasma pregiato di specie propagate vegetativamente aventi semi poliembronici, cioè semi contenenti embrioni nucellari che accompagnano l'embrione zigotico e rappresentano una fedele riproduzione genetica della pianta madre. Un esempio di questo tipo di conservazione è dato da uno studio, realizzato presso il CNR-IVALSA di Firenze, dove è stata sviluppata una procedura criogenica per consentire la duplicazione di un'antica collezione di agrumi, situata nel giardino botanico della "Villa Medicea" di Castello, nella periferia di Firenze. La collezione fu iniziata da Cosimo I de 'Medici nel XVI secolo e comprende oltre 600 accessioni, alcune delle quali uniche. È stato sviluppato un protocollo efficiente di disidratazione dei semi (fino ad un contenuto di umidità prossimo al 20%) e immersione diretta in AL, ottenendo sempre più del 75% di germinabilità in post-crioconservazione (Lambardi *et al.*, 2007). Poiché la maggior parte delle accessioni di agrumi della collezione sono polembrioniche, da ogni seme proveniente da crioconservazione sono poi state prodotte piantine multiple di tipo nucellare. Quindi, questo seme è un ottimo materiale per la crioconservazione clonale, a condizione che gli embrioni nucellari abbiano la predominanza nello sviluppo, rispetto all'embrione zigotico. Il protocollo per la crioconservazione dei semi di agrumi polembrionici è stato descritto da De Carlo *et al.* (2011).

È anche da segnalare che le specie arboree hanno spesso cotiledoni di grandi dimensioni che rendono le dimensioni del seme non idonee all'uso in crioconservazione, come nel caso di castagno, noce, quercia, diverse specie tropicali. In questo caso, è stata riportata la possibilità di conservare in AL assi embrionali privati dei cotiledoni, dopo l'applicazione di un appropriato protocollo di disidratazione. Esempi sono disponibili in letteratura per *Quercus faginea* (Gonzalez-Benito e Perez-Ruiz, 1992) e *Castanea sativa* (Corredoira *et al.*, 2004).

#### *La criobanca di gemme dormienti*

Questa tecnica fu sviluppata per germoplasma di melo alla fine degli anni '90 da alcuni ricercatori del Centro di Risorse Genetiche dello United States Department of Agriculture (USDA-ARS) di Geneve, USA (Forsline *et al.*, 1998). La procedura ha il grande vantaggio di non richiedere alcun passaggio delle accessioni in vitrocoltura, in quanto si serve di micromarze (portanti una gemma) che vengono disidratate e direttamente conservate in AL, e di permettere consistenti risparmi di tempo e manodopera per la conservazione e il recupero del germoplasma in post-crioconservazione (Lambardi *et al.,* 2011). Per il recupero delle accessioni, dopo scongelamento le micromarze vengono impiegate per innesti a gemma su portinnesti appositamente predisposti.

Successivamente alla raccolta delle marze e al loro successivo stoccaggio per circa due mesi a -5°C, la procedura perfezionata presso il CNR-IVALSA prevede i seguenti passaggi: (i) la parte centrale di ogni marza viene impiegata per preparare micromarze (segmenti uni-nodali) di circa 35 mm, con una gemma centrale;

(ii) le micromarze vengono stratificate in cella a -5°C, ove subiscono una lenta e graduale riduzione del contenuto di umidità; (iii) dopo un periodo variabile tra i 15 e i 40 giorni, al raggiungimento di un contenuto in umidità compreso tra il 20% e il 30%, le micromarze vengono avvolte in gruppi di 5 in fogli di alluminio, a loro volta avvolti in pellicola trasparente, e questi inseriti in scatole da crioconservazione; (iv) le scatole, contenenti un massimo di 35 micromarze, subiscono un raffreddamento graduale di -1°C ogni ora, fino al raggiungimento di -30°C, temperatura alla quale permangono per ulteriori 24 ore; (v) le scatole vengono immerse e stoccate in AL; (vi) in post-crioconservazione, le scatole sono riscaldate a 4°C per 24 ore, dopodichè le micromarze, liberate dagli involucri, sono stratificate in torba umida e mantenute 2 settimane a 2°C; durante questo periodo, le micromarze sottostanno ad una graduale reidratazione; (vii) dalle micromarze si prelevano gli scudetti, utilizzati per innesti a 'chip-budding' o 'T-budding' su portinnesti appositamente preparati. Questa procedura, quando ottimizzata, garantisce la sopravvivenza all'AL sia delle cellule cambiali dello scudetto (che permettono la saldatura col cambio del portinnesto), sia delle cellule meristematiche della gemma. Le esperienze condotte per oltre un quinquennio dal CNR-IVALSA, in collaborazione con Veneto Agricoltura, con antiche varietà di melo del Veneto hanno dimostrato che la procedura si può efficacemente adattare a materiale raccolto a fine gennaio in climi assai più miti rispetto a quello continentale statunitense. Le percentuali di recupero del germoplasma di melo del Veneto dopo innesto con gemme da crioconservazione è sempre stato in un range compreso tra il 40% e il 100%. Inoltre, è in corso una prova presso il Centro Attività Vivaistiche di Tebano (Faenza) che ha già evidenziato come la tecnica, con opportuni adattamenti, possa applicarsi persino a piante di melo in contenitore costantemente mantenute in screen-house (Contaldo *et al.*, 2018).

## Conclusioni

Grazie al lavoro condotto da diversi gruppi di ricerca nel mondo e ad una specifica azione COST dell'UE (n ° 871, "CryoPlanet", si veda Grapin *et al.*, 2011), negli ultimi 25 anni la crioconservazione delle piante si è concretamente trasferita dal laboratorio di ricerca all'applicazione pratica per la conservazione delle risorse genetiche minacciate. Le specie arboree a prevalente propagazione vegetativa, in particolare, hanno ottenuto grandi benefici dallo sfruttamento di questa tecnologia come approccio complementare alla conservazione *ex situ* in collezioni clonali, grazie alla possibilità di ridurre spazi e costi necessari alla manutenzione delle piante in campo. Vari metodi sono stati sviluppati e applicati alla conservazione in AL di molteplici tessuti e organi vegetali, provenienti sia dalla diretta raccolta in campo, sia da coltura *in vitro* di germogli e callo embriogenico. La ricerca deve continuare a muoversi nella direzione di semplificare e rendere sempre più affidabili e riproducibili i protocolli di coltura *in vitro* e le tecniche di crioconservazione.

## RINGRAZIAMENTO

L'Autore ringrazia per il contributo al CNR-IVALSA ricevuto nell'ambito del "Trattato internazionale sulle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura - RGV-FAO", programma triennale 2017-2019.

## BIBLIOGRAFIA

Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M.A.L., 1995 – *Glossary*. In: Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Aitken-Christie J., Kozai T. & Smith M.A.L. Eds, Kluwer, Dordrecht, pp. ix-xii.

Benelli C., De Carlo A., Engelmann F., 2013 – *Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis* - Biotechnol Adv., 31: 175-185.

Benson E.E., 1999 – *Cryopreservation*. In: Plant Conservation Biotechnology, Benson E.E. Ed, Taylor & Francis, London, pp. 83-95.

Contaldo C., Tura E., Pancaldi M., Burroni F., Benelli C., De Carlo A., Lambardi M., 2018 – *Nuove tecnologie per la conservazione delle specie da frutto certificate* - Frutticoltura, 10: 8-15.

Corredoira E., San-José M.C., Ballester A., Vieitez A.M., 2004 – *Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut* – CryoLetters, 25: 33-42.

De Carlo A., Lambardi M., Ozudogru E.A., 2011 – *Cryogenic technologies for the long-term storage of Citrus germplasm*. In: Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Yeung E. & Thorpe T.A. Eds, Methods in Molecular Biology, vol. 710, Springer, pp. 185-200.

Engelmann F., 2004 – *Plant cryopreservation: progress and prospects* - In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 40: 427-433.

Fabre J., Dereuddre J., 1990 – *Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of* Solanum *shoot tips* - CryoLetters, 11: 413-126.

FAO, 2010 – *The Second Report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. In: http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/i1500e00.htm.

Forsline P.L., Towill L.E., Waddell J.W., Stushnoff C., Lamboy W.F., McFerson J.R., 1998 – *Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds* - J. Am. Soc. Hort. Sci., 123: 365-370.

Gonzalez-Benito M.E., Perez-Ruiz C., 1992 – *Cryopreservation of* Quercus faginea *embryonic axes* - Cryobiology, 29: 685-690.

Grapin A., Keller E.R.J., Lynch P.T., Panis B., Revilla Bahillo A., Engelmann F., 2011 – *Cryopreservation of crop species in Europe* - COST Action 871-Proceeding of the final meeting. Angers, France, February 8-11, pp. 233. Available: *www.cost.eu/module/download/53639*

KARTHA K.K., LEUNG N.L., MROGINSKI L.A., 1982 – *In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta *Crantz)* - Z. Pflanzenphysiol., 107: 133-140.

KIM H.H., LEE Y.G., SHIN D.J., KO H.C., GWAG J.G., CHO E.G., ENGELMANN F., 2009 – *Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures.* - CryoLetters, 30: 320-334.

KLIMASZEWSKA K., HARGREAVES C., LELU-WALTer M.A., TRONTIN J., 2016 – *Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000*. In: In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Germanà M.A. & Lambardi M. Eds., Humana Press-Springer, New York-Heidelberg-Dordrecht-London, pp. 131-166.

LAMBARDI M., FABBRI A., CACCAVALE A., 2000 – *Cryopreservation of white poplar (*Populus alba *L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips* - Plant Cell Rep., 19: 213-218.

LAMBARDI M., DE CARLO A., 2003 – *Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees*. In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Jain S.M. & Ishii K. Eds., Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, pp. 815-840.

LAMBARDI M., BENELLI C., 2007 – *La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree* - Frutticoltura, 6: 34-39.

LAMBARDI M., HALMAGYI A., BENELLI C., DE CARLO A., VETTORI C., 2007 – *Seed cryopreservation for conservation of ancient* Citrus *germplasm* - Adv. Hort. Sci., 21: 198-202.

LAMBARDI M., DE CARLO A., 2009 – *Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale*. - Italus Hortus, 16(1): 79-98.

LAMBARDI M., BENELLI C., DE CARLO A., OZUDOGRU E.A., PREVIATI A., ELLIS D., 2011 - *Cryopreservation of ancient apple cultivars of Veneto: a comparison between PVS2-vitrification and dormant bud techniques*. - Acta Hort., 908: 191-198.

LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., 2013 - *Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature* - Acta Hort., 988: 29-42.

MATSUMOTO T., SAKAI A., YAMADA K., 1994 - *Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration.* - Plant Cell Rep., 13: 442-446.

MATSUMOTO T., YAMAMOTO S., FUKUI K., RAFIQUE T., ENGELMANN F., NIINO T., 2015 – *Cryopreservation of persimmon shoot tips from dormant buds using the D cryo-plate technique*. - Horticulture Journal, 84: 106-110.

MONTALBÁN I.A., GARCÍA-MENDIGUREN O., MONCALEÁN P., 2016 - *Somatic embryogenesis in* Pinus *spp.* In: In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Germanà M.A. & Lambardi M. Eds., Humana Press-Springer, New York-Heidelberg-Dordrecht-London, pp. 405-416.

MURASHIGE T., 1977 – *Plant cell and organ cultures as horticultural practices*. - Acta Hort., 78: 17-30.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 - *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.* - Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

OZUDOGRU E.A., LAMBARDI M., 2016 – *Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants*. In: In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Germanà M.A. & Lambardi M. Eds., Humana Press-Springer, New York-Heidelberg-Dordrecht-London, pp. 537-550.

PANIS B., LAMBARDI M., 2006 – *Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees).* In: The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources, Ruane J. & Sonnino A. Eds., FAO, Rome, pp. 61-78.

RBG Kew, 2016 – *State of the world's plants* - Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 82.

REDENBAUGH K., 1993 – *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*. - Boca Raton, CRC Press, pp. 481.

SAKAI A., 1960 – *Survival of the twigs of woody plants at – 196 °C* - Nature, 185: 393-394.

SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1990 – *Cryo-preservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis *Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification*. - Plant Cell Rep., 9: 30-33.

SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1991 – *Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis *var. brasiliensis) cooled to -196 °C*. - J. Plant Physiol., 137: 463-470.

SAKAI A., ENGELMANN F., 2007 – *Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review.* - CryoLetters, 28: 151-72.

SAKAI A., HIRAI D., NIINO T., 2008 – *Development of PVS2-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols*. In: Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Reed B. Ed., Springer, Berlin, pp. 33-58.

STANDARDI A., MICHELI M., 2013 – *Encapsulation on* vitro*-derived explants: an innovative tool for nurseries.* In: Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants, Lambardi M., Ozudogru E.A. & Jain S.M. Eds., Humana, Springer, New York, pp. 397–418.

VUJOVIC T., CHATELET P., RUZIC D., ENGELMANN F., 2015 –*Cryopreservation of* Prunus *spp. using aluminium cryo-plates*. - Sci. Hortic., 195: 173-182.

WANG Q.C., PANIS B., ENGELMANN F., LAMBARDI M., VALKONEN J.P.T., 2009 – *Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation*. - Ann. Appl. Biol., 154: 351-363.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 89-93*

# NOTE SU CONSERVAZIONE A BASSE TEMPERATURE DI CEPPI DI ACARI UTILIZZABILI PER IL CONTROLLO BIOLOGICO

SAURO SIMONI[a] - ENRICO DE LILLO[b]

[a] *(CREA-DC) – Centro di ricerca per la Difesa e la Certificazione, Via Lanciola 12/a, 50125, Firenze, Italia;* e-mail: sauro.simoni@crea.gov.it
[b] *Università degli Studi di Bari Aldo Moro – Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.). Via G. Amendola, 165/a, 70126, Bari, Italia;* e-mail: enrico.delillo@uniba.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

## *Notes on the cold storage of Acari applied as Biological Control Agents*

Large debating was about the categorization of insects and mites as regard their responses to cold temperature. The chance to store species or particular strains of insects or mites, as parasitoids or predators, for long time is aimed to guarantee the availability of efficient natural enemies in order to face recrudescent pests or even new ones (alien species or species extending their geographical distribution).

The exposure to cold temperature in outdoor environment as well as in artificial cold storage conditions may reshape behavior and performances of the involved arthropods. Predatory mites of the family Phytoseiidae are important and largely commercialized natural enemies applied against phytophagous pests like mites and small insects. To determine their efficiency in different uses and storage, the low temperature as stressor must be: considered in the pattern of definitions to be evaluated together with the other biological and behavioral traits; quantified to which extent cold susceptibility may affect the biocontrol efficacy.

KEY WORDS: low temperature, IPM, biological control, cold tolerance, phytoseiids.

## INTRODUZIONE

L'introduzione, il potenziamento ed il continuo utilizzo di nemici naturali nel controllo biologico (Biological Control Agents: BCA) degli organismi nocivi riscuotono sempre più attenzione perché sono in grado di elevare la resilienza di un agroecosistema vessato da avversità, biotiche e abiotiche, e sottoposto a pressioni di carattere fitosanitario, fornendo così un indiscutibile vantaggio dal punto di vista economico, della salute umana e dell'impatto ambientale (SIMONI, 2015).

La produzione massale degli organismi antagonisti degli acari e insetti fitofagi è, in qualche modo forzatamente, arbitraria in termini di numero di individui prodotti per intervallo di tempo. La consistenza della produzione può dipendere da esigenze contingenti e impreviste (es.: densità elevate di un determinato fitofago, particolari andamenti climatici). Il mantenimento nel lungo periodo di determinati BCA è fondamentale per soddisfare un'esigenza di aumentare la popolazione di un allevamento specifico, all'occorrenza necessario, che fornisca una congrua disponibilità del BCA necessario.

Oltre alle esigenze strumentali del processo industriale necessarie nel breve periodo con tutte le logistiche e i requisiti associati per tale produzione (materiali di produzione e confezionamento, specie antagonista prodotta, ingredienti per la dieta artificiale, continua manutenzione di impianti e attrezzature, distribuzione del materiale con modalità spesso dispendiose), si impone l'esigenza di mantenere attive nel medio-lungo termine linee di allevamento senza decremento delle caratteristiche qualitative del BCA con particolare riguardo all'efficienza predatoria, al tasso di fertilità e alla bassa mortalità durante l'allevamento.

La conservazione a temperature basse (prossime a 0°C) e ultrabasse (decine di gradi <0°C) dei BCA rappresenta una delle sfide e delle strategie più importanti utilizzate per facilitare il mantenimento, la produzione di massa e la loro applicazione per il controllo biologico e il controllo integrato dei fitofagi (GLENISTER e HOFFMAN, 1998; VAN LENTEREN, 2003). La conservazione a breve termine può aiutare il produttore a bilanciare le differenze momentanee tra l'offerta e la richiesta di BCA; lo stoccaggio a lungo termine può consentire il ripristino di un allevamento di tipo stagionale. In entrambi i casi, si ridurrebbero i costi di produzione. Una conservazione dei BCA a bassa temperatura potrebbe consentire (1) un prolungamento della loro longevità riducendo il tasso metabolico dell'organismo allevato, (2) una spedizione di BCA a

– Pubblicato marzo 2019

lunga distanza riducendo la mortalità per inedia, (3) una sincronizzazione delle abbondanze dell'antagonista e della preda/ospite (MORALES-RAMOS *et al.*, 2014).

La temperatura corporea degli artropodi, in quanto pecilotermi, fluttua direttamente con quella ambientale, rendendo questi organismi sensibili ai cambiamenti del clima locale (POWELL e LOGAN, 2005) anche se naturalmente capaci di resistere o adattarsi a condizioni critiche. Lo studio della resistenza al freddo di un BCA è un utile esercizio per fornire indicazione di come l'organismo possa sopravvivere in condizioni critiche che potrebbero essere applicate durante la conservazione a bassa temperatura e rispetto a un clima che potrebbe agire come fattore limitante indipendente, però, dall'influenza che potrebbe esercitare sull'incremento di densità della popolazione (BALE, 1991).

## NOTE SULLA SUSCETTIBILITÀ ALLA BASSA TEMPERATURA DEGLI ARTROPODI

Per insetti ed acari, in modo affine, il fabbisogno termico è spesso modellizzato facendo riferimento alla temperatura giornaliera minima e massima (ALLEN, 1976). La resistenza al freddo, frequentemente espressa con l'indicazione di soglie numeriche, è la combinazione delle caratteristiche fisiologiche necessarie per evitare gli effetti dannosi sull'organismo delle basse temperature sperimentate, ad esempio, durante l'inverno (BALE, 1987).

Va riconosciuto come si sia sviluppato un notevole dibattito su quelle che sono le categorie cui ascrivere i vari organismi in base alla risposta alle basse temperature. La ricerca sulla tolleranza al freddo di insetti e acari e sulla possibilità di sfruttare temperature basse e ultrabasse per la conservazione di questi organismi e la loro successiva applicazione si è alimentata negli ultimi decenni di contributi e tentativi di standardizzazione delle definizioni. Tali ricerche hanno individuato convenzionalmente due strategie di sopravvivenza a freddo: (1) resistenza al congelamento, in genere rappresentata dalla temperatura limite sottozero a cui gli organismi sopravvivono e non si verifica la formazione di cristalli di ghiaccio nel loro corpo e (2) tolleranza al congelamento, rappresentata dalla temperatura limite sotto zero a cui gli organismi sopravvivono resistendo alla formazione di ghiaccio nel loro corpo (LEE, 1991; BALE, 2002).

Questo paradigma ha costituito il quadro entro il quale si sono sviluppati un numero di studi comparativi e su singole specie (ad esempio, quelli rivisti da LEE, 1991), in cui il punto di sovraraffreddamento (supercooling SCP: la temperatura alla quale un animale si congela) è stato enfatizzato come indicatore di "strategia", di temperatura inferiore letale e, di fatto, di resistenza al freddo (BAUST e ROJAS, 1985). La riflessione avanzata da BAUST e ROJAS (1985) del SCP come misura fenomenologica e una successiva valutazione di BALE (1987) hanno portato a un maggiore scetticismo sulla dicotomia di tolleranza/intolleranza al congelamento come unico descrittore della resistenza. Da questo processo ne è derivato che SCP non era necessariamente correlato alla resistenza alla bassa temperatura in quegli animali che erano intolleranti al congelamento (BALE, 1993). La resistenza al freddo veniva definita come caratteristica degli organismi *in continuum* proponendo una nuova categorizzazione della tolleranza al freddo degli insetti, passando dal meno al più resistente al freddo, in base alla condizione a cui si verifica la loro morte (BALE, 1996), secondo il seguente ordine: *opportunistic,* specie opportunistiche che non possono entrare in uno stato inattivo e soccombono quando le temperature sono troppo basse per mantenere il normale metabolismo; *chill-susceptible*, specie sensibili al freddo che muoiono dopo un breve periodo di raffreddamento a temperature più o meno marcatamente sotto lo zero; *chill-tolerant*, specie altamente o moderatamente resistenti che muoiono dopo un raffreddamento prolungato a temperature sotto lo zero; *freeze-avoiding*, specie che possono anche sopravvivere per periodi discreti al di sotto del punto di sovrafusione ma soccombono al proprio punto di SCP; *freeze-tolerant,* le specie di insetti tolleranti al congelamento e che possono sopravvivere alla formazione di ghiaccio nei loro tessuti.

La citata classificazione è stata oggetto di discussione da parte di SINCLAIR (1999) il quale, basandosi sulla relazione tra punto di congelamento SCP e temperatura letale inferiore (*lower lethal temperature LLT*), ha argomentato (1) che la tolleranza al congelamento non è una parte di un continuum ma piuttosto una strategia distinta, parallela e, quindi, alternativa e messa in atto da quegli insetti che non possono sopravvivere al congelamento; (2) che all'interno della tolleranza al congelamento vi sono gruppi che rappresentano diverse tolleranze ambientali e forniscono focolai utili per la ricerca comparativa; (3) che questa visione può essere integrata nella descrizione di BALE (1996) della categoria *freeze-avoidance* (Fig. 1).

## NOTE SULLA SUSCETTIBILITÀ DEGLI ACARI ALLA BASSA TEMPERATURA

Lo studio di ZHAO e AMRINE (1997) ha evidenziato come gli acari, in particolare i fitofagi eriofidi e tenuipalpidi, raccolti in seguito a precipitazioni nevose, oltre a essere potenzialmente trasportati a lunga distanza nell'atmosfera, riescano a resistere presumibilmente a temperature bassissime nelle nuvole in quota (Tab. 1). Già precedentemente, SLYKHUIS

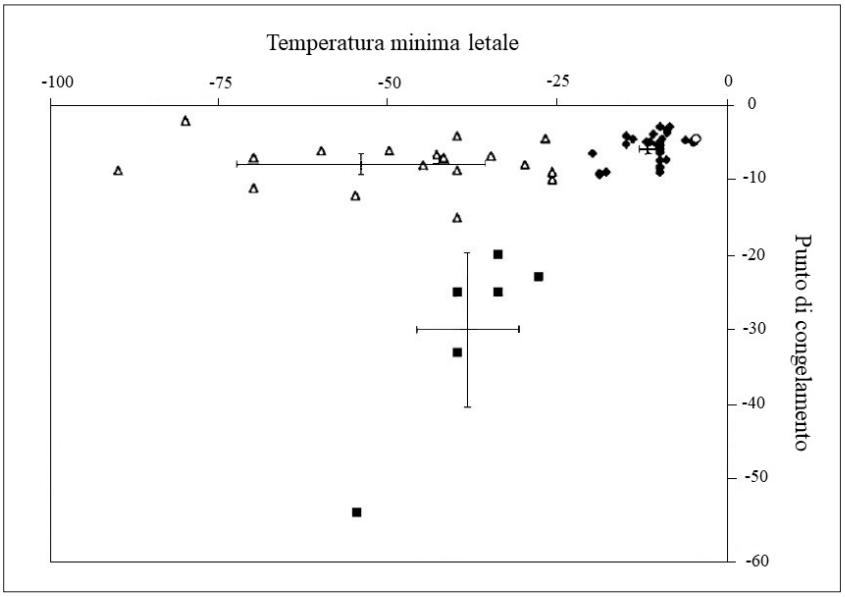



Fig. 1 – Relazione tra punto di congelamento e temperatura minima letale per 53 specie di insetti tolleranti al freddo. I gruppi sono stati definiti a priori quali: ○ = parzialmente tolleranti; ◆ = moderatamente tolleranti; △ = altamente tolleranti; ■ = tolleranti con basso punto di congelamento. (Modificato da SINCLAIR, 1999).

*Tabella 1* – Screening e distribuzione degli acari reperiti nel materiale nevoso caduto in West Virginia (modificato da ZHAO e AMRINE, 1997).

| **Taxa** | Numero di specie | Numero di individui | **Taxa** | Numero di specie | Numero di individui |
|---|---|---|---|---|---|
| **Phytoptidae** | | | **Mesostigmata** | | |
| *Trisetacus* | 1 | 1 | Phytoseiidae | 2 | 2 |
| *Nalepella* | 2 | 3 | | | |
| | | | **Prostigmata** | | |
| **Eriophyidae** | | | Anystidae | 1 | 1 |
| *Abacarus* | 1 | 1 | Cheyletidae | 1 | 3 |
| *Acarelliptus* | 1 | 6 | Tarsonemidae | 4 | 43 |
| *Aceria* | 4 | 5 | Tetranychidae | 4 | 4 |
| *Aculops* | 1 | 1 | Tydeidae | 4 | 3 |
| *Aculus* | 13 | 17 | | | |
| *Anthocoptes* | 3 | 5 | **Astigmata** | | |
| *Cecidophyes* | 1 | 1 | Chaetodactylidae | 1 | 1 |
| *Epitrimerus* | 5 | 5 | Glycyphagidae | 2 | 4 |
| *Neorhynacus* | 1 | 1 | Saproglyphidae | 1 | 1 |
| *Phyllocoptes* | 1 | 3 | Sarcoptidae | 1 | 1 |
| *Tetra* | 6 | 9 | | | |
| *Vasates* | 11 | 29 | **Cryptostigmata** | 9 | 12 |

(1955) aveva osservato una rilevante tolleranza di *Aceria tulipae* al freddo in quanto questo eriofide era risultato capace di sopravvivere su piante test per 1 giorno a -20°C e 8 giorni a -10°C.

L'approccio biomolecolare di XU *et al.* (2018), avente come modello l'acaro fitoseide *Neoseiulus barkeri* (Hughes), ha consentito di esplorare l'espressione di quattro geni codificanti proteine dello shock termico in un ceppo convenzionale e in un ceppo adattato alle alte temperature. Il cDNA di questi quattro geni è stato clonato e caratterizzato. L'espressione di questi geni è stata indagata con l'esposizione delle popolazioni a stress da caldo e da freddo di breve durata. I risultati hanno evidenziato che l'acclimatazione alla temperatura ambientale, pur modellando parzialmente la variabilità intraspecifica delle risposte alle variazioni termiche (ZHANG *et al.*, 2018), riduce la tolleranza al freddo negli acari adattati alle alte temperature. Ne deriva una diversità nella tolleranza al freddo tra i due ceppi di *N. barkeri* saggiati e suggerisce di considerare questo aspetto nella selezione delle popolazioni da destinare alla commercializzazione per il controllo biologico dei fitofagi in condizioni climatiche più favorevoli a una o all'altra popolazione.

## PROSPETTIVE DI UTILIZZO DI CEPPI SELEZIONATI DI FITOSEIDI

I modelli di fenologia degli insetti e degli acari dipendenti dalla temperatura consentono di esaminare il suo impatto sulle distribuzioni geografiche, sulla dinamica della popolazione e loro gestione, sulla vitalità in prossimità della soglie termiche. La misu-

razione della risposta dello sviluppo, della sopravvivenza e della riproduzione degli insetti e degli acari alla temperatura è stata sovente riportata in contesti di ampia variabilità e non in condizioni di massima verosimiglianza: ad esempio, si riportano evidenze derivanti da individui che passano solo una parte del loro sviluppo ad una temperatura estrema (vicino alla soglia) e vengono quindi posti in condizioni ottimali per completare il loro sviluppo con un più alto tasso di sopravvivenza. La resistenza a un veloce raffreddamento (*Rapid cold hardening*, RCH) può essere indotta attraverso una breve esposizione, da minuti a poche ore, a condizioni di stress subletale quali alte e basse temperature o perdita di contenuto idrico (Broufas e Koveos, 2001; Khodayari *et al.*, 2013). La protezione dell'organismo è normalmente associata alla produzione di sostanze a funzione protettiva quali glicerolo e alla modifica della permeabilità di membrana (Bryon *et al.*, 2017). La protezione acquisita durante la fase RCH viene rapidamente perduta con il ritorno alle normali condizioni ambientali (Lee e Denlinger, 2010) e, se non vi è una stagione particolarmente rigida, può essere ristretta a uno specifico stadio di sviluppo (Lee, 1991). È da auspicare un approccio che renda possibile lo sviluppo di studi basati sulla fenologia comprensiva e sull'uso integrale delle informazioni disponibili che aiuteranno lo sviluppo di potenti strumenti per analizzare il comportamento di una popolazione di insetti, a partire dalle loro pullulazioni, e la risposta ai cambiamenti climatici (Régnière *et al.*, 2012)

Date le caratteristiche biologiche dei fitoseidi, per plasticità biologica e adattabilità ambientale, e il loro sempre più marcato interesse commerciale e largo impiego nella difesa delle colture (McMurtry *et al.*, 2015), si ritiene di significativa utilità approfondire e possibilmente definire nel modo più oggettivo possibile il rapporto di questi predatori rispetto a temperature basse, ultrabasse e cadute termiche repentine, oltre agli altri studi finalizzati alla loro caratterizzazione biologica ed ecologica. Nel caso dei fitoseidi sembra opportuno identificate le potenzialità e i feedback delle specie commercializzate o potenzialmente tali rispetto alle condizioni termiche meno favorevoli per rispondere alla duplice aspettativa di disporre di un allevamento che possa perdurare nel tempo e di ottenere un predatore efficiente a copertura anche di condizioni estreme di temperatura. In questo contesto, appare fondamentale anche la capacità delle specie di fitoseidi di "riconoscere" gli indizi delle condizioni invernali in arrivo ed entrare nello stato ipometabolico di diapausa per aumentare la probabilità di sopravvivenza. Per prevenire lo stabilimento al di fuori della serra, è necessario esaminare la fisiologia degli agenti di controllo biologico candidati per poter sopravvivere alle tipiche condizioni invernali. Se la specie incontra temperature al di sopra della soglia di sviluppo durante l'inverno, il ciclo di vita può essere completato, nuove generazioni sopravvivere e mantenersi per lungo periodo (Hatherly *et al.*, 2005).

Parallelamente, si è verificato come la tolleranza al freddo, combinandosi alla estensione delle isoterme degli areali geografici, sia uno dei fattori più rilevanti nel determinare la diffusione dei fitofagi più importanti, sia nel caso di specie aliene che nel caso di specie residenti che modificano la loro area di presidio (Zhao e Amrine, 1999; White *et al.*, 2018) rappresentando causa di nuove emergenze fitosanitarie. Prendendo come esempio *Tetranychus urticae* Koch, acaro fitofago divenuto altamente invasivo e dannoso per l'agricoltura, si può affermare che sono stati e tuttora sono approfonditi l'abilità dell'acaro di sviluppare resistenza ai pesticidi, la sua risposta alle tossine delle piante, le modifiche nella gamma di piante ospiti e la differenziazione genetica tra le popolazioni (Navajas *et al*., 2000; van Leeuwen *et al.*, 2010; Dermauw *et al.*, 2013). Al contrario, la biologia termica di questa specie è meno ben caratterizzata, anche se ugualmente importante, perché, in regioni temperate, le temperature invernali possono essere considerate come uno dei fattori più importanti che influenzano il potenziale di adattamento degli artropodi e la conseguente adozione di antagonisti efficienti (Van Lenteren *et al.,* 2006).

## BIBLIOGRAFIA


Allen, J. C. 1976 – *A modified sine wave method for calculating degree days*. - Environ. Entomol., 5: 388-396.

Bale J. S., 1987 – *Insect cold hardiness: freezing and supercooling: an ecophysiological perspective*. - J. Insect Physiol., 33: 899-908.

Bale, J.S. 1991 – *Insects at low temperature: A predictable relationship?* - Funct. Ecol., 5: 291-298.

Bale, J.S. 1993 – *Classes of insect cold hardiness*. - Funct. Ecol., 7: 751-753.

Bale, J.S. 1996 – *Insect cold hardiness: A matter of life and death.* - Eur. J. Entomol., 93: 369-382.

Bale J.S., 2002 – *Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance.* - Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 357(1423): 849-862.

Baust J.G., Rojas R.R., 1985 – *Insect cold hardiness: Facts and fancy*. - J. Insect Physiol., 31: 755-759.

Broufas G.D., Koveos D.S., 2001 – *Rapid cold hardening in the predatory mite* Euseius (Amblyseius) finlandicus *(Acari: Phytoseiidae)*. - J. Insect Physiol., 47(7): 699-708.

Bryon A., Kurlovs Andre H., Van Leeuwen T., Clark R.M., 2017 – *A molecular-genetic understanding of diapause in spider mites: current knowledge and future directions*. – Physiol. Entomol., 42: 211-224.

Dermauw W., Wybouw N., Rombauts S., Menten B., Vontas J., Grbic M., Clark R.M., Feyereisen R., Van Leeuwen T., 2013 – *A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider* Tetranychus urticae. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - DOI: 10.1073/pnas.1213214110

Glenister C.S., Hoffmann M.P., 1998 – *Mass-reared natural enemies: scientific, technological, and informational needs and considerations*. In: R.L. Ridgway, M.P. Hoffmann, M.N. Inscoe and C.S. Glenister (eds), Mass Reared Natural Enemies: Application, Regulation, and Needs. Proceedings: Thomas Say Publications in Entomology, Entomol. Soc. America. Lanham, MD.:242-267.

HATHERLY I.S., BALE J.S., WALTERS K.F.A., 2005 – *U.K. winter egg survival in the field and laboratory diapause of* Typhlodromips montdorensis. - Physiol. Entomol., 30(1): 87-91.

KHODAYARI S., MOHARRAMIPOUR S., LARVOR V., HIDALGO K., RENAULT D., 2013 – *Deciphering the Metabolic Changes Associated with Diapause Syndrome and Cold Acclimation in the Two-Spotted Spider Mite* Tetranychus urticae. – PLOS One, 8: e54025. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054025

LEE R.E., 1991 – *Principles of Insect Low Temperature Tolerance*. In: Insects at Low Temperature, Lee R.E. & Denlinger D.L. (eds), Springer, Boston, MA.

LEE R.E., DENLINGER D.L., 2010 – *Rapid cold-hardening: ecological significance and underpinning mechanisms*. In: Low Temperature Biology of Insects, Denlinger D.L. & Lee R.E. (eds), Cambridge: Cambridge University Press, pp. 35-58.

MCMURTRY J.A., SOURASSOU N.F., DEMITE P.R., 2015 – *The Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) as Biological Control Agents*. In: Series Progress in Biological Control - Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms. Carrillo D., de Moraes G. J., Peña J. E. (eds), Springer International Publishing, 19: 133-149.

MORALES-RAMOS J.A., GUADALUPE ROJAS M., SHAPIRO-ILAN D.I., 2014 – *Mass Production of Beneficial Organisms, Invertebrates and Entomopathogens*. Publisher: Academic Press Editor: J.A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, and D.I. Shapiro Ilan (eds) ISBN: 978-0-12-391453-8

NAVAJAS M., TSAGKARAKOV A., LAGNEL J., PERROT-MINNOT M.J., 2000 – *Genetic differentiation in* Tetranychus urticae *(Acari: Tetranychidae): polymorphism, host races or sibling species? –* Exp. Appl. Acarol., 24: 365-376.

POWELL J.A., LOGAN J.A., 2005 – *Insect seasonality - circle map analysis of temperature-driven life cycles.* - Theor. Popul. Biol., 67:161-179.

RÉGNIÈRE J., POWELL J., BENTZ B., NEALIS V., 2012 – *Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling*. - J. Insect Physiol., 58(5): 634-647.

SIMONI, S., 2015 – *I fitoseidi, acari predatori: life style types e prospettive nel controllo di acari fitofagi*. - Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Anno LXIII, 2015: 123-130.

SINCLAIR B.J., 1999 – *Insect cold tolerance: How many kinds of frozen?* - Eur. J. Entomol., 96: 157-164.

SINCLAIR B.J., COELLO ALVARADO L.E., FERGUSON L.V., 2015 – *An invitation to measure insect cold tolerance: Methods, approaches, and workflow*. - J. Therm. Biol., 53: 180-197.

SLYKHUIS J.T., 1955 – Aceria tulipae *in relation to the spread of wheat streak mosaic*. - Phytopathol. 45: 116-128.

VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., DERMAUW W., TIRRY L., 2010 – *Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite* Tetranychus urticae *and other important Acari: a review*. - Insect Biochem. Molec., 40: 563-572.

VAN LENTEREN J.C., 2003 – *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*. - Wallingford, UK: CAB Int. 327 pp.

VAN LENTEREN J.C., BALE J.S., BIGLER E., HOKKANEN H.M.T., LOOMANS A.J.M., 2006 – *Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests.* - Ann. Rev. Entomol., 51: 609-634.

WHITE N., BALE J.S., HAYWARD S.A.L., 2018 – *Life-history changes in the cold tolerance of the two-spot spider mite* Tetranychus urticae: *applications in pest control and establishment risk assessment*. - Physiol. Entomol., 43: 334-345.

XU Y.-J., LIU L., YANG Y., WANG X., TIAN C.-B., LI Y.-Y., CHEN H.-Q., LIU H., 2018 – *Identification of four heat shock protein genes and their expression in response to thermal stress in two strains of* Neoseiulus barkeri *(Acari: Phytoseiidae)*. - Syst. Appl. Acarol., 23(4): 665-680.

ZHANG G.-H., LI Y.-Y., TIAN C.-B., XU Y.-J, ZHOU H.-W., HUANG J., WANG J.-J., LIU H., 2018 – *Intraspecific variations on thermal susceptibility in the predatory mite* Neoseiulus barkeri *Hughes (Acari: Phytoseiidae): Responding to long-term heat acclimations and frequent heat hardenings.* - Biol. Control, 121: 208-215.

ZHAO S., AMRINE J.W., 1997 – *Investigation of snowborne mites (Acari) and relevancy to dispersal*. - Int. J. Acarol., 23: 209-213.

94 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 95-98*

# TECNICHE PER LA CRIOCONSERVAZIONE DI MICRORGANISMI ENTOMOPATOGENI

GIAN PAOLO BARZANTI[a] - VALERIA FRANCARDI[a]

[a] *CREA – Centro di ricerca Difesa e Certificazione, via Lanciola 12/a, 50125 Firenze, Italy*; E-mail: gianpaolo.barzanti@crea.gov.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

*Cryopreservation techniques for entomopathogenic micro-organisms.*

The possibility of a long-term storage able to preserve the original characteristics of every isolate is necessary for studies on entomopathogenic fungi and for their possible use in field trials. In this paper, the most commonly used methods are presented together with a brief pros and cons discussion and some published examples. Results from a study on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* carried over at the Research Centre for Plant Protection and Certification of Firenze (CREA) are also reported and discussed.

KEY WORDS: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, long-term storage, metabolism.

## INTRODUZIONE

Ogni serio studio micologico presuppone la disponibilità di colture fungine vitali e con caratteristiche costanti nel tempo. Ciò è particolarmente vero per gli studi che riguardano i funghi entomopatogeni con i quali si cerca di ottenere un controllo di tipo biologico dei tanti insetti dannosi alle colture agricole e alle piante in generale. Nel caso poi di isolati che risultino particolarmente interessanti, è necessario prevedere, per studi ed eventuali applicazioni future, una possibilità di conservazione a lungo termine tale da preservare la vitalità, la purezza e le caratteristiche morfo-fisiologiche e genetiche dell'esemplare. Questo problema è stato affrontato in molti modi diversi, ognuno con i suoi punti di forza e di debolezza. Non esistono quindi metodi universali per la conservazione a lungo termine delle colture fungine e dato che è praticamente impossibile escludere completamente la possibilità di causare danni collaterali indesiderati alle colture stesse, è sempre necessario bilanciare i vantaggi e gli svantaggi dei differenti metodi. Per queste ragioni è anche sempre consigliabile prevedere più di un metodo di conservazione per i propri isolati. Queste problematiche si pongono in modo particolarmente pressante per coloro che si trovano a gestire collezioni piuttosto consistenti di microrganismi (OLIVEIRA *et al*., 2011; HUMBER, 2012; HOMOLKA, 2013; AYALA-ZERMENO *et al*., 2017).

Da principio le collezioni fungine venivano mantenute attraverso successivi trasferimenti delle colonie da un substrato nutritivo esaurito ad uno più fresco: è un metodo ancora usato, soprattutto in certe condizioni, ma sicuramente richiede molto tempo, presenta alti rischi di contaminazione delle colture e non garantisce contro modificazioni genetiche e fisiologiche (degenerazione, invecchiamento) nel caso di trasferimenti frequenti e protratti nel tempo (HOMOLKA, 2013). Nel 1939 Castellani propose di conservare i funghi in acqua distillata sterile: da quel momento in poi molti metodi sono stati studiati, proposti e migliorati nel tempo (PASARELL e MCGINNIS, 1992). Secondo GALLO *et al*. (2008), questi possono essere suddivisi in due gruppi a seconda che il metabolismo dei microrganismi venga mantenuto, almeno parzialmente, attivo o che risulti più o meno completamente sospeso.

A parte il trasferimento di sotto-colture su substrato agarizzato, di cui si è già detto, al primo gruppo appartengono i metodi di che si basano sulla conservazione in acqua sterile, sotto uno strato di olio minerale, a basse temperature (5-8°C) o sul congelamento (-20°C).

La sospensione del metabolismo degli isolati fungini può essere invece ottenuta tramite essiccazione su gel di silice, liofilizzazione, conservazione a ultrabasse temperature in congelatori meccanici (-70/-80°C) o in azoto liquido (-196°C). Secondo il recentissimo lavoro di AYALA-ZERMENO *et al.* (2017), i metodi appartenenti a questo secondo gruppo sono i migliori per la conservazione a lungo termine dei funghi entomopatogeni, ma i risultati possono variare a seconda dell'uso o meno di crioprotettivi, del loro

– Pubblicato marzo 2019

tipo e, in generale, del protocollo utilizzato. Come crioprotettivi possono essere utilizzati sia agenti penetranti, che attraversano rapidamente la membrana cellulare e proteggono le cellule dall'interno e dall'esterno (glicerolo, dimetil-sulfossido DMSO), sia agenti non penetranti, che proteggono le cellule restando all'esterno della membrana cellulare (saccarosio, lattosio, glucosio e altri). Per i funghi, i più efficaci sembrano essere glicerolo e DMSO (Nakasone *et al*., 2004).

Tutti questi metodi si sono rivelati capaci di mantenere vitali le colture per uno o più anni senza ricorrere a continui trasferimenti: i problemi sorgono con l'innata variabilità di alcuni dei microrganismi che si vogliono conservare (non tutti gli esemplari di una stessa specie rispondono allo stesso modo) e con la eventuale modificazione delle iniziali caratteristiche fisiologiche e genetiche (Pasarell e McGinnis, 1992).

Come già accennato, vari sono i parametri che si possono testare per verificare l'efficacia di un metodo di conservazione delle colture fungine. Il primo, e il più ovvio, è la vitalità, ma non è certo sufficiente a stabilire il successo di un dato procedimento. Fondamentale è il mantenimento delle caratteristiche genetiche e fisiologiche come crescita, morfologia e produzione di metaboliti (Homolka, 2013). Per valutare l'insorgenza di possibili alterazioni genetiche su basidiomiceti e funghi micorrizici, Voyron *et al*. (2009) e Lalaymia *et al*. (2013) hanno utilizzato la tecnica AFLP (amplified fragment length polymorphisms), mentre con *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, Ryan *et al*. (2001) si sono basati sulle ISSRs (inter-simple sequence repeats). Markers AFLP sono stati utilizzati anche da Ayala-Zermeno *et al*. (2017) per valutare la stabilità genetica post-conservazione di altre sei specie di funghi entomopatogeni. In altri casi, su funghi commestibili (Singh *et al*., 2004), sono stati confrontati i profili RAPD (random amplified polymorphic DNA) e ITS (internal transcribed spacer) pre- e post-conservazione. Secondo Homolka (2013), però, per individuare piccolissime (anche puntuali) ma importanti mutazioni è necessario ricorrere al sequenziamento (Homolka *et al*., 2010). Nel caso dei funghi entomopatogeni, è molto importante verificare il mantenimento delle caratteristiche di patogenicità dei singoli isolati, ma non sono molti gli studi riguardanti questo aspetto: Marques *et al*. (2000) hanno verificato il mantenimento della virulenza di un isolato di *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin fino a 80 mesi di conservazione a -7°C; Ryan *et al*. (2001) hanno verificato gli effetti di liofilizzazione e crioconservazione di *M. anisopliae* e altri funghi sulla produzione di metaboliti secondari e di enzimi extra-cellulari; Toegel *et al*. (2010) hanno studiato l'effetto della liofilizzazione sulla produzione di metaboliti secondari come destrusina A e B e oosporeina in *B. brognartii* (Sacc.) Petch e *M. anisopliae*.

Seguendo questo filone d'indagine, presso il nostro Centro (dove è conservata una collezione di quasi 500 isolati fungini in massima parte entomopatogeni) sono stati studiati gli effetti di crioconservazione e liofilizzazione nei confronti di *B. bassiana* e *M. anisopliae*. In particolare è stata presa in considerazione la capacità patogenica nei confronti di larve di *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e l'attività enzimatica delle proteasi totali, e delle proteasi Pr1 (proteasi di tipo "subtilisina") e Pr2 (proteasi di tipo "trypsina") che sembrano svolgere un ruolo molto importante nella fase di penetrazione della cuticola dell'insetto ospite (Gillespie *et al*., 1998; Shah *et al*., 2005).

## UN CASO PRATICO

### Materiali e metodi

Il nostro studio (Cito *et al*., 2015) ha interessato tre isolati di *B. bassiana* (B 13/I03, B 13/I57,

B 13/I63) e tre di *M. anisopliae* (M 13/I05, M 13/I12, M 13/I33) ottenuti da larve, pupe e adulti di *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae), il punteruolo rosso delle palme, raccolti in Toscana e Sicilia nel corso del 2013. Gli isolati sono stati purificati, messi in coltura su substrato agarizzato e identificati tramite sequenziamento della regione ITS (internal transcribed spacer, primer universali ITS1 e ITS4).

Prima di sottoporre gli isolati a crioconservazione e liofilizzazione, sono state analizzate alcune caratteristiche morfo-fisiologiche (crescita radiale delle colonie, produzione conidica e loro germinabilità) e l'attività enzimatica (proteasi totali, Pr1 e Pr2). Sono stati anche eseguiti dei saggi di entomopatogenicità nei confronti di larve di *T. molitor*, classico insetto test da laboratorio.

Contemporaneamente, tasselli prelevati dalle stesse colonie utilizzate per le analisi suddette sono stati sottoposti alle procedure di conservazione. Per la crioconservazione, singoli tasselli di colonia fungina sono stati posti in criotubi da 1,5 ml contenenti una soluzione sterile di glicerolo al 10% in acqua e trasferiti in freezer a -80°C. Per la liofilizzazione, invece, i singoli tasselli sono stati posti in provette tipo "eppendorf" da 1,5 ml, messi in congelatore a -20°C per 24 h, liofilizzati e nuovamente trasferiti a -20°C. Dopo 7 mesi, le colture sottoposte a crioconservazione e liofilizzazione sono state rivitalizzate trasferendole in incubatore a 25°C, al buio, su substrato agarizzato

fresco. Dopo 15 giorni di incubazione sono state nuovamente valutate la crescita radiale, la produzione di conidi e la loro germinabilità, così come sono stati ripetuti i saggi sull'attività enzimatica e le prove di entomopatogenicità su larve di *T. molitor*.

## Risultati

Per quanto riguarda gli aspetti morfologici, i 7 mesi di conservazione con le due differenti tecniche non hanno portato a significative variazioni dei parametri (Tabella 1). L'attività enzimatica delle proteasi totali ha avuto un calo significativo solo in due isolati di *B. bassiana* (B 13/I57 e B 13/I63) sottoposti a crioconservazione (Figura 1.1). Escludendo l'isolato di *M. anisopliae* M 13/I05 sottoposto a liofilizzazione, in tutti gli altri casi si è avuta una riduzione significativa dell'attività enzimatica di Pr1 a seguito del periodo di conservazione alle condizioni testate (Figura 1.2). Lo stesso discorso vale per l'attività enzimatica di Pr2 con la sola esclusione, anche in questo caso, dell'isolato M 13/I05 sottoposto a liofilizzazione (Figura 1.3). Riguardo ai saggi di entomopatogenicità, le percentuali di mortalità a 20 giorni causate dai vari isolati hanno mostrato un calo significativo solo nel caso dell'isolato di *B. bassiana* B13/I63 sottoposto sia a crioconservazione che a liofilizzazione (Tabella 2).

## Discussione e conclusioni

In conclusione, il nostro studio ha messo in evidenza come i due metodi di saggiati siano risultati, in generale, entrambi validi per la conservazione di *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Infatti, pur registrando un calo nelle attività enzimatiche di Pr1 e Pr2, gli isolati utilizzati nelle prove hanno mantenuto le proprie caratteristiche morfo-fisiologiche e, con l'eccezione di un isolato di *Beauveria*, le proprie capacità entomopatogene. I nostri risultati confermano, a questo proposito, anche la presenza di variabilità intraspecifica riguardo alla capacità di ogni isolato di reagire allo stress dovuto al processo di conservazione e la necessità quindi di valutarne l'esito caso per caso. Nonostante Pr1 e Pr2 siano risultati, in studi precedenti (Gillespie *et al*., 1998), enzimi importanti nel processo di pene-

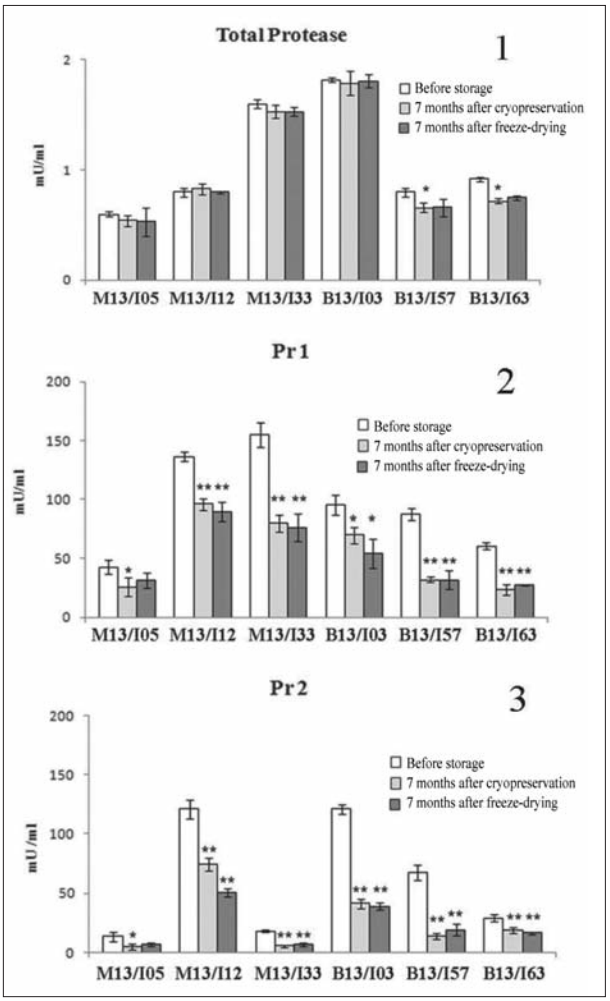



Figura 1 – Attività enzimatica delle proteasi totali (1), Pr1 (2) e Pr2 (3).
Ogni valore riportato rappresenta la media (media ± deviazione standard) di tre replicati. Significatività statistica: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

*Tabella 1* – Crescita radiale delle colonie, produzione conidica e tasso di germinabilità degli isolati di *B. bassiana* e *M. anisopliae* valutati prima e dopo i sette mesi di conservazione con i due differenti metodi.

| Fungal strains | Daily Radial Growth (mm/day$^{-1}$) | | | Conidia Production (number of conidia/mL$^{-1}$) | | | Germination rate (%)* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Before storage | Cryo. | Freeze-drying | Before storage | Cryo. | Freeze-drying | Before storage | Cryo. | Freeze-drying |
| M 13/I05 | 1.8 ± 0.1 | 2.1 ± 0.1 | 2.1 ± 0.1 | 2.7 ± 1.4 | 2.4 ± 1 | 2.6 ± 1.3 | 96 ± 2.2 | 93 ± 5.2 | 98 ± 1.1 |
| M 13/I12 | 2.0 ± 0.6 | 2.1 ± 0.1 | 2.2 ± 0.1 | 1.6 ± 0.2 | 1.3 ± 0.4 | 1.5 ± 0.4 | 98 ± 5.9 | 99 ± 0.8 | 99 ± 0.1 |
| M 13/I33 | 1.8 ± 0.7 | 2.1 ± 0.1 | 2.2 ± 0.1 | 2.7 ± 0.4 | 2.6 ± 1.4 | 2.6 ± 1.6 | 98 ± 3.1 | 99 ± 0.4 | 98 ± 2.2 |
| B 13/I03 | 2.0 ± 0.2 | 1.9 ± 0.3 | 1.8 ± 0.5 | 1.7 ± 0.7 | 1.6 ± 0.8 | 1.4 ± 0.3 | 97 ± 1.1 | 98 ± 0.9 | 97 ± 1.1 |
| B 13/I57 | 1.9 ± 0.4 | 1.8 ± 0.2 | 2.2 ± 0.2 | 2.4 ± 0.5 | 2.3 ± 0.9 | 2.6 ± 0.2 | 98 ± 1.9 | 99 ± 0.4 | 99 ± 0.3 |
| B 13/I63 | 1.8 ± 0.1 | 2.1 ± 0.3 | 1.9 ± 0.4 | 3.0 ± 0.7 | 2.5 ± 0.5 | 2.4 ± 1.2 | 99 ± 1.1 | 99 ± 0.5 | 99 ± 0.8 |

*data were processed after Arcsin transformation

*Tabella 2* – Risultati delle prove contro le larve di *Tenebrio molitor*.

| Fungal strains | Mortality 20 days after inoculation (%)[a] | | |
|---|---|---|---|
| | Before storage | 7 months after cryopreservation | 7 months after freeze-drying |
| M 13/I05 | 95 | 95 | 99 |
| M 13/I12 | 98 | 93 | 85 |
| M 13/I33 | 98 | 90 | 88 |
| B 13/I03 | 77 | 70 | 68 |
| B 13/I57 | 80 | 75 | 70 |
| B 13/I63 | 98 | 65** | 55** |

[a] data were processed after Arcsin transformation.
Statistical significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

trazione all'interno dell'ospite da parte di *M. anisopliae*, nel nostro caso, la riduzione della loro attività conseguente al periodo di conservazione non sembra avere avuto influenza sulla capacità di aggressione degli isolati saggiati. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'entomopatogenicità di *B. bassiana* e *M. anisopliae* sia un fenomeno complesso che coinvolge diversi meccanismi e che sebbene le proteasi capaci di degradare la cuticola, specialmente Pr1 e Pr2, siano importanti fattori di virulenza, non siano quelli predominanti. Al contrario, l'attività delle proteasi totali è in generale ben conservata indipendentemente dall'isolato e dal metodo di conservazione considerato. Va però tenuto conto del fatto che in due isolati di *Beauveria* (B 13/I57 e B 13/I63) la crioconservazione alle nostre condizioni ha comunque portato ad una riduzione significativa di attività, anche se solo nel caso del secondo isolato tale riduzione si è abbinata ad una perdita di virulenza e questo sottolinea ancor una volta la complessità dei fenomeni di cui stiamo parlando.

Come ultima annotazione c'è da sottolineare che in un lavoro non ancora pubblicato, abbiamo potuto verificare il mantenimento delle capacità entomopatogene in altri due isolati di *B. bassiana* dopo averli conservati liofilizzati a -20°C per 36 mesi.

In conclusione, anche se i funghi entomopatogeni risultano relativamente "facili" da conservare, le tecniche scelte ed i protocolli operativi devono essere valutati attentamente, possibilmente per ogni singolo ceppo da sottoporre al trattamento, se si vogliono evitare perdite "dolorose".

## BIBLIGRAFIA


Ayala-Zermeño M.A., Gallou A., Berlanga-Padilla A.M., Andrade-Michel G.Y., Rodríguez-Rodríguez J.C., Arredondo-Bernal H.C., Montesinos-Matías R., 2017 – *Viability, purity and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods*. - Fungal Biology (2017), doi: 10.1016/j.funbio.2017.07.007.

Castellani A., 1939 – *The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water.* - Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 42: 225-226.

Cito A., Francardi V., Barzanti G.P., Strangi A., Simoni S., Roversi P.F., 2015 – *Effects of cryopreservation and freeze-drying on proteases enzymatic activity of entomopathogenic strains of* Beauveria bassiana *(Balsamo) Vuillemin and* Metarhizium anisopliae *(Metchnikoff) Sorokin*. - REDIA, 98: 49-55.

Gallo M.B.C., Guimarães D.O., Momesso L. da S., Pupo M.T., 2008 – *Natural products from endophytic fungi*. In: Microbial Biotechnology, Volume 4, Jain S. Ed., Publishing Agency, New Delhi, pp. 139-147.

Gillespie J.P., Bateman R., Charnley A.K., 1998 – *Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of* Metarhizium *spp. for the desert locust,* Schistocerca gregaria. - Journal of Invertebrate Pathology, 71: 128-137.

Homolka L., 2013 – *Methods of cryopreservation in fungi*. In: Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology, Gupta V.K. *et al*. Eds., Fungal Biology, DOI 10.1007/978-1-4614-2355-3, pp. 9-16.

Homolka L., Lisa L., Eichlerova I., Valaskova V., Baldrian P., 2010 – *Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics*. - Fungal Biology, 114: 929-935.

Humber R.A., 2012 – *Preservation of entomopathogenic fungal cultures*. In: Manual of techniques in invertebrate pathology. Second edition, Lacey L.A. Ed., Academic Press., Amsterdam, pp. 317-328.

Lalaymia I., Declerck S., Cranenbrouck S., 2013 – *Cryopreservation of in vitro-produced* Rhizophagus *species has minor effects on their morphology, physiology, and genetic stability*. - Mycorrhiza, 23: 675-682.

Marques E.J., Alves S.B., Marques I.M.R., 2000 – *Virulence of* Beauveria bassiana *(Bals.) Vuill. to* Diatraea saccharalis *(F.) (Lepidoptera: Crambidae) after conidia storage at low temperature*. - An. Soc. Entomol. Brasil., 29(2): 303-307.

Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S.-C., 2004 – *Preservation and distribution of fungal cultures*. In: Biodiversity of Fungi, Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. Eds., Academic Press, Washington DC, pp. 37-47.

Oliveira I., Pereira J.A., Bento A., Baptista P., 2011 – *Viability of* Beauveria bassiana *isolates after storage under several preservation methods*. - Annals of Microbiology, 61/2: 339-344. https://doi.org/10.1007/s13213-010-0147-8

Pasarell L., McGinnis M.R., 1992 – *Viability of Fungal Cultures Maintained at -70°C*. - Journal of Clinical Microbiology, 30/4: 1000-1004.

Shah F.A., Wang C.S., Butt T.M., 2005 – *Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus* Metarhizium anisopliae. - FEMS Microbiology Letters, 251: 259-266.

Ryan M.J., Jeffries P., Bridges P.D., Smith D., 2001 – *Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function*. - Cryoletters, 22: 115-124.

Singh S.K., Upadhyay R.C., Kamal S., Tiwari M., 2004 – *Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yeld and genetic stability*. - CryoLetters, 25: 23-32.

Toegel S., Salar-Behzadi S., Horaczek-Clausen A., Viernstein H., 2010 – *Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi* Beauveria brongniartii *and* Metarhizium anisopliae *during lyophilization*. - Journal of Invertebrate Pathology, 105: 16-23.

Voyron S., Roussel S., Munaut F., Varese G.C., Ginepro M., Declerck S., Filipello Marchisio V., 2009 – *Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation*. - Mycological Research, 113: 1027-1038.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 99-102*

# TEMPERATURE ULTRABASSE E PROTOCOLLI CRYO PER LA COSTITUZIONE DI COLLEZIONI VIVENTI DI NEMATODI ENTOMOPATOGENI

SILVIA LANDI[a] - GIULIA TORRINI[a] - EUSTACHIO TARASCO[b]

[a] *CREA – Centro di ricerca Difesa e Certificazione, via Lanciola 12/a, 50125 Firenze, Italy*
[b] *Di.S.S.P.A. – Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro.*
Autore corrispondente: silvia.landi@crea.gov.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Discese termiche e temperature basse e ultrabasse per la creazione di collezioni viventi di interesse agroforestale". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 23 febbraio 2018.

*Ultra-low temperatures and cryopreservation protocols for the maintenance of entomophatogenic nematodes in live collection*

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* are important biological control agents for various economically important pests. Large-scale application of these nematodes requires multiple generations reared in mass quantities and stored for variable periods of time. Routine sub-culturing of EPNs can lead to trait deterioration. The cryopreservation of EPNs at ultra-low temperature is a useful strategy that can assure the preservation for long periods without genetic alteration or loss of functional characteristics. The first attempts to cryopreserve EPNs date back to the 90s. To date the most used protocol provides: storage of IJs in distilled water for two weeks at 12°C after their emergence from *Galleria mellonella* larvae, incubation in glycerol (hours number and solution concentration are specific for each specie), 10 min in 70% methanol at 0°C, several minutes in liquid nitrogen and finally storage in a mechanical freezer at -140°C. Moreover, in this review some bioassays to verify the virulence efficiency are reported.

KEY WORDS: cryoprotective agents, infective juveniles, *Heterorhabditis, Steinernema,* virulence assays.

## INTRODUZIONE

L'utilizzo dei nematodi entomopatogeni (EPNs) quali agenti di controllo di un ampio spettro di insetti nocivi, è in continua crescita. I generi *Steinernema* e *Heterorhabditis* hanno ricevuto la maggiore attenzione tra tutti i nematodi studiati perché portano a morte velocemente l'insetto target, possono essere applicati con attrezzature convenzionali, sono sicuri per l'ambiente e hanno un bassissimo impatto sulle specie no-target. Inoltre, gli EPNs e i loro batteri associati non mostrano effetti sui mammiferi né sugli esseri umani.

L'applicazione su larga scala degli EPNs richiede la loro continua moltiplicazione, che solitamente avviene in bioreattori su substrato liquido, e lo stoccaggio per un periodo variabile di tempo, mentre, in laboratorio, le diverse popolazioni di EPNs vengono rinnovate utilizzando insetti esca, come *Galleria mellonella* L., e stoccati in acqua in celle climatiche a 9-12°C. La continua moltiplicazione degli EPNs può determinare la perdita di importanti caratteristiche genetiche (inbreeding, deriva genica e selezione involontaria) o di fattori non genetici (malattie, carenze nutrizionali) e un decremento nella capacità di controllo biologico (SHAPIRO *et al.*, 1996; WANG e GREWAL, 2002) per la progressiva perdita di virulenza, la riduzione di adattamento all'ambiente, la riduzione della capacità di riprodursi e di ricercare l'ospite (SHAPIRO *et al.*, 1996; BAI *et al.*, 2005; BILGRAMI *et al.*, 2006). La conservazione dei ceppi di EPNs a basse temperature e la loro moltiplicazione solo quando è necessario, possono minimizzare la perdita di queste fondamentali caratteristiche.

La crioconservazione offre la possibilità di conservare gli EPNs per un lungo periodo riducendo il rischio di contaminazione degli isolati con altri ceppi (NUGENT *et al.*, 1996) ed ha il vantaggio di essere meno costosa in quanto richiede meno ore di laboratorio e necessita di spazi minori per lo stoccaggio dei nematodi (BRIDGE e HAM, 1985). Inoltre, mediante la creazione di criobanche si può accrescere la possibilità di utilizzo di un maggior numero di ceppi. Infatti, finora nella lotta biologica sono utilizzati principalmente ceppi non autoctoni e quindi non ben adattati alle condizioni climatiche locali, riducendone così la loro efficacia. Viceversa, l'utilizzo di isolati indigeni può essere vantaggioso per accrescere la loro efficacia e al contempo migliorare la biodiversità. Le varie specie e/o ceppi di EPNs hanno una gamma diversa di ospiti, diversità di comportamento e tolleranza alle alte o

– Pubblicato marzo 2019

basse temperature (Tarasco *et al.*, 2015). Purtroppo, ad oggi, malgrado gli indubbi vantaggi che la crioconservazione può portare, i ceppi mantenuti in criobanche sono pochi. Due sono i principali fattori che ostacolano l'utilizzo di questa tecnica su larga scala. Innanzitutto, ogni specie ha una diversa adattabilità al mantenimento criogenico, pertanto, i protocolli da utilizzare devono essere stabiliti empiricamente caso per caso (James, 2004; Nugent *et al.*, 1996). Inoltre, l'uso di sostanze criogeniche tossiche impone precauzioni che ne sfavoriscono l'utilizzo.

## Messa a punto di protocolli di crioconservazione degli EPNs

La crioconservazione è una tecnica che consente di interrompere i processi biochimici del metabolismo cellulare e quindi il mantenimento della vitalità cellulare per un tempo prolungato tramite congelamento a temperature ultra-basse che generalmente corrispondono a -196°C, il punto di ebollizione dell'azoto liquido. Questo è possibile solo se si evita la formazione di cristalli di ghiaccio a livello intra-cellulare, che causerebbero un danno irreversibile alle membrane cellulari, distruggendo la loro semi-permeabilità. La vitrificazione è il processo fisico mediante il quale una soluzione acquosa passa da uno stato liquido ad uno stato solido amorfo (vetroso), senza cristallizzare, in quanto l'acqua contenuta all'interno del corpo non fa in tempo a formare cristalli di ghiaccio, grazie all'elevata velocità di abbassamento delle temperature (10.000°C/min) e alla viscosità della soluzione data dall'utilizzo di sostanze crioprotettive. Affinché la crioconservazione abbia successo è necessario che le cellule sopravvivano non solo alla fase di raffreddamento, ma anche alla fase di scongelamento (Mazur, 2004; Panis e Lambardi, 2005). Il glicerolo e il Dimethyl sulfoxide (DMSO) sono i più comuni agenti crioprotettivi utilizzati per gli EPNs (Panis e Lambardi, 2005) per il loro basso peso molecolare, la non tossicità e l'economicità.

I primi studi inerenti alla crioconservazione degli EPNs risalgono agli anni '90. Smith *et al*. (1990) eseguirono una estesa serie di analisi con vari crioprotettivi testando diversi stadi di sviluppo di *Steinernema feltiae*, e conclusero che i migliori risultati si ottenevano se questa tecnica era applicata agli stadi larvali giovanili, in particolare la larva di terza età che rappresenta l'unico stadio che conduce vita libera nel suolo ed è lo stadio infettivo (IJs). Popiel e Vasquez (1991) conducendo prove su *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis bacteriophora* dimostrarono, innanzitutto, che i crioprotettivi, come il glicerolo, agivano anche senza la rimozione della cuticola delle larve del secondo stadio che gli EPNs mantengono nel terzo stadio come guaina protettiva, per evitare la perdita di acqua durante la fase a vita libera. Inoltre, misero a punto un protocollo impiegando due diverse procedure di incubazione abbinate sequenzialmente. Inizialmente le larve di terza età dei nematodi erano immerse in una soluzione di glicerolo al 22 e 14%, rispettivamente per le due specie, per 24 ore, successivamente venivano trasferite in una soluzione di metanolo al 70% per 10 minuti. Ottennero così la sopravvivenza del 50% e 80% degli individui, rispettivamente per *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*. Con questa procedura, che ancora oggi rappresenta la base con cui si crioconservano gli EPNs, misurarono un decremento costante di glicogeno autoprodotto dai nematodi, compensato da un incremento di glicerolo, glucosio e di trealosio. L'autoproduzione di molecole crioprotettive da parte degli stessi animali probabilmente è la chiave per la riuscita della procedura di crioconservazione. Il trealosio rappresenta, sicuramente, il più importante protettore naturale prodotto dai nematodi in condizione di stress da disidratazione e raffreddamento (Behm, 1997). Riguardo al ruolo del metanolo nella crioconservazione si ipotizza che riduca il tasso di raffreddamento richiesto per la vitrificazione; in pratica il metanolo protegge dal raffreddamento lento ed è vantaggioso quando è necessario crioconservare grandi volumi di materiale. In questa direzione, uno studio di Nugent *et al*. (1996) dimostrò che la sopravvivenza aumentava se i nematodi venivano filtrati piuttosto che lasciati in sospensione, in questo modo, infatti, si riduceva il volume di materiale da crioconservare e, inoltre, lo scongelamento avveniva in modo rapido impedendo così la formazione di cristalli. Bai *et al*. (2004) aumentarono ulteriormente la sopravvivenza utilizzando una sospensione con una concentrazione di 12.000 individui/ml, dimostrando che in *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* esiste una correlazione positiva tra sopravvivenza dei nematodi al processo di crioconservazione e la concentrazione degli individui durante le fasi di incubazione.

Studi successivi hanno ulteriormente perfezionato la procedura di crioconservazione. Irdani *et al*. (2006) e Cosi *et al*. (2008) hanno dimostrato che una volta raffreddati in azoto liquido, i nematodi possono essere conservati in un freezer meccanico alla temperatura di -140°C, riducendo così i costi per il loro mantenimento. Torrini *et al.* (2016) hanno ottenuto una maggiore sopravvivenza di *S. carpocapsae* crioconservando IJs stoccati in acqua distillata a 12°C per 15 giorni una volta fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella*, prima dell'immersione in glicerolo; inoltre, Torrini *et al*. (2016) hanno visto che solo dopo la prima settimana di stoccaggio a -140°C si ha una riduzione della sopravvivenza, la quale si stabilizza poi al 74-75% e rimane costante.

Riepilogando, il protocollo standard per gli EPNs può essere coì schematizzato: i nematodi al loro stadio

infettivo (IJs), una volta fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella* sono stoccati in acqua distillata per 15 giorni prima di essere incubati a  in glicerolo e successivamente per 10 minuti in metanolo al 70%. Gli stadi infettivi (IJs) sono poi immersi per alcuni minuti in azoto liquido e infine stoccati in freezer.

Il tempo di incubazione in glicerolo e la relativa concentrazione sono i due parametri che devono essere stabiliti per le singole specie. In Tabella 1 si riportano i valori ricavati dalla bibliografia che permettono i più alti tassi di sopravvivenza.

Infine, il successo di questa procedura è condizionato da un ultimo parametro: CURRANT (1992) trovò una relazione inversa tra biomassa del nematode e sopravvivenza dopo la crioconservazione. Pertanto, i nematodi di grandi dimensioni come *Steinernema apuliae* hanno una più bassa sopravvivenza rispetto a quelli piccoli come *S. carpocapsae* (TORRINI, 2015).

*Tabella 1* – Tempo di incubazione in glicerolo e concentrazione glicerolo per alcune specie di *Steinernema* e *Heterorhabditis*.

| Specie | Tempo di incubazione (h) | Concentrazione glicerolo (%) |
|---|---|---|
| *Steinernema carpocapsae* | 48 | 18 |
| *Steinernema affine* | 48 | 18 |
| *Steinernema feltiae* | 48 | 18 |
| *Steinernema apuliae* | 24 | 18 |
| *Heterorhabditis bacteriophora* | 48 | 25 |

## PERFORMANCE DEGLI EPNS DOPO LA CRIOCONSERVAZIONE

La virulenza degli EPNs si esplica tramite il rilascio di microrganismi simbionti. Gli IJs contengono il loro simbionte batterico nel tratto intestinale: i batteri appartenenti al genere *Photorhabdus* colonizzano principalmente la regione anteriore dell'intestino di *Heterorhabditis*, appena posteriormente al bulbo basale, mentre i batteri del genere *Xenorhabdus* colonizzano una vescicola intestinale bilobata specializzata in *Steinernema*. La crioconservazione deve mantenere la virulenza e quindi oltre al nematode deve essere assicurata anche la sopravvivenza del simbionte. Il biosaggio di virulenza è il metodo più utilizzato per verificare se i simbionti sono sopravvissuti alla crioconservazione e se il nematode è ancora in grado di portare a morte l'ospite e riprodursi in esso. Il metodo più semplice è quello di inoculare una sospensione di acqua distillata di 250 µl contenente circa 200 IJs in una capsula Petri (diam. 3,5 cm) contenente due filtri di carta bibula e una larva di *G. mellonella*. La piastra viene conservata a 24 ° C al buio e la mortalità delle larve è valutata ogni 24 ore per una settimana. Per valutare se il processo di crioconservazione riduce o meno la capacità riproduttiva degli EPNs può essere effettuato il conteggio della progenie della prima generazione (IJs fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella*, inoculate con gli EPNs precedentemente crioconservati) e quella della seconda generazione (IJs fuoriusciti dalle larve di *G. mellonella*, inoculate con gli EPNs della prima generazione). TORRINI *et al.* (2016) hanno evidenziato che il potenziale riproduttivo di *S. carpocapsae* dopo la crioconservazione era più basso negli individui crioconservati rispetto a quelli di controllo solo nella prima progenie, ma dalla seconda non c'era più alcuna differenza.

I test illustrati permettono di fare un primo screening in laboratorio, ma l'efficacia in campo può essere molto diversa perché influenzata da diversi fattori associati al nematode (tasso di invasione e rilascio dei batteri), al batterio (tasso di insediamento e moltiplicazione), all'ospite (comportamento e risposta autoimmune) e all'ambiente (localizzazione dell'insetto, temperatura, umidità, pH e tessitura del suolo) (GLAZER e LEWIS, 2000). A questo proposito sono stati messi a punto dei biosaggi che si propongono di valutare in laboratorio quale può essere la risposta delle larve di EPNs alle condizioni di campo. Il saggio di penetrazione (CAROLI *et al.*, 1996) intende valutare la capacità di penetrare l'ospite. Utilizzando piastre di coltura a 12 pozzetti (COSTAR®) vengono inoculati 200 IJs in 0,5 µl di acqua in ogni pozzetto contenente due fogli di carta bibula e una larva di *G. mellonella.* Dopo 48 ore dalla morte dell'ospite si verifica l'infezione mediante dissezione. Il saggio del tempo di esposizione (GLAZER, 1991) permette di misurare il tempo minimo necessario per penetrare l'ospite. In piastre di coltura a 12 pozzetti (COSTAR®) vengono inoculati 400 IJs in 0,5 µl di acqua in ogni pozzetto contenente due fogli di carta bibula e una larva di *G. mellonella*; si effettuano controlli a cadenza di 20 minuti fino a 180 min. Il saggio uno a uno (MILLER, 1989) consente di fare una valutazione globale del processo di infezione. Su piastre di coltura a 12 pozzetti (COSTAR®) viene inoculato un solo esemplare di IJ in 0,5 µl di acqua per larva di *G. mellonella*. Si effettuano controlli dopo un tempo di esposizione di 24, 48 e 72 ore. Infine, il saggio della colonna di sabbia (GRIFFIN e DOWNES, 1994) si propone di misurare la capacità del nematode di ricercare e penetrare l'ospite. In un contenitore di plastica si pone una larva di *G. mellonella* sul fondo e si riempie poi il contenitore con sabbia sterile bagnata per un'altezza di 10 cm; nella parte alta si mettono 100 IJs in 100 µl di acqua. Si verifica l'avvenuta infezione dopo 24 ore. I biosaggi sono stati utilizzati per la prima volta per valutare la performance degli IJs dopo la crioconservazione da TORRINI *et al.* (2016). Nessuna differenza è stata evidenziata nell'infettività tra nematodi crioconservati e controllo, tanto che anche gli EPNs crioconservati infettavano velocemente l'ospite e la mortalità degli insetti era prossima al 100%.

## Prospettive future

Gli studi più recenti sulla crioconservazione degli EPNs sono indirizzari principalmente a semplificare e standardizzare ulteriormente i protocolli ed eliminare o ridurre l'impiego di sostante tossiche quali il metanolo. I primi esperimenti in proposito, però, non hanno dato risultati incoraggianti. Guide *et al*. (2016) hanno impiegato un protocollo che prevedeva la sola incubazione in glicerolo su *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora* e *Heterorhabditis amazonensis.* Solo per *S. feltiae* la sopravvivenza ha raggiunto il 57% con l'incubazione in glicerolo al 15% per 48 h. Il dato più allarmante, però, è stata la perdita di virulenza, dopo 168 h in azoto liquido si è avuto una riduzione dell'infettività del 90%.

## BIBLIOGRAFIA


Bai C., Shapiro-Ilan D.I., Gaugler R., Hopper K.R., 2005 – *Stabilization of beneficial traits in* Heterorhabditis bacteriophora *through creation of inbred lines*. - Biological Control., 32: 220–227.

Bai C., Shapiro-Ilan D.I., Gaugler R., Shuxia Y., 2004 – *Effect of entomopathogenic nematode concentration on survival during cryopreservation in liquid nitrogen.* - Journal of Nematology, 36 (3): 281-284.

Behm C., 1997 – *The role of trehalose in the physiology of nematodes.* Int. J. Parasitol., 27: 215–229.

Bilgrami A.L., Gaugler R., Shapiro-Ilan D.I., Adams B.J., 2006 – *Source of trait deterioration in entomopathogenic nematodes* Heterorhabditis bacteriophora *and* Steinernema carpocapsae *during in vivo culture*. Nematology, 8 (3): 397-409.

Bridge J., Ham J., 1985 – *A technique for the cryopreservation of viable juveniles of* Meloidogyne graminicola. - Nematologica, 31: 185-189.

Caroli L., Glazer I., Gaugler R., 1996 – *Entomopathogenic nematode infectivity assay: multi variable comparison of penetration into different hosts*. - Biocontrol Science and Technology, 6: 227-233.

Cosi E., Triggiani O., Irdani T., Marasco E., Roversi P.F., 2008 – *First results of entomopathogenic nematodes cryopreservation in liquid nitrogen and storage at* . - REDIA: 181-183.

Curran J.C., Gilbert C., Butler K., 1992 – *Routine cryopreservation of isolates of* Steinernema *and Heterorhabditis* spp. *Journal of Nematology*, 24: 269-270.

Glazer I., 1991 – Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid *nematodes to insects.* - Journal of Invertebrate Pathology, 59: 90-94.

Glazer I., Lewis E.E., 2000 – *Bioassays for entomopathogenic nematodes.* In: Navon A & Ascher KR S, (Eds). Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 229-247.

Griffin C.T., Downes M.J., 1994 – *Recognition of low temperature active isolates of the entomopathogenic nematode* Heterorhabditis. - Nematologica, 37: 83-91.

Guide B.A., Alves V.S., Fernandes T.A.P., Ferreira F.P., Neves P.M.O.J., 2016 – *Glycerol as a cryoprotectant agent to the entomopathogenic nematodes* Heterorhabditis *spp. and* Steinernema *spp. Ciências Agrárias, Londrina,* 37: 3017-3026.

Irdani T., Carletti B., Ambrogioni L., Roversi P.F., 2006 – *Rapid-cooling and storage of plant nematodes at* . - Cryobiology, 52: 319-322.

James E.R., 2004 – *Parasite cryopreservation by vetrification*. Cryobiology, 49: 201-210.

Mazur P., 2004 – *Principles of cryobiology.* In: Fuller B.J., Lane N., Benson E.E. (Eds.), Life in the Frozen State, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.3-65.

Miller R.W., 1989 – *Novel pathogenicity assessment technique for* Steinernema *and* Heterorhabditis *entomopathogenic nematodes*. - Journal of Nematology, 21: 574.

Nugent M.J., O Leary S., Burnell A.M., 1996 – *Optimised procedures for the cryopreservation of different species of* Heterorhabditis. - Fundamental and Applied Nematology, 19: 1-6.

Panis B., Lambardi M., 2005 – *Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources.* - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): 1-12.

Popiel I., Vasquez E.M., 1991 – *Cryopreservation of* Steinernema carpocapsae *and* Heterorhabditis bacteriophora. - Journal of Nematology, 21: 432-437.

Smith B.S., Hodgson-Smith A., Popiel , Minter D.M., James E.R., 1990 - *Cryopreservation of the entomogenous nematode parasite* Steinernema feltiae (=Neoaplectana carpocapsae). Cryobiology, 27: 319-327.

Shapiro D.I., Glazer I., Segal D., 1996 - *Trait stability of and fitness of the heat-tolerant entomopathogenic nematode* Heterorhabditis bacteriophora *IS5 strain*. - Biological Control, 6: 238-244.

Tarasco E., Clausi M., Rappazzo G., Panzavolta T., Curto G., Sorino R., Oreste M., Longo A., Leone D., Tiberi R., Vinciguerra M.T., Triggiani O., 2015 – *Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy.* - Journal of Helmintology, 89:359-366.

Torrini G. – 2015. *Cryopreservation of entomopathogenic nematodes.* - Tesi Dottorato di Ricerca in "Insect Science and Biotechnology" XXVII Ciclo 2012-2015 Università degli Studi di Napoli Federico II, pp 103.

Torrini G., Landi S., Tarasco E., Roversi P.F., 2016 – *Evaluation of* Steinernema carpocapse *survival and infectivity after cryoconservation.* - Biocontrol, 61(4): 461-469.

Wang X.D., Grewal P.S., 2002 – *Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance.* - Biological Control 23: 71-78.

Seduta pubblica, Firenze 8 giugno 2018

Tavola Rotonda su:

# APPROCCI GENOMICI E MOLECOLARI PER IL CONTROLLO DI SPECIE INVASIVE DI INSETTI DI INTERESSE AGRARIO E SANITARIO

Coordinatore:

Giuliano Gasperi, Accademico

104 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 105-110*

# EDITING POPULATION GENETICS FOR VECTOR CONTROL

PAOLA POLLEGIONI[a] - IGNAZIO GRAZIOSI[a] - RUTH MÜLLER[a,b] - ANDREA CRISANTI[c]

[a] *Polo GGB, Terni, Italy*
[b] *Institute of Tropical Medicine in Antwerp, Belgium*
[c] *Imperial College, London, UK*
Corresponding Author: Paola Pollegioni e-mail: p.pollegioni@pologgb.com
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2018.

*Editing population genetics for vector control*

Mosquitoes species of the genus *Aedes* and *Anopheles* are responsible for transmitting severe and life threatening diseases including a number of viral encephalitis, Dengue yellow fever, Malaria and more recently Zika. A few *Anopheles* species are responsible for causing 200 million cases of malaria every year and the death of half a million children under the age of five in less developed regions of Africa. During the last twenty years a worldwide concerted effort based on the use of bed nets, insecticides and drug treatment has halved malaria morbidity and mortality. The implementation of these control measures necessitates about 10 billion per year mostly in the form of donations thus questioning the long-term sustainability of this approach and its suitability for eradicating the disease in the next 30-40 years. The vectorial capacity of a mosquito species to transmit malaria depends on genetically determined traits such as feeding behavior, longevity, density and ability to support parasite development. Editing of the corresponding genes is anticipated to impair mosquito ability to transmit malaria. The recent development of CRISPR/CAS9 based gene drive technology has unlocked the possibility to selectively edit a mosquito population. Genetic modifications designed to either impair female fertility or interfere with mosquito ability to transmit the malaria parasite have been spread from few laboratory individual to large caged mosquito populations. These laboratory experiments have also supported mathematical modelling predicting how gene technology has the potential to eradicate malaria transmission in a span of few years from vast regions of Africa. Technical challenges in the development of a gene drive technology suitable for release include the development nuclease-resistant functional gene variant that would block the spreading of the drive as well as off target activity of the CAS9 nuclease that may generate undesirable mutations at other loci. We present here a number of solutions to overcome these problems.

KEY WORDS: vector-borne diseases; malaria control; gene editing; Anopheles; gene drive.

## A BURDEN FOR HUMAN HEALTH

Mosquito-born diseases are a global burden for human health that is affecting billion of people, often exacerbated by climate change and global trade (MATHIEU & KARMALI, 2016; TJADEN *et al*., 2018). *Anopheles* and *Aedes* species (Diptera: Culicidae) transmit life threatening diseases such as malaria, yellow and dengue fevers, Chikungunya and Zika viruses (MAYER *et al*., 2017; BENELLI & MEHLHORN, 2018). For instance, half of the world population is at risk of malaria infection, which is caused by the protozoan human parasite *Plasmodium falciparum* and transmitted by infected *Anopheles* mosquitoes. (COWMAN *et al*., 2016). The disease affects 200 million people annually and still demands a death toll of over 400 thousand people every year, for the majority children in tropical areas of Africa and Asia, with dramatic and log-lasting impacts on socio-economic development of affected areas (SACHS & MALANEY, 2002; WHO, 2016; MCCORD *et al*., 2017). Control measures are focused on limiting exposure to mosquitoes through bed netting and insect repellents, managing mosquito populations using insecticides, and medical treatments, (CIBULSKIS *et al*., 2016). These management approaches have significantly helped limiting the global impact of malaria in the past few decades, but the high cost and the unavailability of high-efficacy vaccines make these options not fully sustainable in the long term and inadequate for eradicating the disease (HEMINGWAY *et al*., 2016; WHO, 2016; BENELLI & BEIER, 2017). This is urging the development of novel tools to tackle the emergency. The modification of mosquitoes through gene editing might be a game changer, opening new scenarios for managing vector-borne diseases through the control of vector populations (ALPHEY *et al*., 2002; GABRIELI *et al*., 2011; BURT *et al*., 2018).

## DEFINING THE STRATEGY

We aim to provide a short overview of available approaches and propose a framework for imple-

– Pubblicato marzo 2019

menting mosquito gene-editing technology, from idea to effective control, through distinct steps (Fig. 1).

The success of controlling disease vectors through genetic modifications depends on the effective suppression or replacement of vector populations following the release of modified insects. Various genetic modifications have been classified according to their expected dynamics and persistence into the target populations (ALPHEY, 2014). Self-limiting transgenes tend to decline in frequency and disappear rapidly from the population, unless maintained by the periodic release of additional modified insects. In contrast, some of the constructs are designed to be invasive and self-sustaining, spreading through the initial target population without further releases. Genetic constructs designed to be self-sustaining reduce costs of long-term programs, but impose a lack of post-release control (BURT, 2014).

*Self-limiting strategies*

The most conventional self-limiting strategies include the Sterile Insect technique (SIT), based on the release of radiation-sterilized males aimed to reduce the reproductive potential of the wild counterparts and decrease target mosquito populations. The release of transgenic sterile male mosquitoes carrying a dominant lethal genetic system (RIDL) have been used against the vector of dengue fever *Aedes aegypti* in the Caribbean, Brazil and Malaysia with mixed success (HARRIS *et al*., 2011; LACROIX *et al*., 2012; CARVALHO *et al*., 2015). Lab-reared RIDL *A. aegypti* males show high longevity but imperfect field mating competitiveness in comparison to wild-type populations, while SIT-developed sterilized *Anopheles* males display severe fitness costs in laboratory cages compared to the wild-type in terms of both adult longevity and mating competitiveness (HELINSKI *et al*., 2009). An approach based on male sterility induced by artificial trans-infection of maternally transmitted *Wolbachia* bacteria was successfully implemented for the suppression of *Aedes aegypti* populations and reducing dengue fever (WALKER *et al*., 2011). In *Anopheles,* native microbiota tends to inhibit vertical transmission of *Wolbachia* and elicits massive blood meal-induced mortality (HUGHES *et al*., 2014). Stable *Wolbachia* infections (*w*Anga strain) have been recently identified in natural populations of *An. gambiae* s.l. (BALDINI *et al*., 2014), and there is no evidence of cytoplasmic incompatibility (SHAW *et al*., 2016). Similar technical limitations have been observed for *An. gambiae* Dominant Sterile Male [Ag(DSM)] strains developed by SIT transgenic implementation based on Homing Endonucleases (HEGs) cleavage of the ribosomal rDNA repeats, which were exclusively located in the centromeric region of the X chromosome (KLEIN *et al*., 2012). In heterozygous Ag(DSM) males, the activity of beta2-tubulin promoter and consequently the expression of I-PpoI homing endonuclease during spermatogenesis induces the selective cleavage of the ribosomal rDNA repeats and the shredding of the paternal X chromosome in sperm cells (WINDBICHLER *et al*., 2008). The transmission of the I-PpoI enzyme via sperm to the embryos triggers a complete embryonic lethality as a consequence of the shredding of the maternal X chromosome.

Synthetic autosomal sex-ratio distorters that are

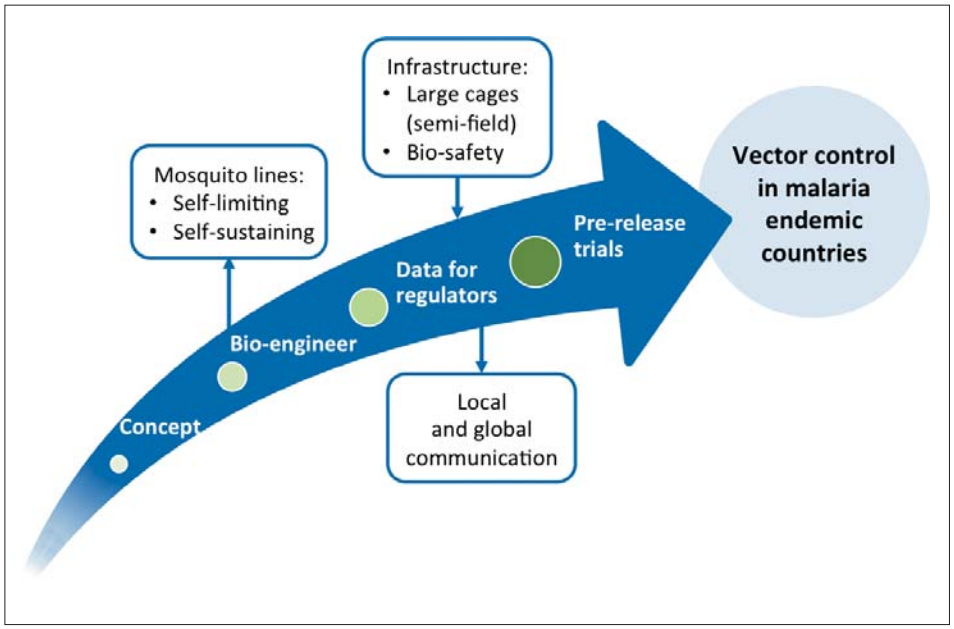



Fig. 1 – Gene editing approach for controlling vector-borne diseases: from idea to field.

fully fertile compared to Ag(DSM) have been generated using two alternative approaches. Engineering a reduction of I-PpoI *in vivo* half-life and restricting its activity to spermatogenesis using testis-specific promoters (beta2-tubulin) causes shredding of the X chromosome during male meiosis and leads to a fully fertile Paternal Male Bias transgenic line [Ag(PMB)1], with an almost 95% male offspring (GALIZI *et al*., 2014). Similarly, GALIZI *et al*. (2016) described a CRISPR-Cas9-based sex distortion system targeting X-linked ribosomal sequences; the expression of the Cas9 enzyme prevents the transmission of the X chromosome to their progeny, thus inducing 86% to 95% male bias. Both distorters can efficiently suppress wild-type mosquito populations in small cages, acting as powerful genetic tools for vector control.

Following the guidance framework for testing genetically modified mosquitoes proposed by the World Health Organization (WHO-TDR & FNIH, 2014), we assessed the kinetics of the Ag(PMB)1 sex-ratio-distorter in large-cages that replicate "semi field" tropical environments (Fig. 1). We conducted: (1) Model parametrization based on experimental life history data of wild-type and transgenic Ag(PMB)1 mosquitoes, and (2) Model validation comparing semi-field conditions to model predictions. We validated an appropriate modelling framework to estimate (*i*) the effect of regular releases of hemizygous Ag(PMB)1 males and (*ii*) the transgene PMB1 persistence into age-structured, generation-overlapping populations of *An. gambiae*. Modelling outputs predicted that Ag(PMB)1 male releases can significantly reduce the number of females into wild type populations (FACCHINELLI *et al*., 2019), and that PMB1 transgene is likely to disappear rather quickly under confined conditions that induce a reproductive behavior (swarming) close to natural conditions (< 2 years) (POLLEGIONI *et al.,* in review).

*Self-sustaining strategies and gene drive technology*

The self-limiting PMB1 sex-ratio distorter is an attractive system because of the reversibility of its effects, but necessitates conspicuous and repeated releases to achieve significant epidemiological effects (BURT, 2014). Self-sustaining gene-drive systems are predicted to have a more robust effect on population suppression by inducing their own spread in a non-Mendelian manner (DEREDEC *et al*., 2011).

Gene drives increase the likelihood that a modified gene will be inherited by its offspring. In sexually reproducing diploid organisms that have two copies of each gene, any single copy normally has a 50% likelihood of being passed to the offspring. Highly invasive gene drives can promote an inheritance bias of nearly 100 percent (Fig. 2). Assuming a closed random mating population and no fitness costs, a gene drive element with 100% transmission to the progeny would increase its frequency up to 0.99 in just ten generations (BURT *et al*., 2018). Naturally occurring selfish elements such as transposable elements, heritable microorganisms, and homing endonucleases (HEGs) tend to spread into a target population over multiple generations, even when released at low frequencies (BURT, 2003, 2014; BURT *et al*., 2018). HEG genes, in particular, are selfish elements found in primitive single-celled eukaryotes (e.g. yeast and algae) that encode cutting -enzymes able to recognize and cleave a 20 to 30-bp

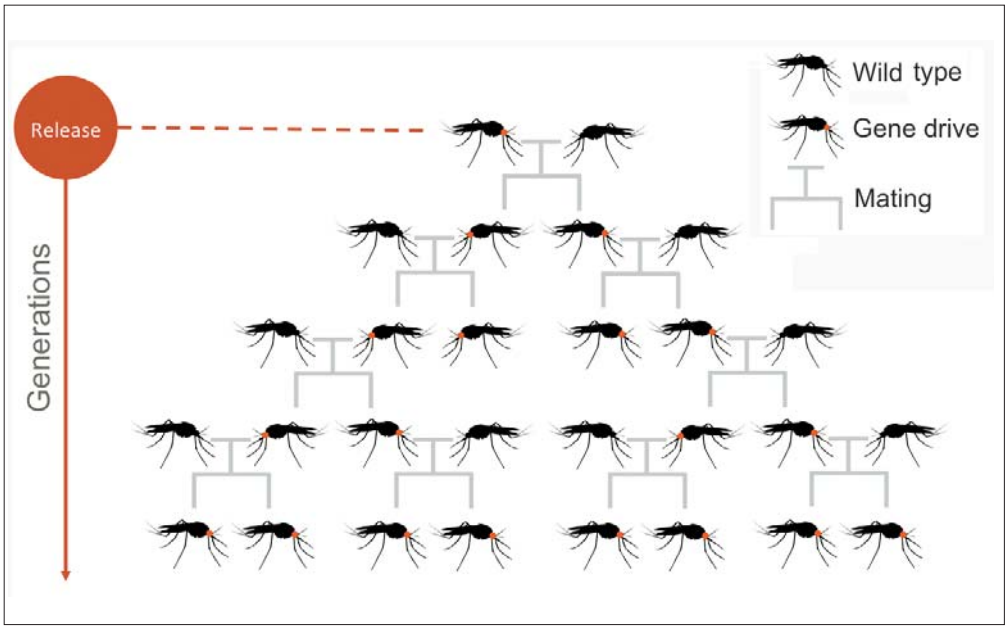



Fig. 2 – Spread of gene-drive systems in mosquito populations for vector control.

DNA sequence. HEGs are also located within the DNA recognition sequence, making it resistant to further cleavage. When HEG comes into contact with its intact homologous chromosome in heterozygous cells, then it cuts the target sequence. As a result of the chromosomal repair process (homology direct repair HDR mechanism) induced by the double-strand break, HEG can be copied converting heterozygous into homozygous cells. This mechanism is known as "homing" and promotes a rapid increase of HEG frequency in a population (BURT, 2003). HEGs are an ideal tool for disrupting suitable target genes essential for female fertility longevity, sex determination, host seeking or pathogen transmission (knock out scheme) and for spreading deleterious modifications that trigger population suppression (knock in scheme). In the last decade, an increasing number of artificial homing/gene drive systems based on modular nucleases have been proposed, including chimeric transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and zinc finger nucleases (ZFNs) (GAI *et al*., 2013). Although recent progress toward the development of both TALEN- and ZFN-based gene drive systems have been demonstrated in *Drosophila melanogaster*, difficulties in reprogramming DNA-binding modules and a low replication fidelity are limiting their application against malaria vectors (SIMONI *et al*., 2014).

More recently, research conducted at the Imperial College in London sought to mimic natural gene drive processes and induce a Super-Mendelian inheritance of transgene/mutation in the offspring through CRISPR-Cas9 gene editing (BURT *et al*., 2018). These gene drives have been specifically designed to be active in the germline and disrupt genes essential for female fertility of *An. gambiae*, such as fertility gene AGAP007280 (HAMMOND *et al*., 2016). In CRISPR-mediated gene drives, the construct includes a single nuclease Cas9 and a small guide RNA that determines the DNA cleavage specificity of the target site. Once inserted in the genome and expressed within a germ cell, the Cas9 protein disrupts the AGAP007280 gene. In response to the double-strand breakage, the cell employs the HDR machinery to copy the construct, including any genetic cargo in the intact homologous chromosome. Although individual mosquito females with only one copy of the defective gene are still fertile, the gene drive ensures inheritance of the mutation in 99-95 % of the offspring and a rapid increase of AGAP007280 frequency in the population. As a result of this, the offspring has high probability to receive a copy of the gene drive construct from both parents, and all females homozygous for the mutation are sterile, while males continue to transmit the gene drive. In the best-case scenario, few generations may be required to spread the transgene/mutation from low frequency to near fixation through wild-type populations (Fig. 2).

This technology has the potential to induce a sustainable decrease of mosquito density by imposing a reproductive load on the population, although a strong selective pressure for resistant alleles, such as sequence variations of the target site of the Cas9 endonuclease, have been observed (HAMMOND *et al*., 2017). Allele variants might be pre-existing in the population or induced by the error-prone, non-homologous, end-joining (NHEJ) mechanism following Cas9 activity at the target site. The selection of in-frame-mutations, mainly indels of different length, was associated to the development of nuclear resistance to Cas9 cleavage, blocking the spread of gene drive after approximately ten generations in small cages (HAMMOND *et al*., 2017). Gene drive constructs that target highly conserved sequences, however, decreased the likelihood of nucleotide resistance.

The CRISPR-Cas9-targeted disruption of the *doublesex* gene (*Agdsx*) led for the first time to complete suppression of *An. gambiae* populations in small cages after 7-11 generations (KYROU *et al*., 2018). The highly conserved *Agdxs* gene encodes two alternatively spliced transcripts, dsx-female (*Agdsx*F) and dsx-male (*Agdsx*M), and determines sexual dimorphism in anopheline mosquitoes. The CRISPR-Cas9 mediated disruption of the intron 4-exon 5 boundary in *Agdsx* inhibited the formation of functional *Agdsx*F transcript and induced female sterility, but did not affect male fitness. Homozygous null females ($dsxF^{-/-}$) show intersex phenotypes with male-specific traits including plumose antennae, abnormal proboscis and not-rotated claspers (KYROU *et al*., 2018), and are unable to bite, feed on blood and lay eggs. Due to the functional constraint of *Agdxs* gene, no selection of nuclear resistant alleles has been observed in small cages after 14 generations. As recommended by the World Health Organization (WHO-TDR/FNIH, 2014) and the National Academy of Science of United States (2016), we are currently testing the doublesex gene drive in large cages, reproducing tropical environmental conditions to evaluate population dynamics and suppression potential of the gene drive construct in *Anopheles* mosquitoes.

## FUTURE DIRECTIONS

Gene drive technologies are a promising and powerful tool for controlling populations of malaria vectors, and further work should address and solve

technical challenges. For instance, the development of nuclease-resistant functional gene variants would block the spreading of the drive, and the off-target activity of the CAS9 nuclease may generate undesirable mutations at other loci (HAMMOND & GALIZI, 2018). Several strategies have been proposed to mitigate target site resistance: (*i*) Use of alternative tightly regulated germline-specific promoters to limit Cas9 activity and inhibit nuclear deposition into the embryo causing additional resistant mutations, (*ii*) Selection of novel or engineered endonucleases that show more tolerance to nuclear variation at the target site induced by non-homologous end-joining mechanism or naturally present in the wild-type populations, (*iii*) Exploring target sites within essential genes that are highly conserved in nature indicating selective pressure constrains and (*iv*) Multiplexing individual gene drives to recognize and target several short sequences in the genome offering a redundancy in terms of sites of cleavage. Few data are currently available about unintended off-target mutations generated by homing-based gene drives that might result in fitness costs. Ongoing gene drive research could generate effective genetic tools for malaria control, but the potential and the mechanism of self-sustaining gene-drive strategies as superior alternatives to self-limiting strategies remains to be fully tested in semi-field environmental settings.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Foundation for the National Institutes of Health through the Vector-Based Control of Transmission: Discovery Research (VCTR) program of the Grand Challenges in Global Health initiative of the Bill & Melinda Gates Foundation.

## REFERENCES

ALPHEY L., BEARD C.B., BILLINGSLEY P., COETZEE M., CRISANTI A., CURTIS C., COLLINS F.H., 2002 – *Malaria control with genetically manipulated insect vectors*. - Science, 298: 119-121.

ALPHEY L., 2014 – *Genetic control of mosquitoes*. - Annu. Rev. Entomol., 59: 205-224.

BALDINI F., SEGATA N., POMPON J., MARCENAC P, ROBERT SHAW W, DABIRE R.K, DIABATE A, LEVASHINA E.A, CATTERUCCIA F., 2014 – *Evidence of natural* Wolbachia *infections in field populations of* Anopheles gambiae. - Nat. Commun., 5: 3985.

BENELLI G., BEIER J.C., 2017 – *Current vector control challenges in the fight against malaria*. - Acta Tropica, 174: 91-96.

BENELLI G., MEHLHORN H. (Eds.), 2018 – *Mosquito-borne Diseases: Implications for Public Health* (*Vol. 10)*. Springer, N.Y. 353 pp.

BURT A., 2003 – *Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations*. - P. R. Soc. B, 270: 921-928.

BURT A., 2014 – *Heritable strategies for controlling insect vectors of disease*. - Philos. T. R. Soc. B., 369: 20130432.

BURT A., COULIBALY M., CRISANTI A., DIABATE A., KAYONDO J.K., 2018 – *Gene drive to reduce malaria transmission in sub-Saharan Africa*. - J. Res. Innov., 5: S66-S80.

CARVALHO D.O., MCKEMEY A.R., GARZIERA L., LACROIX R., DONNELLY C.A., ALPHEY L., MALAVASI A., CAPURRO M.L., 2015 – *Suppression of a field population of* Aedes aegypti *in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes*. - PLOS Negl. Trop. Dis., 9: p.e0003864.

COWMAN A.F., HEALER J., MARAPANA D., MARSH K., 2016 – *Malaria: biology and disease*. - Cell, 167: 610-624.

CIBULSKIS R.E., ALONSO P., APONTE J., AREGAWI M., BARRETTE A., BERGERON L., WILLIAMS, R., 2016 – *Malaria: global progress 2000–2015 and future challenges*. - Infect. Dis. Poverty, 5: 61.

DEREDEC A., GODFRAY H.C.J., BURT A., 2011 – *Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108: E874–E880.

FACCHINELLI L., NORTH A.R., COLLINS C.M., MENICHELLI M., PERSAMPIERI T., BUCCI A., SPACCAPELO R., CRISANTI A., BENEDICT M.Q., 2019 – *Large-cage assessment of a transgenic sex-ratio distortion strain on populations of an African malaria vector*. - Parasit. Vectors, 12: 70.

GABRIELI P., SMIDLER A., CATTERUCCIA F., 2014 – *Engineering the control of mosquito-borne infectious diseases*. - Genome Biol., 15: 535.

GAJ T., GERSBACH C.A., BARBAS III C.F., 2013 – *ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. - Trends Biotechnol., 31: 397-405.

GALIZI R., DOYLE L.A., MENICHELLI M., BERNARDINI F., DEREDEC A., BURT A., STODDARD B.L., WINDBICHLER N., CRISANTI A., 2014 – *Synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito*. - Nat. Commun., 5: 3977.

GALIZI R., HAMMOND A., KYROU K., TAXIARCHI C., BERNARDINI F., O'LOUGHLIN S.M., PAPATHANOS, P.A., NOLAN T., WINDBICHLER N., CRISANTI A., 2016 – *A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control*. - Sci. Rep., 6: 31139.

HAMMOND A., GALIZI R., KYROU K., SIMONI A., SINISCALCHI C., KATSANOS D., GRIBBLE M., BAKER D., MAROIS E., RUSSELL S., BURT A., 2016 – *A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector* Anopheles gambiae. - Nat. Biotech., 34: 78.

HAMMOND A.M., GALIZI R., 2018 – *Gene drives to fight malaria: current state and future directions*. - Pathog. Glob. Health, 111: 412-423.

HAMMOND A.M., KYROU K., BRUTTINI M., NORTH A., GALIZI R., KARLSSON X., KRANJC N., CARPI F.M., D'AURIZIO R., CRISANTI A., NOLAN T., 2017 – *The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito*. - PLOS Genet., 13: e1007039.

HARRIS A.F., NIMMO D., MCKEMEY A.R., KELLY N., SCAIFE S., DONNELLY C.A., ALPHEY L., 2011 – *Field performance of engineered male mosquitoes*. - Nat. Biotech., 29: 1034-1037.

HELINSKI M.E.H., PARKER, A.G., KNOLS B.G.J., 2009 – *Radiation biology of mosquitoes*. - Malar. J., 8: S6.

HEMINGWAY J., SHRETTA R., WELLS T.N., BELL D., DJIMDÉ A.A., ACHEE N., QI G., 2016 – *Tools and strategies for*

*malaria control and elimination: what do we need to achieve a grand convergence in malaria?* - PLOS Biol., 14: e1002380.

Hughes G.L., Dodson B.L., Johnson R.M., Murdock C.C., Tsujimoto H., Suzuki Y., Patt A.A., Cui L., Nossa C.W., Barry R.M., Sakamoto J.M., 2014 – *Native microbiome impedes vertical transmission of* Wolbachia *in* Anopheles *mosquitoes*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: 12498-12503.

Klein T.A., Windbichler N., Deredec A., Burt A., Benedict M.Q., 2012 – *Infertility resulting from transgenic I-PpoI male* Anopheles gambiae *in large cage trials*. - Pathog. Glob. Health, 106: 20-31.

Lacroix R., McKemey A.R., Raduan N., Wee L.K., Ming W.H., Ney T.G., AA S.R., Salman S., Subramaniam S., Nordin O., Angamuthu C., 2012 – *Open field release of genetically engineered sterile male* Aedes aegypti *in Malaysia*. - PLOS One, 7: e42771.

Mathieu K., Karmali M., 2016 – *Emerging challenges of vector-borne diseases and cities: vector-borne diseases, climate change and healthy urban living: Next steps*. - Can. Commun. Dis. Rep., 42: 219.

Mayer, S.V., Tesh, R.B., Vasilakis N., 2017 – *The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers*. - Acta Trop., 166: 155-163.

McCord G.C., Conley D., Sachs J.D., 2017 – *Malaria ecology, child mortality & fertility*. - Econom. Hum. Biol., 24: 1-17.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2016 – *Gene drives on the horizon: advancing science, navigating uncertainty, and aligning research with public values*. National Academies Press, Washington DC, 217 pp.

Sachs J., Malaney P., 2002 – *The economic and social burden of malaria*. - Nature, 415: 680.

Shaw W.R., Marcenac P., Childs L.M., Buckee C.O., Baldini F., Sawadogo S.P., Dabire R.K., Diabate A., Catteruccia F., 2016 - Wolbachia *infections in natural* Anopheles *populations affect egg laying and negatively correlate with* Plasmodium *development*. - Nat Commun., 7:11772.

Simoni A., Siniscalchi C., Chan Y.S., Huen D.S., Russel S., Winbdichler N., Crisanti A., 2014 – *Development of synthetic selfish elements based on modular nucleases in* Drosophila melanogaster. - Nucleic Acids Res., 42: 7461-7472.

Tjaden N.B., Caminade C., Beierkuhnlein C., Thomas S.M., 2018 – *Mosquito-borne diseases: advances in modelling climate-change impacts*. - Trends Parasitol., 34: 227-245.

Walker T.J.P.H., Johnson P.H., Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Frentiu F.D., McMeniman C.J., Leong Y.S., Dong Y., Axford J., Kriesner P., Lloyd A.L., 2011 – *The wMel* Wolbachia *strain blocks dengue and invades caged* Aedes aegypti *populations*. - Nature, 476: 450.

WHO, 2016 - *World malaria report 2015*. World Health Organization, Geneva, 148 pp.

WHO-TDR, FNIH, 2014 – *Guidance framework for testing of genetically modified mosquitoes*. World Health Organization, Geneva, 132 pp.

Windbichler N., Papathanos P.A., Crisanti A., 2008 – *Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in* Anopheles gambiae. - PLOS Genet., 4: e1000291.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 111-114*

# GENOMIC ENGINEERING OF INSECTS FOR SUSTAINABLE CROP PROTECTION

MARC F. SCHETELIG [a, b]

[a] *Justus-Liebig-University Gießen, Institute for Insect Biotechnology, Department of Insect Biotechnology in Plant Protection, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen*
[b] *Fraunhofer IME, Division Bioresources, Insect Pest and Vector Control, Winchesterstr. 2, 35394 Gießen*
E-mail: marc.schetelig@agrar.uni-giessen.de
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2018.

*Genomic engineering of insects for sustainable crop protection*

Agriculture is under constant pressure to deliver safe products while reducing residues and environmental risks. One method contributing to integrated pest management, the Sterile Insect Technique, is in use for multiple species worldwide, residue-free and has developed novel technologies for improved strains over the last decades. Successful mass production of male-only populations, new developments in the field of genetically modified insects and enabling gene editing in the first insect pest species are presented and represent opportunities for developing sustainable crop protection.

KEY WORDS: Gene Editing, medfly, Sterile Insect Technique, CRISPR/Cas

Insects regularly attack agricultural products. They feed on plants and fruits, lay their eggs in parts of the plant that lead to the development of larvae which damage plants and crops. Several arthropods including the genera of Lepidoptera, Coleoptera, and Diptera are highly destructive pests in agriculture and can attack hundreds of crops worldwide. Therefore, preventional control or suppression programs are essential, but only effective in use in a few species such as the medfly, *Ceratitis capitata*. California alone can prevent estimated annual losses due to export restrictions of about $ 2 billion by using SIT programs (SIEBERT, 1994). Against other invasive pests, there are no sustainable, economical and effective control methods in place for a large-scale application. Thus, pest insects like the spotted wing drosophila (SWD), *D. suzukii*, which is a major invasive pest of many small and stone fruits (CINI *et al.*, 2012) or the Asian citrus psyllid, which carries a devastating plant virus, cannot be controlled adequately and sustainably at the moment. Those scenarios will lead to further uncontrolled proliferation and damage of crops, affecting not only the US but also Europe and Asia (WALSH *et al.,* 2011).

The available toolbox of control methods for the described pests consists mainly of physical, biological and chemical control. While physical and biological control is useful and relatively specific to the particular species, their widespread use in area-wide scenarios is often difficult for economic reasons. Instead, insecticides are used to respond in a fast, and for the farmers, established way of control option. This bears the risk of polluting ecosystems and ultimately also the food chain, destroying beneficial organisms, creating resistance to insecticides, requiring the development of ever more novel and effective insecticides. Also, long-term adverse effects on beneficial organisms are known, as shown by the example of neonicotinoids and bees. Some neonicotinoid substances with proven risks (clothianidin, thiamethoxam, and imidacloprid) have therefore been debated continuously and banned in the European market in 2018 (EFSA, https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180228). For other pesticides such as glyphosate, which are used on a large-scale, bans are still discussed (FINGER, 2018). While developing and assessing new control substances, bringing them on the market, and responding to any product that has scientifically proven adverse effects is a normal process, the more exciting and sustainable question should be - what other options are already available today or could be developed further?

In this respect, the goals should be defined upfront. Pest control is required on an area-wide basis using the least amount of harmful chemicals with the aim to preserve biodiversity, following the definition and principle of integrated pest management (IPM). The Sterile Insect Technique (SIT) is one strategy that can help the goals of IPM and is successfully used for several insect species. SIT decimates a pest population by mass release of sterile

– Pubblicato marzo 2019

males leading to infertile matings with wild-type females in the field (see Fig. 1). Three main problems can be solved with this method: i) the species specificity is ensured by the mating action between individuals of only one species, ii) the use of insecticides can be significantly reduced; (iii) comprehensive, economical pest control is possible with insects that can be mass-produced in factories and are generally easy to grow.

SIT programs are useful for pest control in agriculture, but also for mosquito control. Moreover, the SIT has another significant advantage. It can be used preventatively against possible invasions of insects, e.g., in harbors that are frequented with fruit shipments always at risk of spreading insect populations through infestations (Dowell *et al.,* 2000). However, to be effective, all steps in an SIT program must be carefully planned for each release round - from field data collection and monitoring to all processes during mass rearing, quality control, and release. While all topics are relevant, one is particularly important to enable SIT for a new species and to make it efficient and economical. These is the separation of males from females to release only males. Male-only releases are reported to be more efficient and female insects are biting (in case of mosquitoes) or laying eggs into fruits (even if sterile).

In species where sex separation is not yet possible, females can be sterilized and released with males, although this is costly and inefficient (Benedict and Robinson, 2003). Therefore, there is a need for sexing systems for large-scale operations. In principle, manual separation is possible, but only automated and inducible systems can produce several billion male insects per week, as is the case with the medfly-producing facility in Guatemala (Parker, 2005). Through the development of a heat-inducible genetic sexing strain in medfly, its control programs benefitted significantly (Robinson, 2002). The transfer

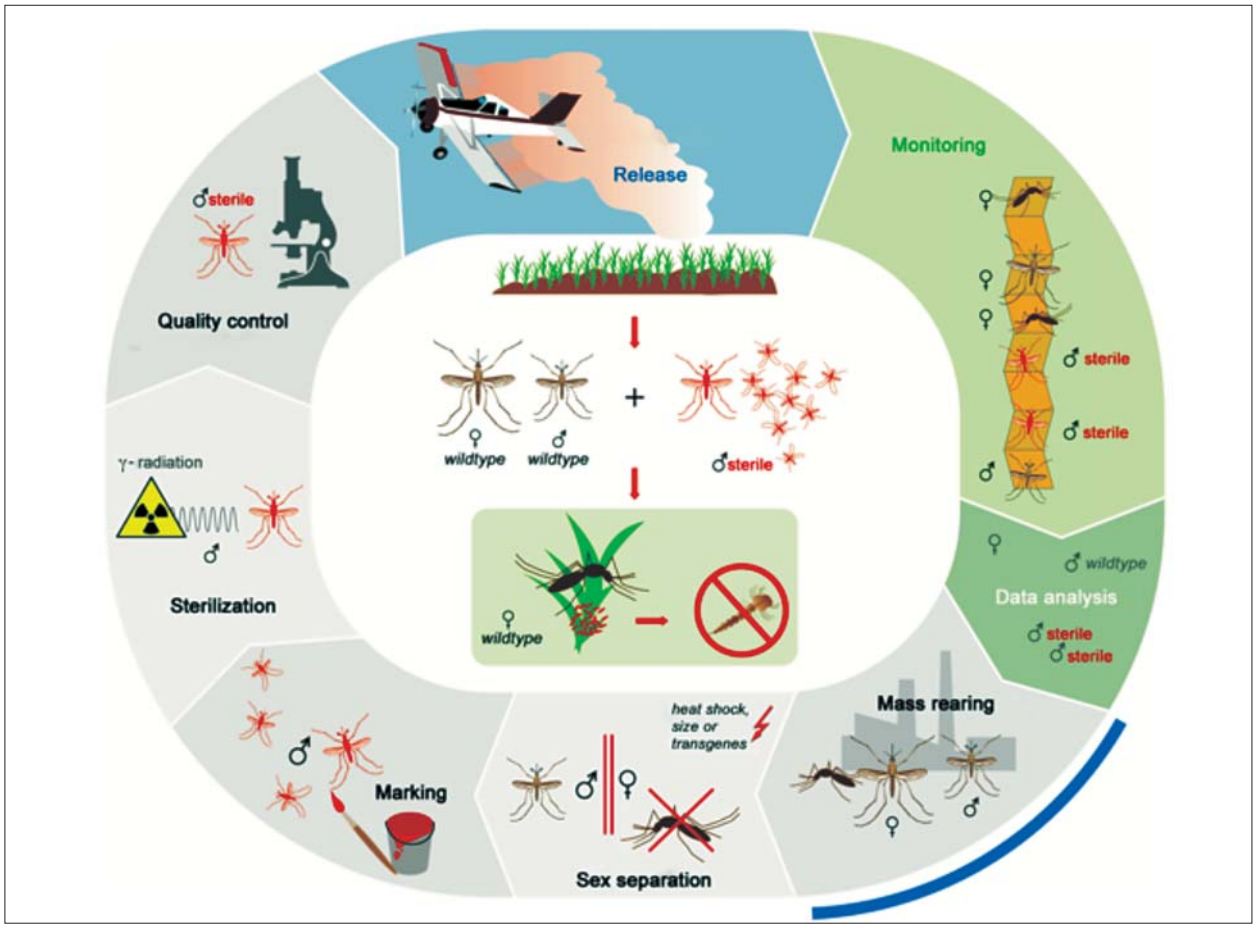



Fig. 1 – The principle of the Sterile Insect Technique. The Sterile Insect Technique uses a large amount of infertile male insects as a Trojan horse against their species. Sterile males released in overflowing amounts relative to the expected wild population, will mate to the majority of wild-type females and thus not produce offspring. Infertile males are produced in large factories, sex separated and marked. The sterilization is typically carried out by radiation. After that, they are transported to the target area, where millions of insects are released in aerial releases. The mass rearing facilities, especially the ones producing fruit flies like the Mediterranean fruit fly, have over 60 years of experience in the rearing of arthropods, developing mass rearing SOPs, and optimize equipment as well as quality standards to enable the production of high-quality insects.
© SIT graphics by Erika Heil art for biomed.

of such large-scale and automated systems to novel crop pests is an important goal to enable the environmentally friendly SIT for those and allow the reduction of harmful substances used for crop protection - in line with the concept of integrated pest management.

Therefore, considerable efforts have been put into producing early embryonic sexing strains for pest species and transfer such technologies to invasive plant (Schetelig and Handler, 2012, Ogaugwu *et al.*, 2013, Schetelig *et al.*, 2016) and livestock pest insects (Yan and Scott, 2015, Yan *et al.*, 2017). All systems use genetically modified insects that produce only male offspring through a female-specific lethality. Combined with the safe sterilization method by radiation this could be a viable alternative for pest control of new species in the future. Because the insects are GMOs, their use in individual countries and markets could be difficult, even if they are sterilized. But they would lead to a reduction of chemicals that would otherwise be used for crop protection. Therefore, it might be essential to develop systems that are GMO-free to enable a holistic strategy for environmentally friendly control involving all parties - science, the public, agriculture stakeholders, and politics. GMO-free strains could be accomplished through new mutagenesis procedures like CRISPR/Cas (Heinze *et al.,* 2017, Kalajdzic and Schetelig, 2017, Li and Handler, 2017) that can create point mutations with no external genetic material added, comparable to classic mutagenesis techniques. Creating point mutations without transgenic technology or classical mutagenesis, was not possible until before CRISPR/Cas has been utilized in insect molecular biology. The technology has been adapted to important insect pests like the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Meccariello *et al.,* 2017) and lately been optimized for high-efficiency genome editing that is able to create desired mutations in up to 90% of the progeny (Aumann *et al.*, 2018). Generating strains by CRISPR/Cas that carry only a small mutation to induce the desired effect would be a breakthrough for integrated pest management and mosquito control if regulatory issues could be overcome.

## Outlook

More than 50 years of area-wide and large-scale SIT programs have yielded in a wealth of knowledge on the genetics of the Mediterranean fruit fly as a model organism for several other economically important pest insects. This knowledge, e.g., on sexing and marking strains accrued via classical genetics and mutagenesis and once biologically and biochemically fully understood, will be an essential hallmark of developing and bringing similar tools to new pest species and control them as efficient and sustainable as the SIT has pioneered it for this pest insects. The use of gene editing and genome engineering will boost this development further and allow the modification of more candidate insects for SIT programs in the long-term. The decision, if such strains qualify in the end, should be based on scientific facts. Critical for environmentally friendly pest control in agriculture will be products that help reduce the use of harmful substances applied for insect control to a minimum. It would be desirable if identical genetic changes, which were generated by different methods, will no longer be classified according to their production process, but based on the end product obtained. In this respect, a globally uniform regulatory process would be crucial, but at this time no harmonization is in sight. In the end, ideologies cannot be the driving factor for regulatory approval and policy, but evidence of scientific studies that aim for a safe and well-tested product. Expressing it according to the novelist Gertrude Stein: “a mutation is a mutation is a mutation” – no matter how it was created.

## References


Aumann R.A., Schetelig M.F., Häcker I., 2018 – *Highly efficient genome editing by homology-directed repair using Cas9 protein in* Ceratitis capitata. - Insect Biochem. Mol. Biol., 101: 85-93.

Benedict M.Q., Robinson A.S., 2003 – *The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique*. - Trends Parasitol., 19(8): 349-355.

Cini A., Ioriatti C., Anfora G., 2012 – *A review of the invasion of* Drosophila suzukii *in Europe and a draft research agenda for integrated pest management.* - Bulletin of Insectology, 65(1): 149-160.

Dowell R., Siddiqui I., Meyer F., Spaugy E., 2000 – *Mediterranean fruit fly preventive release program in Southern California*. Area-wide management of fruit flies and other major insect pests. T. Hong. Penang, Malaysia, Universiti Sains Malaysia Press.

Finger R., 2018 – *Take a holistic view when making pesticide policies stricter*. - Nature, 556 (7700): 174.

Heinze S.D., Kohlbrenner T., Ippolito D., Meccariello A., Burger A., Mosimann C., Saccone G., Bopp D., 2017 – *CRISPR-Cas9 targeted disruption of the* yellow *ortholog in the housefly identifies the* brown *body locus*. - Sci. Rep., 7(1): 4582.

Kalajdzic P., Schetelig M.F., 2017 – *CRISPR/Cas-mediated gene editing using purified protein in* Drosophila suzukii. - Entomologia Experimentalis et Applicata, 164(3): 350-362.

Li J., Handler A.M., 2017 – *Temperature-dependent sex-reversal by a transformer-2 gene-edited mutation in the spotted wing drosophila,* Drosophila suzukii. - Sci. Rep., 7(1): 12363.

Meccariello A., Monti S.M., Romanelli A.,, Colonna R., Primo P., Inghilterra M.G., Del Corsano G., Ramaglia

A., Iazzetti G., Chiarore A., Patti F., Heinze S.D., Salvemini M., Lindsay H., Chiavacci E., Burger A., Robinson M.D., Mosimann C., Bopp D., Saccone G., 2017 – *Highly efficient DNA-free gene disruption in the agricultural pest* Ceratitis capitata *by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes*. - Sci. Rep., 7(1): 10061.

Ogaugwu C.E., Schetelig M.F., Wimmer E.A., 2013 – *Transgenic sexing system for* Ceratitis capitata *(Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 43(1): 1-8.

Parker A.G., 2005 – *Mass-rearing for sterile insect release.* In: Sterile insect technique - principles and practice in area-wide integrated pest management; V.A. Dyck, J. Hendrichs and A.S. Robinson, Dordrecht, NL, Springer: 209-232.

Robinson A.S., 2002 – *Genetic sexing strains in medfly,* Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes*. - Genetica, 116(1): 5-13.

Schetelig M.F., Handler A.M., 2012 – *A transgenic embryonic sexing system for* Anastrepha suspensa *(Diptera: Tephritidae).* - Insect Biochem. Mol. Biol., 42(10): 790-795.

Schetelig M.F., Targovska A., Meza J.S., Bourtzis K., Handler A.M., 2016 – *Tetracycline-suppressible female lethality and sterility in the Mexican fruit fly,* Anastrepha ludens. - Insect Mol. Biol., 25(4): 500-508.

Siebert J.A., 1994 – *Economic impact of an embargo by Japan, Korea, Taiwan, and Hong Kong of selected California exports due to a Mediterranean fruit fly infestation.* Berkeley, CA, University of California.

Walsh D.B., Bolda M.P., Goodhue R.E., Dreves A.J., Lee J., Bruck D.J., Walton V.M., O'Neal S.D., Zalom F.G., 2011 – Drosophila suzukii *(Diptera: Drosophilidae): Invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential.* - Journal of Integrated Pest Management, 2(1): DOI: 10.1603/IPM10010.

Yan Y., Linger R.J., Scott M.J., 2017 – *Building early-larval sexing systems for genetic control of the Australian sheep blow fly* Lucilia cuprina *using two constitutive promoters.* - Sci. Rep., 7(1): 2538.

Yan Y., Scott M.J., 2015 – *A transgenic embryonic sexing system for the Australian sheep blow fly* Lucilia cuprina*.* - Sci. Rep., 5: 16090.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 115-121*

# SEX DETERMINATION AND GENE EDITING IN TEPHRITIDS: CONVERGING ON INNOVATIVE BIOCONTROL STRATEGIES

GIUSEPPE SACCONE[a]

[a] *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II - Via Cinthia, 80126, Italy;* e-mail: giuseppe.saccone@unina.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2018.

*Sex determination and gene editing in Tephritids: converging on innovative biocontrol strategies*

The Tephritidae family includes more than 250 species of relevant economic importance in agriculture due to damage caused to a wide range of fruit hosts. Among them, *Ceratitis capitata* (Mediterranean fruit fly, medfly) is one of the top invasive and destructive species worldwide, affecting over 200 vegetal species alone. One of the most successful biocontrol strategies to fight the presence of the medfly in the orchads, to date, has been the Sterile Insect Technique (SIT). SIT consists of the continuous mass-release of laboratory-reared and sorted sterile males that through mating with wild females can suppress or even eradicate wild populations. A key component of the medfly SIT programs has been the close physical linkage of selectable traits to the Y-linked M factor, enabling male separation on massive scales (resistance of XY embryos to heat shocks or brown pupae colour of XY individuals versus respectively temperature sensitive lethality and white pupae colour of the XX individuals). An alternative to the male sex separation from females is the sexual transformation of XX individuals into males, which has been achieved only after isolating key sex determining genes of the medfly and using reverse genetic tools, such as RNAi and transgenesis. The recent emergence of the CRISPR/Cas9 not only opened new possibilities of functional genomics in non-model insect species, but also led to the development of novel gene drive strategies in the lab, including manipulation of sex ratio toward future suppression of infesting insect populations in the wild.

KEY WORDS: agricultural pest insects, sex determination, Sterile Insect Technique, transgenic, CRISPR/CAS9, gene drive.

## SEX DETERMINATION IN TEPHRITIDS

True Flies (Diptera) are one of four super radiations of insects together with Coleoptera, Hymenoptera and Lepidoptera and consist of one of the most diverse animal orders on Earth, accounting for more than 124.000 species and sharing an approximately 240 mya old insect ancestor (WIEGMANN *et al*., 2011). Not surprisingly, sex determining mechanisms have been found to differ even within the same species (BACHTROG *et al*., 2014; BEUKEBOOM and PERRIN, 2014; BOPP *et al*., 2014; HAAG AND DOTY, 2005; SANCHEZ, 2008; SUZUKI, 2018). Interestingly, the different upstream primary signals seem to act throughout a conserved master gene for female sex determination, *transformer* (*Cctra*), which controls sex-specific expression of a widely conserved sex differentiation gene, *doublesex (Ccdsx*) (NAGARAJU and SACCONE, 2010). The *Drosophila melanogaster* orthologues, *tra* and *dsx*, are also needed for female sex determination (SANCHEZ, 2008). Sex determination studies of major agricultural pests, such as *Ceratitis capitata* and other Tephritidae species, is of economical relevance, because only females damage the fruit crop of hundreds of species by oviposition. In medfly, a deletion mapping localized the *Male determining* factor on the long arm of the Y chromosome nearby the centromere (WILLHOEFT and FRANZ, 1996). The *M* factor acts by repressing, either directly or indirectly the female determining master gene *transformer* (*Cctra*), during embryogenesis (PANE *et al*., 2002) (Fig. 1). In XY embryos, *Cctra* starts to be zygotically transcribed and male-specific longer isoforms appear at 5-6 h leading to translation of truncated non functional CcTRA isoforms (GABRIELI *et al*., 2010). Interestingly, fertile XX males, expressing male-specific *Cctra* transcripts, but lacking the Y chromosome, can be artificially obtained by transient embryonic RNAi targeting *Cctra* or *Cctransfromer-2* (*Cctra-2*), which is also required as an essential auxiliary factor for female sex determination (PANE *et al*., 2002; SALVEMINI *et al*., 2009). *Cctra* encodes a female-specific RS-type splicing factor and, differently from *Drosophila*, promotes its expression by female-specific alternative splicing of its own pre-mRNA, maintaining female sex determination. On the other hand, as in Drosophila, it induces female sexual differentiation throughout female-specific splicing of the downstream *doublesex* (*Ccdsx;* Fig. 1) (PANE *et al*., 2002;

– Pubblicato marzo 2019

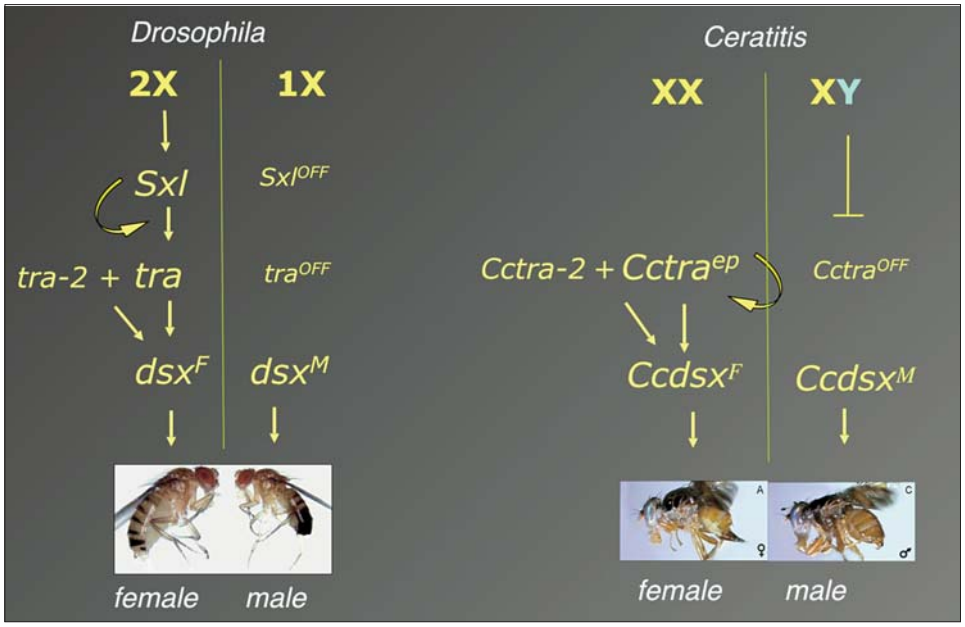



Fig. 1 – Evolutionary comparison of *Drosophila melanogaster* and *Ceratitis capitata* sex determination pathway. In Drosophila the primary signal is the number of X chromosomes and the master gene for sex determination is *Sex-lethal* (*Sxl*), which is able to autoregulate positively in XX individuals. In Ceratitis the primary signal is the Y-linked M factor repressing the establishment of the positive aturegulation of *transformer*, which plays the role of the master gene in the medfly. The Drosophila cascade is partially conserved in medfly, in other Tephritidae and many other insect species.

Saccone *et al*., 2008). *Cctra-2*, encoding a non sex-specific auxiliary SR splicing factor, is required for *Cctra* autoregulation, as well as for *dsx* female-specific splicing. *Ceratitis transformer* orthologues, showing conservation of this epigenetic function of autoregulation in females, have been isolated in other Tephritidae species (Lagos *et al*., 2007; Luo *et al*., 2017; Morrow *et al.,* 2014a and 2014b; Peng *et al*., 2015; Permpoon *et al*., 2011; Ruiz *et al.,* 2007; Ruiz and Sánchez, 2010; Saccone *et al*., 2011), in other dipteran species (Concha and Scott, 2009; Li *et al.,* 2013; Hediger *et al.*, 2010; Petrella *et al.,* 2019) and in other different insect orders (Hymenopteran and Coleoptera) (Bopp *et al*., 2014; Verhulst *et al.,* 2010). Transient embryonic RNAi of *tra* or *tra-2* orthologues in several Tephritidae species, including medfly, the Mexican fly *Anastrepha suspensa* and the oriental fly *Bactrocera dorsalis* led to complete sexual transformation of XX individuals into phenotypically males (Salvemini *et al.,* 2009; Sarno *et al.* 2010; Schetelig *et al.,* 2014).

Interestingly, in lower dipteran mosquitoes species, which maintain the evolutionary conservation of the downstream *dsx* sexual differentiation regulator, the *transformer* orthologues have not been identified, either because highly divergent or absent (Suzuki, 2018). Recent genomic and transcriptomic approaches to other dipterans sex determination led to the discovery of unrelated Y-linked genes male determining master regulators, encoding either novel short proteins, such as *Yob* (*Anopheles gambia*e) and *Guy-1* (*Anopheles stephensi*), or splicing factors-related proteins, such as *Mdmd* in *Musca domestica* (Criscione *et al*., 2016; Krzywinska *et al*., 2016; Sharma *et al*., 2017). In *Aedes aegypti* the male determining factor *Nix*, encoding a putative *tra-2* related splicing factor, was also found on one of the homomorphic sexual chromosomes. *Nix* seems to be conserved also in the mosquitoes tiger *Aedes albopictus*, which recently invaded also Italy (Hall *et al*., 2015; Gomulski *et al*., 2018). However, the molecular mechanisms by which these primary signals act are still to be clarified. The search of male determining genes in the medfly and related Tephritidae is still on going, in spite of the definition of its draft genome (Papanicolaou *et al*., 2016).

## Gene editing in Tephritids

Over the last two decades, novel genetic strategies in pest insect management have been developed to improve their effectiveness in the field (Dyck *et al*., 2005). Genetic technologies used thus far in the medfly are based on random integration of transposable elements into the genome, site-specific modification of the randomly integrated transgene and embryonic or transgene-mediated RNA interference (RNAi) (O'brochta and Handler, 2008). The CRISPR-Cas9 technology offers a novel approach also to stably introduce exogenous DNA sequences at pre-selected locations in the genome (Reid and O'Brochta, 2016). Cas9 is a bacterial protein evolved as part of an adaptive immune system able to recognize and cut viral DNA genomes (Doudna and Charpentier, 2014). The recognition is mediated by Watson-Crick base pairing of about 20 nt between a small bacterial RNA associated with Cas9 and the target DNA

sequence (Thurtle-Schmidt and Lo, 2018). This pairing is long enough to ensure its specific match and binding to a unique target DNA sequence because of the very highly specific combinatorial string (potential combinations are indeed $20^4$). These small RNAs containing vital information for bacteria – namely the code of the enemy – are transcribed from specific "immune genes" present in bacterial genome and, only later, are complexed with Cas9 to form ribonucleoparticles (RNPs). A part of the small guide RNA (gRNA) is composed of a variable sequence necessary to recognize the viral DNA, while another part is common and gives rise to an hairpin structure recognized by the Cas9 protein. Hence, these small RNA genes are composed of a mix of DNA of bacterial origin and of viral origin: the bacteria indeed acquire the enemy "codes", integrating 20 nt long DNA fragments from the viral genome into their specific immune genomic regions. The viral fragments are generated during the "fight" between bacteria and viruses and integrated in the genomes of surviving bacteria. In the bacterial cells, the targeted viral DNA is cut and degraded. A key discovery was the observation that Cas9-gRNA complex can work also *in vitro*, as many other bacterial useful enzymes for molecular biology (Jinek *et al*., 2012). The second key experiment was conducted in living eukaryotic cells which confirmed gene editing events, even targeting multiple DNA sites (Cong *et al*., 2013). Cas9 to can be directed by the gRNAs into specific genomic regions with the only restriction that an NGG trinucleotide sequence (PAM) is found following the pairing of 20 nt long specific sequence. The efficient ability of Cas9 to scan the entire genome, to find specific desired target sequence and to induce DNA breaks, even in these evolutionarily distant mammalian cells, was revealed by the imprecise response of the cells in repairing them. Indeed, during DNA repair, the erroneous addition or deletion of few base pairs in the broken DNA site led to mutant alleles of that targeted gene, which was revealed by usual DNA cloning and sequencing techniques. The eukaryotic cells can respond also in a second way, if an exogenous DNA fragment which has homology to the targeted broken site, is co-delivered: the cells repair the DNA damage using the exogenous DNA sequence as template. Hence the donor DNA sequence can be designed to introduce specific nucleotide substitutions, which are indistinguishable from spontaneous mutations, or achieve high precise deletions or insertions of long genomic regions (Kim and Kim, 2014).

Then a plethora of methods were developed to delivery Cas9 and the gRNAs into cell lines and pluricellular organisms of any vegetal and animal species, provided that genomic and/or transcriptomic data are available and a specific gene to be targeted is identified. A convenient and widely used method to produce in vitro RNPs complexes is, for example, 1) to synthetize sequence-specific gRNAs by *in vitro* transcription of a synthetic DNA template (generated by PCR), 2) to express and purify recombinant Cas9 protein and 3) to pre-assemble them *in vitro*. The use of preloaded Cas9-sgRNA ribonucleoprotein complexes in embryos injections has already been successfully applied to target genes for disruption in a growing number of insect species (Reid and O'Brochta, 2016).

Also in *Ceratitis capitata* and other Tephritidae species, including the oriental fly *Bactrocera dorsalis* and Anastrepha species, the preferred methods are embryos injections of RNPs, or embryos co-injections with *in vitro* synthetized mRNA encoding the Cas9 (which it will be translated into protein by the insect cells once in the cytoplasm) and the gene-specific gRNA (Meccariello *et al*., 2017; Lee *et al*., 2014; Li and Handler, 2019; Sim *et al*., 2018; Zhao *et al*., 2018; Zheng *et al*., 2018 ). Gene specific mutations (mostly in a gene controlling insect eye colour) were introduced in the genomes of dividing embryonic cells of both somatic and germ lines, leading to adult flies with patches of cells (mosaics) which can show a mutant phenotype (caused by biallelic mutations in the same founder cells of that expanded cellular clone). These adult flies from treated embryos can be crossed and a second generation will lead to mutant flies bearing heteroallelic mutant alleles (loss of function alleles of the same gene showing different insertion/deletions in the specific targeted sequence). Considering that rearing Tephritidae is very laborious, the possibility to screen for mutant individuals in only 2 generations is a very attractive solution.

## Converging toward biocontrol strategies

*Ceratitis capitata* apparently emerged in Africa and colonized other continents in the last centuries, expanding in those areas dedicated to extensive fruit crop production. Similarly other Tephritidae are also relevant agricultural pests and invades new regions (Qin *et al*., 2015). Very recently, for example the highly invasive oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, was detected for the first time in Europe (Nugnes *et al*., 2018).

As alternative to pesticides and pheromonal traps, it has been developed and successfully applied in many countries the sterile insect technique (SIT)

(Dyck *et al*., 2005). SIT consists of the continuous mass-release of males, following their mass-rearing, their sorting from females and their sterilization by X or gamma rays factory-reared. This genetic technique relies on the introduction of excessive numbers of only sterile males in infested areas and hence requires large-scale rearing and sorting of males and females prior to release. The sexing is necessary because the released males tend to mate with the release females and the released sterile females would contribute to the physical damage of the fruits by their telescopic ovipositors. Their mating with wild females can suppress or even eradicate wild populations and hence, SIT is eco-friendly and species-specific.

A key component of the modern medfly SIT programs has been the sexing of males before adult stage, achieved by serendipitous identification of 2 genetic autosomal linked mutations in the medfly (Caceres, 2002). Chromosomal reciprocal translocations were induced by X-rays between the autosome and the Y chromosome. A close physical linkage of two selectable traits to the Y-linked M factor, enabled male separation on massive scales (resistance to heat shocks of XY embryos and a XY-specific brown pupae colour). However, the export of this sexing strategy to other Tephritidae pest species also requiring an SIT control, was challenging. Molecular genetics and biotechnology have been proposed, almost 3 decades ago, to speed up the development of a "universal" solution for sexing in insect pests and improve it efficacy and stability (Louis *et al*., 1988). The development of gene transfer in the medfly (Loukeris *et al*., 1995; Zwiebel *et al*., 1995) and the exploitation of the regulatory region of *Cctra* responsible for female-specific splicing and expression of CcTRA protein led to develop both *Ceratitis* and *Drosophila* transgenic strains in which female-specific lethality is conditional and repressible by an antidote provided in the larvae and adult diet (Dafa'alla *et al*., 2010).

An alternative to the male sex separation by XX-specific lethality is the sexual transformation of XX individuals into XX males, which has been achieved only after isolating key sex determining genes of the medfly. RNA interference against *Cctra* or *Cctra-2* led to male-only progeny (showing both XY and XX karyotypes) with few XX intersexes (Pane *et al*., 2002; Salvemini *et al*., 2009). Interestingly, the XX males are also fertile, indicating the absence of major fertility factors on the Y chromosome. Similar results have been obtained in other Tephritidae species. Based on this knowledge, transgenic strains could be produced, in which an inducible transgene producing *Cctra* dsRNA into embryos can result in male-specific *Cctra* splicing and masculinization of XX individuals. The evolutionary conservation of Ceratitis *transformer* autoregulating master gene in other Tephritidae species, suggests that it is an ideal genetic tool to generalize a method for male-only production. However, the emergence of the CRISPR/Cas9 technology opened new opportunities for innovation and translational research. Indeed, Cas9 and gRNAs can be expressed stably in transgenic flies either during all development and in all cells, or in germ line specific pattern (Papathanos *et al*., 2009). If the transgenic construct bears also DNA homology arms flanking the Cas9-sgRNA transgenes and corresponding to the targeted endogenous sequence, then a specific integration of the entire artificial segment can be induced. Indeed, once the vector is injected into the embryos and it starts to be transcribed in the germ cells, the DNA breaks induced in a specific region and the homology arms paired to that region can lead to a DNA repair response by the homologous recombination pathway. The artificial construct including Cas9+gRNA is copied into the homologous cut DNA region and a transgene-bearing chromosome is generated. The process can be repeated by the dividing cells because the transgenic construct stably integrated in the specific genomic region can be transcribed and produce again Cas9 protein and sgRNA, which can be assembled in RNPs and cut the DNA target sequence present on the homologous chromosome. During cell divisions of the germ line, a "chain reaction" of this self-propagating cassette leads to the production of gametes which are all transgenic. If this transgenic insect is mated with a non transgenic one, generates a progeny of heterozygotes individuals. However, in the germ lines of these transgenic heterozygotes Cas9+gRNA starts again the cut and copy mechanism onto the homologous wild chromosome, during mitosis of the stem cells leading to homozygosity of the transgenes and, after meiosis, 100% super-mendelian inheritance of the transgenic cassette (Gantz and Bier, 2015). This mechanism could be exploited to manipulated sex bias in favor of males (Galizi *et al*., 2016) and to drive in wild populations of pest insect species, transgenes able for example to induce a reduction in their reproduction potential or "immunization" to pathogens. Gene drives were already developed in lab strains of malaria vectors including *Anopheles gambiae* (Hammond *et al*., 2016; Kyrou *et al*., 2018) and *A. stephensi* (Gantz *et al*., 2015) and induced a collapse in cage experiments after few generations. However, technical, ecological, political and social issues need to be addressed, before this technology using genetically modified

insects could move from the lab into the wild (Adelman *et al*., 2017; Karaminejadranjbar *et al*., 2018; Taning *et al*., 2017).

An appealing alternative to GM insects, based on gene editing by CRISPR/Cas9, is the development of non transgenic insects bearing highly specific nucleotides substitutions and able to produce conditionally male only progeny (Li and Handler, 2017; Aumann *et al*., 2018). In *Drosophila melanogaster* two temperature-sensitive (*ts*) mutations (each involving a single amino acid substitution) have been described in the gene *transformer-2*. *tra-2* encodes an auxiliary splicing factor required for female-specific *transformer* splicing. In these mutant strains, higher rearing temperature leads XX individuals to develop into XX male. First attempts have been made to replicate the very same *tra-2* mutations in the genome of the spotted wing *Drosophila suzuki*, an emerging agricultural pest (Li and Handler, 2017). Considering the high evolutionary conservation of *tra-2* sequence and function in Tephritidae, it is possible to develop novel sexing methods in different species, without integrating exogenous DNA sequences.

## Conclusions

DNA-free genome modifications with the use of purified Cas9 endonuclease may be more acceptable to the public and considered legally legitimate by governments (Courtier-Orgogozo *et al*., 2017). This approach may in the long term help to gain social and political acceptance including even the release of genetically modified pest insects, as it was the case for *Aedes aegypti* in Brazil (Carvalho *et al*., 2015; Paes de Andrade *et al*., 2016). The recent availability of the medfly genome sequence and the ongoing genome projects in other Tephritids combined with the successful implementation of CRISPR/Cas9 genome editing technology open the road to rapidly gain more fundamental knowledge on genetics of sex determination and move toward translation research.

## ACKNOWLEDGMENTS

GS thanks Luigi Vitagliano (IBB-CNR, NA; Unisannio, BN) for providing comments to the manuscript.

## REFERENCES

Adelman Z., Akbari O., Bauer J., Bier E., Bloss C., Carter S.R., Callender C., Denis A.C., Cowhey P., Dass B., Delborne J., Devereaux M., Ellsworth P., Friedman Rm., Gantz V., Gibson C., Hay Ba., Hoddle M., James A.A., James S., Jorgenson L., Kalichman M., Marshall J., Mcginnis W., Newman J., Pearson A., Quemada H., Rudenko L., Shelton A., Vinetz J.M., Weisman J., Wong B., Wozniak C., 2017 – *Rules of the road for insect gene drive research and testing* - Nat Biotechnol. 2017 Aug 8;35(8): 716-718. doi: 10.1038/nbt.3926.

Aumann R.A., Schetelig M.F., Häcker I., 2018 – *Highly efficient genome editing by homology-directed repair using Cas9 protein in* Ceratitis capitata. - Insect Biochem Mol Biol. 2018 Oct;101: 85-93. doi: 10.1016/j.ibmb .2018.08.004.

Bachtrog D., Mank J.E., Peichel C.L., Kirkpatrick M., Otto S.O., Ashman T.L., Hahn M.W., Kitano J., Mayrose I., Ming R., Perrin N., Ross L., Valenzuela N., Vamosi J.C., 2014 – *Sex determination: why so many ways of doing it?* - PLoS Biol., 12(7): e1001899.

Beukeboom L.W., Perrin N., 2014 – *The Evolution of Sex Determination*. - Oxford and New York: Oxford University Press. ISBN: 978-0-19-965714-8

Bopp D., Saccone G., Beye M., 2014 – *Sex determination in insects: variations on a common theme.* - Sex Dev., 8, 20-28, doi: 10.1159/000356458.

Caceres C., 2002 – *Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly* (Ceratitis capitata). - Genetica, 116: 107-116.

Carvalho D.O., McKemey A.R., Garziera L., Lacroix R., Donnelly C.A., Alphey L., Malavasi A., Capurro M.L., 2015 – *Suppression of a Field Population of* Aedes aegypti *in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes* - PLoS Negl Trop Dis., 9(7): e0003864. doi: 10.1371/journal.pntd.0003864.

Courtier-Orgogozo V., Morizot B., Boëte C., 2017 – *Agricultural pest control with CRISPR-based gene drive: time for public debate. Should we use gene drive for pest control?* - EMBO Rep., 18(6): 878-880 (2017).

Concha C., Scott M.J., 2009 – *Sexual development in* Lucilia cuprina *(Diptera, Calliphoridae) is controlled by the transformer gene.* - Genetics, 2009 Jul; 182(3): 785-98. doi: 10.1534/ genetics. 09.100982

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F., 2013 – *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.* - Science, 2013 Feb 15; 339(6121): 819-23. doi: 10.1126/science.1231143

Criscione F., Qi Y., Tu Z., 2016 – *GUY1 confers complete female lethality and is a strong candidate for a male-determining factor in* Anopheles stephensi. - eLIFE, 5 (2016).

Dafa'alla T., Fu G., Alphey L., 2010 – *Use of a regulatory mechanism of sex determination in pest insect control.* - J. Genet., 89(3): 301-5.

Doudna J.A., Charpentier E., 2014 – *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9.* – Science, 2014 346(6213): 1258096. doi: 10.1126/science Genome editing.

Dyck V.A., Hendrichs J.P., Robinson A.S., 2005 – *The Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management.* - Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Gabrieli P., Falaguerra A., Siciliano P., Gomulski L.M., Scolari F., Zacharopoulou A., Franz G., Malacrida A.R., Gasperi G., 2010 - *Sex and the single embryo: early development in the Mediterranean fruit fly,* Ceratitis capitata. - BMC Dev. Biol. 2010 Jan 26; 10:12. doi: 10.1186/1471-213X-10-12.

Galizi R., Hammond A., Kyrou K., Taxiarchi C., Bernardini F., O'loughlin S.M., Papathanos P.A.,

Nolan T., Windbichler N., Crisanti A., 2016 – *A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control.* - Sci. Rep., 6: 31139.

Gantz V.M., Bier E. 2015 – *Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations*. - Science, 348(6233): 442-4. doi: 10.1126/science.aaa5945.

Gantz V.M., Jasinskiene N., Tatarenkova O., Fazekas A., Macias V.M., Bier E., James A.A., 2015 – *Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito* Anopheles stephensi. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112 (49): E6736-43. doi: 10.1073/pnas.1521077112.

Gomulski LM, Mariconti M, Di Cosimo A, Scolari F, Manni M, Savini G, Malacrida AR, Gasperi G. 2018 - *The* Nix *locus on the male-specific homologue of chromosome 1 in* Aedes albopictus *is a strong candidate for a male-determining factor.* - Parasit Vectors., 11(Suppl 2): 647. doi: 10.1186/s13071-018-3215-8.

Haag E.S., Doty A.V., 2005 – *Sex determination across evolution: connecting the dots*. - PLoS Biol., (1): e21.

Hall A.B., Basu S., Jiang X., Qi Y., Timoshevskiy V.A., Biedler J.K., Sharakhova M.V., Elahi R., Anderson M.A., Chen X.G., Sharakhov I.V., Adelman Z.N., Tu Z., 2015 – *A male-determining factor in the mosquito* Aedes aegypti. - Science, 348(6240): 1268-70. doi: 10.1126/science.aaa2850.

Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Simoni A., Siniscalchi C., Katsanos D., Gribble M., Baker D., Marois E., Russell S., Burt A., Windbichler N., Crisanti A., Nolan T., 2016 – *A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector* Anopheles gambiae. - Nature Biotechnology, 34: 78-83. doi: 10.1038/nbt.3439.

Hediger M., Henggeler C., Meier N., Perez R., Saccone G., Bopp D., 2010 – *Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly.* - Genetics, 184: 155-170.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E., 2012 – *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.* - Science, 337(6096): 816-21. doi: 10.1126/science.1225829.

Karaminejadranjbar M., Eckermann K.N., Ahmed H.M.M., Sánchez C.H.M., Dippel S., Marshall J.M., Wimmer E.A., 2018 – *Consequences of resistance evolution in a Cas9-based sex conversion-suppression gene drive for insect pest management*. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 115(24): 6189-6194. doi: 10.1073/pnas.1713825115.

Kim H., Kim J.S., 2014 – *A guide to genome engineering with programmable nucleases*. – Nat. Rev. Genet., 15: 321-334.

Kyrou K., Hammond A.M., Galizi R., Kranjc N., Burt A., Beaghton A.K., Nolan T., Crisanti A., 2018 – *A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged* Anopheles gambiae *mosquitoes.* - Nat Biotechnol., 36(11): 1062-1066. doi: 10.1038/nbt *4245.*

Krzywinska E., Dennison N.J., Lycett G.J., Krzywinski J., 2016 – *A maleness gene in the malaria mosquito* Anopheles gambiae. - Science, 353: 67-69 (2016).

Lagos D., Koukidou M., Savakis C., Komitopoulou K., 2007 – *The transformer gene in* Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate.* - Insect Mol Biol, 16: 221-230.

Lee J.S Lee Js, Kwak Sj, Kim J, Kim Ak, Noh Hm, Kim Js, Yu K. 2014 - *RNA-Guided Genome Editing in* Drosophila *with the Purified Cas9 Protein.* - G3-Genes Genom Genet, 4: 1291-1295.

Li F., Vensko S.P., Belikoff E.J., Scott M.J., 2013 – *Conservation and sex-specific splicing of the transformer gene in the calliphorids* Cochliomyia hominivorax, Cochliomyia macellaria *and* Lucilia sericata. - PLoS One, 2013; 8(2): e56303. doi: 10.1371/journal. pone. 0056303.

Li J., Handler A.M., 2017 – *Temperature-dependent sex-reversal by a transformer-2 gene-edited mutation in the spotted wing drosophila,* Drosophila suzukii. 2017 - Sci Rep., 7(1):12363. doi: 10.1038/s41598-017-12405-4.

Li J., Handler A.M., 2019 – *CRISPR/Cas9-mediated gene editing in an exogenous transgene and an endogenous sex determination gene in the Caribbean fruit fly,* Anastrepha suspensa. 2019 – Gene, 691: 160-166. doi: 10.1016/j.gene.2018.12.055.

Louis C., Savakis C., Kafatos F.C., 1988 – *Possibilities for genetic engineering in insects of economic interest.* In: Modern Insect Control: Nuclear Techniques and Biotechnology. - International Atomic Energy Agency. ISBN 92-0-010388-X

oukeris T.G., Livadaras I., Arcà B., Zabalou S., Savakis C. 1995 – *Gene transfer into the medfly,* Ceratitis capitata, *with a* Drosophila hydei *transposable element.* – Science, 270(5244): 2002-5.

Luo Y., Zhao S., Li J., Li P., Yan R.J., 2017 – *Isolation and Molecular Characterization of the Transformer Gene From* Bactrocera cucurbitae *(Diptera: Tephritidae)*. - Insect Sci., 2017 Jan 1; 17(2). doi: 10.1093 /j I s e s a / iex031.

Meccariello A., Monti S.M., Romanelli A., Colonna R., Primo P., Inghilterra M.G., Del Corsano G., Ramaglia A., Iazzetti G., Chiarore A., Patti F., Heinze S.D., Salvemini M., Lindsay H., Chiavacci E., Burger A., 2017 – *Highly efficient DNA-free gene disruption in the agricultural pest* Ceratitis capitata *by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes*. - Sci. Rep., 10061, doi: 10.1038/s41598-017-10347-5.

Morrow J.L., Riegler M., Gilchrist A.S., Shearman D.C., Frommer M., 2014a – *Comprehensive transcriptome analysis of early male and female* Bactrocera jarvisi *embryos*. - BMC Genet., 2014; 15 Suppl 2:S7. doi: 10.1186/1471-2156-15-S2-S7.

Morrow J.L., Riegler M., Frommer M., Shearman D.C., 2014b – *Expression patterns of sex-determination genes in single male and female embryos of two* Bactrocera *fruit fly species during early development.* - Insect Mol. Biol., 6: 754-67. doi: 10.1111/imb.12123.

Nagaraju J., Saccone G., 2010 – *How is sex determined in insects?* - Preface. – J. Genet., 89(3):269-270.

Nugnes, F., Russo, E., Viggiani, G., Bernardo U., 2018 - *First Record of an Invasive Fruit Fly Belonging to* Bactrocera dorsalis *Complex (Diptera: Tephritidae) in Europe.* - Insects, 9 (2018).

O'brochta D.A., Handler A.M., 2008 – *Perspectives on the state of insect transgenics.* - Adv. Exp. Med. Biol., 627: 1-18. doi: 10.1007/978-0-387-78225-6_1.

Paes de Andrade P., Aragão F.J., Colli W., Dellagostin O.A., Finardi-Filho F., Hirata M.H., Lira-Neto A.C., Almeida de Melo M., Nepomuceno A.L., Gorgônio d.a. Nóbrega F., Delfino de Sousa G., Valicente F.H., Zanettini M.H. 2016 – *Use of transgenic* Aedes aegypti *in Brazil: risk perception and assessment.* - Bull. World Health Organ., 94 (10): 766-771.

Pane A., Salvemini M., Delli Bovi P., Polito L.C., Saccone G., 2002 – *The transformer gene in* Ceratitis capitata *provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate.* - Development, 129: 3715–3725.

Papanicolaou *et al.*, 2016 – *The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly,* Ceratitis capitata *(Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species.* - Genome Biol., 17 : 192, doi:10.1186/s13059-016-1049-2.

Papathanos P.A., Windbichler N., Menichelli M., Burt A., Crisanti A., 2009 – *The vasa regulatory region mediates germline expression and maternal transmission of proteins in the malaria mosquito* Anopheles gambiae*: a versatile tool for genetic control strategies.* - BMC Mol. Biol., 2009 Jul 2, 10: 65. doi: 10.1186/1471-2199-10-65.

Peng W., Zheng W., Handler A.M., Zhang H., 2015 - *The role of the transformer gene in sex determination and reproduction in the tephritid fruit fly,* Bactrocera dorsalis (Hendel). - Genetica, 143(6): 717-27. doi: 10.1007/s10709-015-9869-7.

Permpoon R., Aketarawong N., Thanaphum S., 2011 – *Isolation and characterization of Doublesex homologues in the* Bactrocera *species*: B. dorsalis *(Hendel) and* B. correcta *(Bezzi) and their putative promoter regulatory regions*. - Genetica, 2011 Jan., 139(1): 113-27. doi: 10.1007/s10709-010-9508-2.

Petrella V., Aceto S., Colonna V., Saccone G., Sanges R., Polanska N., Volf P., Gradoni L., Bongiorno G., Salvemini M., 2019 – *Genomics and transcriptomics to unravel sex determination pathway and its evolution in sand flies*. - BioRxiv 510586 ; doi : https://doi. org/10.1101/510586.

Qin Y., Paini D.R., Wang C., Fang Y., Li Z., 2015 – *Global establishment risk of economically important fruit fly species (*Tephritidae*)*. - PLoS One, 10: e0116424, doi:10.1371/journal.pone.0116424.

Reid W., O'Brochta D.A., 2016 - *Applications of genome editing in insects.* – Curr. Opin. Insect Sci. 13: 43-54.

Ruiz M.F., Milano A., Salvemini M., Eirín-López J.M., Perondini A.L., Selivon D., Polito L.C., Saccone G., Sánchez L., 2007 – *The gene transformer of* Anastrepha *fruit flies (*Diptera, Tephritidae*) and its evolution in insects.* - PLoS One, 28: e1239.

Ruiz M.F., Sánchez L., 2010 – *Effect of the gene transformer of* Anastrepha *on the somatic sexual development of* Drosophila. - Int. J. Dev. Biol., 2010; 54(4): 627-33. doi: 10.1387/ijdb.092917fr.

Saccone G., Salvemini M., Pane A., Polito L.C. 2008 – *Masculinization of XX Drosophila transgenic flies expressing the* Ceratitis capitata *DoublesexM isoform*. – Int. J. Dev. Biol., 52(8): 1051-7. doi: 10.1387/ijdb.082657gs.

Saccone G., Salvemini M., Polito L.C., 2011 – *The transformer gene of* Ceratitis capitata*: a paradigm for a conserved epigenetic master regulator of sex determination in insects*. - Genetica, 139(1): 99-111. doi: 10.1007/s10709-010-9503-7.

Salvemini M., Robertson M., Aronson B., Atkinson P., Polito L.C., Saccone G., 2009 – Ceratitis capitata *transformer-2 gene is required to establish and maintain the autoregulation of Cctra, the master gene for female sex determination.* - Int. J. Dev. Biol., 53: 109–120.

Sanchez L., 2008 – *Sex-determining mechanisms in insects.* - Int. J. Dev. Biol., 52: 837-856. doi:10.1387/ijdb.072396ls.

Sarno F., Ruiz M.F., Eirín-López J.M., Perondini A.L., Selivon D., Sánchez L., 2010 – *The gene transformer-2 of* Anastrepha *fruit flies (*Diptera, Tephritidae*) and its evolution in insects*. - BMC Evol. Biol., 10: 140. doi: 10.1186/1471-2148-10-140.

Schetelig M.F., Milano A., Saccone G., Handler A.M., 2012 – *Male only progeny in* Anastrepha suspensa *by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females* - Insect Biochem. Mol. Biol., 42(1): 51-7. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.10.007

Sharma A., Heinze S.D., Wu Y., Kohlbrenner T., Morilla I., Brunner C., Wimmer E.A., Van De Zande L., Robinson M.D., Beukeboom L.W., Bopp D., 2017 – *Male sex in houseflies is determined by Mdmd, a paralog of the generic splice factor gene CWC22*. - Science, 642-645.

Sim S.B., Kauwe A., Ruano R., Rendon P., Geib S.M., 2018 – *The ABCs of CRISPR in* Tephritidae: *developing methods for inducing heritable mutations in the genera* Anastrepha, Bactrocera *and* Ceratitis. - Insect Mol. Biol., 2018 Nov 13. doi: 10.1111/imb.12550.

Suzuki M.G., 2018 – *Sex Determination Cascade in Insects: A Great Treasure House of Alternative Splicing.* - In: Kobayashi K., Kitano T., Iwao Y., Kondo M. (eds) Reproductive and Developmental Strategies. Diversity and Commonality in Animals. Springer, Tokyo.

Taning C.N., Van Eynde B., Yu N., Ma S., Smagghe G., 2017 – *CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns.* - J. Insect Physiol., 98: 245–257 (2017).

Thurtle-Schmidt D.M., Lo T.W., 2018 – *Molecular Biology at the Cutting Edge: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates.* – Biochem. Mol. Biol. Educ., 2018 Mar., 46(2): 195-205. doi: 10.1002/bmb.21108.

Verhulst E.C., Van De Zande L., Beukeboom L.W., 2010 – *Insect sex determination: it all evolves around transformer*. - Curr. Opin. Genet. Dev., 2010 (4): 376-83.

Wiegmann B.M., Trautwein M.D., Winkler I.S., Barr N.B., Kim J.W., Lambkin C., Bertone M.A., Cassel B.K., Bayless K.M., Heimberg A.M., Wheeler B.M., Peterson K.J., Pape T., Sinclair B.J., Skevington J.H., Blagoderov V., Caravas J., Kutty S.N., Schmidt-Ott U., Kampmeier G.E., Thompson F.C., Grimaldi D.A., Beckenbach A.T., Courtney G.W., Friedrich M., Meier R., Yeates D.K., 2011 – *Episodic radiations in the fly tree of life*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 108 (14): 5690-5. doi: 10.1073/pnas.1012675108.

Willhoeft U., Franz G., 1996 – *Identification of the sex-determining region of the* Ceratitis capitata *Y chromosome by deletion mapping.* - Genetics, 144: 737-745 (1996).

Zhao S., Xing Z., Liu Z., Liu Y., Liu X., Chen Z., Li J., Yan R., 2018 – *Efficient somatic and germline genome engineering of* Bactrocera dorsalis *by the CRISPR/Cas9 system*. - Pest Manag. Sci., doi: 10.1002/ps.5305.

Zheng W., Li Q., Sun H., Ali M.W., Zhang H., 2018 – *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated 9-mediated mutagenesis of the multiple edematous wings gene induces muscle weakness and flightlessness in* Bactrocera dorsalis *(Diptera: Tephritidae)*. - Insect Mol. Biol., 2018 Sep 27. doi: 10.1111/imb.12540.

Zwiebel, L., Saccone, G., Zacharopoulou, A., Besansky, N, J., Favia, G., Collins, F. H., Louis, C., Kafatos, F. C., 1995 – *The* white *gene of C*eratitis capitata*: a phenotypic marker for germline transformation.* - Science, 270: 2005-2008.

122 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 123-128*

# ANTIGENI SALIVARI QUALI STRUMENTI EPIDEMIOLOGICI PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE UMANA AD *AEDES ALBOPICTUS*

BRUNO ARCÀ[a] - SARA BUEZO MONTERO[a] - FABRIZIO LOMBARDO[a]

[a] *Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive - Sezione di Parassitologia, Sapienza Università di Roma, P.le Aldo Moro 5 - 00185 Roma (Italy)*
Autore corrispondente: bruno.arca@uniroma1.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2018.

*Salivary antigens as epidemiological tools to evaluate human exposure to* Aedes albopictus

Hematophagous arthropods during feeding inject into their hosts a cocktail of salivary proteins whose main role is to allow for an effective blood meal by counteracting host hemostasis, inflammation and immunity. However, saliva of blood feeders also evokes in vertebrates an antibody response that can be used to evaluate exposure to disease vectors. Salivary transcriptome studies carried out in different hematophagous species in the last fifteen years clarified the complexity of the salivary repertoires of blood feeding arthropods, pointing out that salivary proteins evolve at a fast evolutionary rate and highlighting the existence of family-, genus- and sometime even species-specific salivary proteins. Focusing on mosquitoes of the genera *Anopheles* and *Aedes*, which are important vectors of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and of several arboviruses, we summarize here recent efforts to exploit genus-specific salivary proteins as biomarkers of human exposure to these vectors of large relevance for public health.

KEY WORDS: blood feeding, salivary proteins, biomarkers, *Anopheles*, *Aedes.*

## INTRODUZIONE

La capacità di utilizzare una fonte alimentare ricca di aminoacidi quali il sangue dei vertebrati ha certamente conferito agli insetti ematofagi un considerevole vantaggio riproduttivo. Tuttavia, nutrirsi di sangue è un compito notevolmente impegnativo che ha richiesto l'evoluzione di complessi adattamenti comportamentali, morfologici e fisiologici tali da consentire all'insetto di localizzare l'ospite, attraversarne la barriera cutanea, quindi raggiungere, ingerire e digerire il sangue (LEHANE, 1991). È noto che il danno tissutale induce nei vertebrati risposte fisiologiche possenti e ridondanti atte a limitare le perdite di sangue, provvedere alla riparazione dei tessuti danneggiati e proteggerli dall'invasione di microorganismi. Per questi motivi, allo scopo di nutrirsi efficacemente di sangue, gli insetti ematofagi hanno evoluto un complesso armamentario di proteine salivari, parimenti possente e ridondante, capace di controbilanciare la risposta emostatica, infiammatoria ed immunitaria dell'ospite (RIBEIRO & ARCÀ, 2009). In effetti, la saliva di tutti gli artropodi ematofagi analizzati fino ad ora contiene almeno un inibitore piastrinico, un anticoagulante ed un vasodilatatore (Ribeiro, 1995); inoltre, nella saliva di queste specie si ritrovano anche numerose altre attività aggiuntive in grado di influenzare l'infiammazione e l'immunità dell'ospite (ARCÀ & RIBEIRO, 2018) ed eventualmente di interferire con la trasmissione di patogeni (FONTAINE *et al.*, 2011).

Grazie agli straordinari avanzamenti delle tecnologie di sequenziamento di acidi nucleici, nonché ai progressi delle tecniche proteomiche, la nostra comprensione della complessità, delle funzioni e dell'evoluzione delle proteine salivari di insetti ematofagi si è accresciuta in modo davvero considerevole negli ultimi quindici anni. Ad oggi gli studi di trascrittomica hanno consentito di ottenere informazioni sui sialomi (dal greco *sialo* = saliva) di almeno 49 specie di insetti ematofagi appartenenti a 3 differenti ordini (Ditteri, Emitteri e Sifonatteri). Queste analisi hanno rivelato che i repertori salivari della maggior parte dei Nematoceri ematofagi (come zanzare e flebotomi) includono ~100-200 proteine, mentre Brachiceri come la mosca tsetse ed Emitteri come la cimice Triatomina possono avere oltre 250 proteine salivari (ARCÀ & RIBEIRO, 2018). Attualmente, il ruolo fisiologico di numerose proteine salivari è stato chiarito attraverso studi funzionali oppure dedotto sulla base della similarità di sequenza a proteine note (NARASIMHAN *et al.*, 2017; RIBEIRO & ARCÀ, 2009). Tuttavia, è opportuno sottolineare che malgrado i considerevoli progressi ancora non abbiamo alcuna idea sulle possibili funzioni di circa il 30-40% delle putative proteine salivari identificate da insetti ematofagi.

– Pubblicato marzo 2019

## Antigeni salivari come strumenti epidemiologici

Le secrezioni salivari di artropodi ematofagi, a parte ed indipendentemente dalle proprietà biochimiche e farmacologiche delle proteine che le compongono, stimolano l'immunità umorale dei vertebrati. Di conseguenza, anticorpi circolanti diretti contro componenti salivari possono essere rivelati e misurati nei sieri di individui ripetutamente punti da artropodi. Numerosi studi hanno evidenziato come questa risposta anticorpale anti-saliva possa essere sfruttata per valutare l'esposizione dell'ospite a punture di artropodi vettori anche molto diversi fra loro come zecche, flebotomi, zanzare, mosche tsetse e cimici Triatomine (vedi Rizzo *et* al., 2011 per le referenze originali). Al momento, la valutazione dell'esposizione umana a Culicidi vettori si basa su misure entomologiche classiche della densità vettoriale, ed eventualmente sulla propensità ad effettuare il pasto di sangue sull'uomo (trappole, catture al piretro, catture sull'uomo, etc.). Tuttavia, queste metodologie forniscono soltanto misure indirette del grado di esposizione umana a punture del vettore. Inoltre, richiedono un notevole impegno lavorativo, sono relativamente costose ed in alcune circostanze possono essere di difficile o impossibile implementazione (bassa densità vettoriale o costrizioni logistiche). A questo riguardo la disponibilità di semplici saggi immunologici per misurare direttamente il contatto uomo-vettore rappresenterebbe uno strumento addizionale estremamente utile. Infatti, la valutazione della trasmissione/rischio di malattie trasmesse da Culicidi vettori si basa frequentemente su misurazioni serologiche delle risposte anticorpali ad antigeni virali o parassitari; quindi, la disponibilità di antigeni salivari vettore-specifici consentirebbe la valutazione simultanea della circolazione del patogeno e dell'esposizione umana al suo vettore. Infine, ma non meno importante, la messa a punto di marcatori salivari sarebbe estremamente utile anche per la valutazione dell'efficacia di misure anti-vettoriali (per es. zanzariere impregnate o interventi con larvicidi e/o adulticidi). Se da un lato la misurazione della risposta anti-saliva rappresenta un utile strumento epidemiologico, dall'altro lato l'uso della saliva o di estratti salivari è problematico. Innanzitutto, ottenere grandi quantità di saliva o di estratti è una procedura laboriosa, difficile da standardizzare e scarsamente riproducibile. In secondo luogo, la saliva di artropodi ematofagi, come in precedenza specificato, è una miscela complessa e può determinare fenomeni di cross-reattività che possono essere fuorvianti. Per questi motivi un saggio immunologico per valutare l'esposizione umana a vettori di malaria o di arbovirosi dovrebbe essere idealmente basata su singoli antigeni specifici rispettivamente di zanzare *Anopheles* o *Aedes*.

## Diversità delle proteine salivari di insetti ematofagi

Abbiamo già accennato alla grande quantità di informazioni ottenute negli ultimi dieci o quindici anni sui sialomi di insetti e artropodi ematofagi. Per quanto concerne i Culicidi attualmente sono disponibili trascrittomi salivari da 12 differenti specie appartenenti a 5 diversi generi (Arcà & Ribeiro, 2018). Inoltre, il recente sequenziamento completo dei genomi di 16 specie di *Anopheles* da diversi continenti ha fornito una opportunità unica di studiare l'evoluzione dei geni codificanti proteine salivari in un arco temporale che abbraccia circa 100 milioni di anni di radiazione delle anofeline (Arcà *et al.*, 2017; Neafsey *et al.*, 2015). Questa larga quantità di informazioni ha permesso di chiarire che i geni salivari delle anofeline, e verosimilmente degli artropodi ematofagi più in generale, evolvono ad un tasso accelerato, forse sotto la pressione selettiva dei sistemi immunitari degli ospiti (Arcà *et al.*, 2017; Arcà *et al.*, 2014; Neafsey *et al.*, 2015). Questo tasso evolutivo insolitamente elevato, insieme all'osservazione che l'ematofagia si è evoluta indipendentemente numerose volte (convergenza evolutiva), giustifica l'osservazione che i repertori salivari di insetti ematofagi consistono sia di proteine che sono ampiamente condivise fra differenti famiglie di insetti ma anche di proteine salivari famiglia-, genere- e persino specie-specifiche (Arcà & Ribeiro, 2018; Ribeiro & Arcà, 2009). Più specificamente, analisi trascrittomiche comparative hanno evidenziato l'esistenza di gruppi di proteine salivari specifiche dei Culicidi e ristrette a specie dei generi *Anopheles* o *Aedes* (Arcà *et al.*, 2007; Arcà *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010). Queste proteine genere-specifiche, se immunogeniche, rappresentano dei candidati ideali per lo sviluppo di saggi ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) per valutare l'esposizione umana a vettori di malaria (zanzare *Anopheles*) o di arbovirus (zanzare *Aedes*).

## La proteina gSG6 di *Anopheles gambiae*: una prova di principio

Analisi comparative hanno consentito di identificare un gruppo di 18 polipeptidi salivari, appartenenti a 9 differenti famiglie proteiche, che si ritrovano esclusivamente nella saliva di anofeline e sono privi di similarità con proteine note (Arcà *et*

*al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2010). Le risposte IgG alle proteine gSG6 e cE5 del vettore afrotropicale di malaria *Anopheles gambiae* sono state analizzate in individui naturalmente esposti a punture di zanzare *Anopheles* da una zona ad iperendemia malarica del Burkina Faso, Africa occidentale. gSG6 (AGAP000150) è una piccola proteina di ~10 kDa espressa specificamente nelle ghiandole salivari di femmine adulte e relativamente abbondante nella saliva. Il preciso ruolo funzionale di gSG6 è ancora da chiarire, sebbene la sua deplezione dalla saliva mediante RNAi aumenti il tempo di *probing* e diminuisca l'efficienza del pasto di sangue (Lombardo *et al.*, 2009). Anche cE5 è un piccolo polipeptide (82 aa, AGAP008004) ma la sua struttura e funzione sono stati accuratamente determinati: si tratta di un potente inibitore trombinico appartenente alla famiglia dell'anofelina e lo si ritrova esclusivamente nella saliva di zanzare *Anopheles* (Arcà *et al.*, 2017; Pirone *et al.*, 2017; Ronca *et al.*, 2012). Queste due proteine salivari genere-specifiche di *An. gambiae* sono entrambe immunogeniche ma è interessante notare che stimolano risposte immunitarie sostanzialmente differenti in individui ripetutamente esposti ad alti livelli di punture anofeliche. Infatti, la proteina gSG6 induce una risposta IgG di breve durata, come indicato dalla brusca diminuzione dei livelli anticorpali durante la stagione secca, dopo un periodo di ~3-4 mesi di esposizione scarsa o nulla (Rizzo *et al.*, 2011). La proteina cE5, che esibisce una maggiore immunogenicità in confronto a gSG6, evoca invece una risposta IgG di più lunga durata, come mostrato dall'assenza di variazione significativa dei livelli anticorpali fra la stagione delle piogge, ad alta densità vettoriale, e la stagione arida, a bassa densità vettoriale (Rizzo *et al.*, 2014). La risposta a queste due proteine è risultata differente anche (i) per la sottoclasse IgG predominante (IgG4 ed IgG1 rispettivamente per gSG6 e cE5) e (ii) per la capacità di indurre tolleranza immunologica, suggerendo che inducano risposte immunitarie di differente polarità negli individui esposti: di tipo Th-2 per gSG6 e di tipo Th-1 per cE5 (Rizzo *et al.*, 2014). La natura a più lungo termine della risposta IgG anti-cE5 indica una limitata adeguatezza di questa proteina quale marcatore di esposizione; tuttavia, la sua elevata sensibilità potrebbe essere sfruttata per valutare l'impatto di interventi di controllo vettoriale sul contatto uomo-vettore, e quindi per stimarne l'efficacia (Marie *et al.*, 2015). Dall'altro lato, la proteina gSG6 (o il peptide gSG6-P1) sono stati validati quali marcatori di esposizione umana a vettori di malaria in un'ampia varietà di condizioni epidemiologiche in Africa (Angola, Benin, Burkina Faso, Costa d'Avorio, Kenya, Senegal, Tanzania ed Uganda) e, più recentemente, in Asia (Cambogia, confine Tailandia-Birmania) e Polinesia (Vanuatu) (Badu *et al.*, 2012; Drame *et al.*, 2010; Drame *et al.*, 2015; Idris *et al.*, 2017; Poinsignon *et al.*, 2008; Proietti *et al.*, 2013; Rizzo *et al.*, 2011; Stone *et al.*, 2012; Traore *et al.*, 2018; Ya-Umphan *et al.*, 2017). Questi dati forniscono una chiara prova di principio che antigeni salivari da artropodi ematofagi possono essere usati in maniera affidabile per valutare l'esposizione umana a vettori di patogeni e che rappresentano utili strumenti per studi epidemiologici e per la stima dell'efficacia di interventi di controllo vettoriale.

## Antigeni salivari per la valutazione dell'esposizione a zanzare *Aedes*

Zanzare appartenenti al genere *Aedes* sono vettori di arbovirus di grande rilevanza per la salute umana quali i virus della dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febbre gialla. *Aedes aegypti* ed *Aedes albopictus* sono certamente i vettori più rilevanti, con *Ae. aegypti* che rappresenta il principale vettore nelle aree tropicali e subtropicali, mentre *Ae. albopictus* sta rapidamente guadagnando l'attenzione generale in virtù della sua rapida diffusione globale e della sua competenza alla trasmissione di numerosi arbovirus (Kraemer *et al.*, 2015). Inoltre, i recenti casi di trasmissione autoctona di chikungunya e dengue causati da *Ae. albopictus* in Italia, Francia e Croazia hanno evidenziato che il continente europeo è vulnerabile a infezioni trasmesse da *Ae. albopictus* (Gossner *et al.*, 2018), sottolineando la necessità di un migliore monitoraggio e controllo di questo rilevante vettore.

Studi precedenti hanno chiaramente mostrato che la risposta IgG alla saliva di *Ae. aegypti* o di *Ae. albopictus* può essere impiegata per valutare l'esposizione umana a questi vettori (Doucoure *et al.*, 2012a; Doucoure *et al.*, 2012b; Mathieu-Daude *et al.*, 2018; Orlandi-Pradines *et al.*, 2007). Allo stesso tempo le analisi trascrittomiche su differenti specie di zanzare *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* hanno portato all'identificazione di un gruppo di almeno una decina di proteine salivari tipiche di culicine e con limitata identità aminoacidica fra specie di *Aedes* e *Culex* (Arcà *et al.*, 2007; Arcà *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2018). Queste osservazioni, insieme alla prova di principio ottenuta con gSG6/gSG6-P1 per vettori di malaria, incoraggiano gli sforzi per la messa a punto di saggi simili per la valutazione dell'esposizione a zanzare *Aedes*. Fra i candidati idonei ci solo le proteine salivari

di *Ae. albopictus* 23.4 kDa (AAV90700), 27 kDa (AAV90698), 30.5 kDa (AAV90697), 34k1(AAV90689), 34k2 (AAV90690), 62k1 (AAV90683), 62k2 (AAV90682), HHH (AAV90655), W-rich (AAV90636), hyp8.2 (AAV90696); inoltre, alcune indicazioni preliminari di immunogenicità per l'uomo sono state ottenute per alcuni di questi candidati mediante approcci di immunoproteomica (Doucoure *et al.*, 2013).

L'unico antigene salivare *Aedes*-specifico utilizzato finora con qualche successo è il peptide Nterm-34 kDa che è disegnato sulla regione N-terminale della proteina salivare 34k1 di *Ae. aegypti* (ABF18017). In uno studio effettuato in 7 differenti villaggi del Benin meridionale (Africa occidentale) si è visto che la risposta IgG anti-Nterm-34 kDa aumenta in bambini esposti a zanzare *Aedes* passando dalla stagione secca (bassa esposizione) alla stagione delle piogge (alta esposizione) (Elanga Ndille *et al.*, 2012). Inoltre, ci sono alcune evidenze che il peptide Nterm-34 kDa potrebbe essere utile per valutare la qualità di interventi di controllo vettoriale (Elanga Ndille *et al.*, 2016; Sagna *et al.*, 2018). Questi risultati, sebbene necessitino di più estesa validazione, sono certamente promettenti ed incoraggianti ma l'analisi di ulteriori candidati potrebbe consentire la messa apunto di marcatori più efficaci. Da questo punto di vista è opportuno considerare come l'utilizzo di peptidi sintetici, pur presentando alcuni rilevanti vantaggi, abbia anche alcune limitazioni. Infatti, da un lato l'impiego di peptidi consente di evitare le laboriose procedure di espressione, purificazione e rinaturazione delle proteine ricombinanti, peraltro non sempre coronate da successo, e può garantire una minore variabilità da preparazione a preparazione dell'antigene. D'altro canto, i peptidi sintetici hanno spesso una sensibilità limitata, dovuta alla perdita degli epitopi conformazionali delle proteine native, e richiedono l'impiego di sieri più concentrati, il che può essere un problema in alcune situazioni o condizioni epidemiologiche. Ci si aspetta che ulteriori progressi verso la messa a punto di marcatori sensibili ed efficaci di esposizione a zanzare *Aedes* possa venire dall'espressione in forma ricombinante e dalla validazione di proteine salivari *Aedes*-specifiche. Un passo importante in questa direzione può venire dall'utilizzo di sistemi sperimentali animali (topo, coniglio o cavia) che consentano un rapido screening preliminare di numeri relativamente elevati di candidati. Un approccio di questo tipo, pur necessitando di validazione finale sull'uomo in condizioni naturali di esposizione, ha numerosi vantaggi. Innanzitutto, il regime di esposizione può essere strettamente controllato ed è possibile impiegare protocolli di esposizione a punture di differenti zanzare vettrici (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*): questo può consentire di valutare la genere- ed eventualmente la specie-specificità della risposta anticorpale. In aggiunta, il prelievo di piccoli volumi di siero a tempi definiti (prima, durante ed a tempi diversi dal termine dell'esposizione) può fornire informazioni dettagliate sulla cinetica di comparsa e decadimento della risposta, che è un parametro cruciale per la selezione di marcatori efficaci. In un sistema di questo tipo si può immaginare che lo screening iniziale di peptidi disegnati su idonee proteine salivari *Aedes*-specifiche possa guidare la selezione di candidati ottimali per la successiva espressione dell'intera proteina in forma ricombinante. In conclusione le prospettive per lo sviluppo di marcatori di esposizione a zanzare *Aedes* sono certamente molto incoraggianti: ci si attende che questi possano rappresentare degli strumenti addizionali estremamente utili per stimare il grado di esposizione umana a questi importanti vettori di arbovirus con implicazioni rilevanti per studi epidemiologici, per la valutazione del rischio e per il miglioramento degli interventi di controllo antivettoriali.

## RIASSUNTO

Gli artropodi ematofagi, durante il pasto di sangue, iniettano nei loro ospiti un cocktail salivare il cui ruolo principale è di consentire un'efficace assunzione del sangue controbilanciando le risposte emostatica, infiammatoria ed immunitaria dell'ospite. Le proteine salivari di ematofagi, tuttavia, inducono negli ospiti vertebrati una risposta anticorpale che può essere sfruttata per valutarne l'esposizione a vettori di importanti malattie. Studi di trascrittomica effettuati negli ultimi quindici anni su differenti specie di insetti ematofagi hanno consentito di chiarire la complessità dei loro repertori salivari mettendo in rilievo come le proteine salivari mostrino un accelerato tasso evolutivo ed evidenziando l'esistenza di proteine salivari famiglia-, genere- e talvolta anche specie-specifiche. Focalizzando l'attenzione su zanzare dei generi *Anopheles* ed *Aedes*, importanti vettori rispettivamente del parassita malarico *Plasmodium falciparum* e di numerosi arbovirus, riassumiamo qui recenti studi finalizzati all'utilizzo di proteine salivari per la messa a punto di saggi atti a valutare l'esposizione umana a questi vettori di notevole rilevanza per la salute pubblica.

## REFERENCES

Arcà B., Lombardo F., Francischetti I. M.*, et al.*, 2007 – *An insight into the sialome of the adult female mosquito* Aedes albopictus. - Insect Biochem Mol Biol, 37(2): 107-127.

Arcà B., Lombardo F., Struchiner C.J.*, et al.*, 2017 – *Anopheline salivary protein genes and gene families: an evolutionary overview after the whole genome sequence of sixteen Anopheles species*. - BMC Genomics, 18 (1): 153.

Arcà B., Lombardo F., Valenzuela J. G.*, et al.*, 2005 – *An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito,* Anopheles gambiae. - J Exp Biol, 208(Pt 20): 3971-3986.

Arcà B., Ribeiro J. M., 2018 – *Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit*. - Curr Opin Insect Sci, 29: 102-109.

Arcà B., Struchiner C. J., Pham V. M.*, et al.*, 2014 – *Positive selection drives accelerated evolution of mosquito salivary genes associated with blood-feeding*. - Insect Mol. Biol., 23(1): 122-131.

Badu K., Siangla J., Larbi J.*, et al.*, 2012 – *Variation in exposure to* Anopheles gambiae *salivary gland peptide (gSG6-P1) across different malaria transmission settings in the western Kenya highlands*. - Malar J, 11 (1): 318.

Doucoure S., Cornelie S., Patramool S.*, et al.*, 2013 – *First screening of* Aedes albopictus *immunogenic salivary proteins*. - Insect Mol Biol, 22(4): 411-423.

Doucoure S., Mouchet F., Cornelie S.*, et al.*, 2012a – *Evaluation of the human IgG antibody response to* Aedes albopictus *saliva as a new specific biomarker of exposure to vector bites*. - PLoS Negl Trop Dis, 6(2): e1487.

Doucoure S., Mouchet F., Cournil A.*, et al.*, 2012b – *Human Antibody Response to* Aedes aegypti *Saliva in an Urban Population in Bolivia: A New Biomarker of Exposure to Dengue Vector Bites*. - Am J Trop Med Hyg, 87 (3): 504-510.

Drame P. M., Poinsignon A., Besnard P.*, et al.*, 2010 – *Human antibody response to* Anopheles gambiae *saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control*. - Am J Trop Med Hyg, 83(1): 115-121.

Drame P. M., Poinsignon A., Dechavanne C.*, et al.*, 2015 – *Specific antibodies to Anopheles gSG6-P1 salivary peptide to assess early childhood exposure to malaria vector bites*. - Malar J, 14: 285.

Elanga Ndille E., Doucoure S., Damien G.*, et al.*, 2012 – *First attempt to validate human IgG antibody response to Nterm-34kDa salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to* Aedes aegypti *bites*. - PLoS Negl Trop Dis, 6 (11): e1905.

Elanga Ndille E., Doucoure S., Poinsignon A.*, et al.*, 2016 – *Human IgG Antibody Response to Aedes Nterm-34kDa Salivary Peptide, an Epidemiological Tool to Assess Vector Control in Chikungunya and Dengue Transmission Area*. - PLoS Negl Trop Dis, 10 (12): e0005109.

Fontaine A., Diouf I., Bakkali N.*, et al.*, 2011 – *Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions*. - Parasit Vectors, 4: 187.

Gossner C. M., Ducheyne E., Schaffner F., 2018 – *Increased risk for autochthonous vector-borne infections transmitted by* Aedes albopictus *in continental Europe*. - Euro Surveill, 23 (24).

Idris Z. M., Chan C. W., Mohammed M.*, et al.*, 2017 – *Serological measures to assess the efficacy of malaria control programme on Ambae Island, Vanuatu*. - Parasit Vectors, 10 (1): 204.

Kraemer M. U., Sinka M. E., Duda K. A.*, et al.*, 2015 – *The global distribution of the arbovirus vectors* Aedes aegypti *and* Ae. albopictus. - Elife, 4: e08347.

Lehane M. J., 1991 - *Biology of blood-sucking insects*. London, Harper Collins Academic.

Lombardo F., Ronca R., Rizzo C.*, et al.*, 2009 – *The* Anopheles gambiae *salivary protein gSG6: an anopheline-specific protein with a blood-feeding role*. - Insect Biochem Mol Biol, 39 (7): 457-466.

Marie A., Ronca R., Poinsignon A.*, et al.*, 2015 – *The* Anopheles gambiae *cE5 salivary protein: a sensitive biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control*. - Microbes Infect, 17(6): 409-416.

Mathieu-Daude F., Claverie A., Plichart C.*, et al.*, 2018 – *Specific human antibody responses to* Aedes aegypti *and* Aedes polynesiensis *saliva: A new epidemiological tool to assess human exposure to disease vectors in the Pacific*. - PLoS Negl Trop Dis, 12(7): e0006660.

Narasimhan S., Schleicher T. R., Fikrig E., 2017 – *Translation of Saliva Proteins Into Tools to Prevent Vector-Borne Disease Transmission*. In: Arthropod vector: controller of disease transmission, S. K. Wikel, S. Aksoy and G. Dimopoulos Ed., Elsevier/Academic Press and imprint of Elsevier, London; San Diego, CA, pp. 249-300.

Neafsey D. E., Waterhouse R. M., Abai M. R.*, et al.*, 2015 – *Mosquito genomics. Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 Anopheles mosquitoes*. - Science, 347 (6217): 1258522.

Orlandi-Pradines E., Almeras L., Denis de Senneville L.*, et al.*, 2007 – *Antibody response against saliva antigens of* Anopheles gambiae *and* Aedes aegypti *in travellers in tropical Africa*. - Microbes Infect, 9 (12-13): 1454-1462.

Pirone L., Ripoll-Rozada J., Leone M.*, et al.*, 2017 – *Functional analyses yield detailed insight into the mechanism of thrombin inhibition by the antihemostatic salivary protein cE5 from* Anopheles gambiae. - J Biol Chem, 292 (30): 12632-12642.

Poinsignon A., Cornelie S., Mestres-Simon M.*, et al.*, 2008 – *Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites*. - PLoS One, 3 (6): e2472.

Proietti C., Verra F., Bretscher M. T.*, et al.*, 2013 – *Influence of infection on malaria-specific antibody dynamics in a cohort exposed to intense malaria transmission in northern Uganda*. - Parasite Immunol, 35 (5-6): 164-173.

Ribeiro J. M., Arcà B., Lombardo F.*, et al.*, 2007 – *An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito,* Aedes aegypti. - BMC Genomics, 8(1): 6.

Ribeiro J.M., Charlab R., Pham V. M.*, et al.*, 2004 – *An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito* Culex pipiens quinquefasciatus. - Insect Biochem Mol Biol, 34 (6): 543-563.

Ribeiro J. M., Mans B. J., Arcà B., 2010 – *An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera*. - Insect Biochem Mol Biol, 40(11): 767-784.

Ribeiro J. M. C., 1995 - *Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?* - Infect Agents Dis, 4 (3): 143-152.

Ribeiro J. M. C., Arcà B., 2009 - *From Sialomes to the Sialoverse: An Insight into Salivary Potion of Blood-Feeding Insects*. - Advances in Insect Physiology, 37: 59-118.

Ribeiro J. M. C., Martin-Martin I., Moreira F.R.*, et al.*, 2018 - *A deep insight into the male and female sialotranscriptome of adult* Culex tarsalis *mosquitoes*. - Insect Biochem Mol Biol, 95: 1-9.

Rizzo C., Lombardo F., Ronca R.*, et al.*, 2014 – *Differential antibody response to the* Anopheles gambiae *gSG6 and cE5 salivary proteins in individuals naturally exposed to bites of malaria vectors*. - Parasit Vectors, 7 (1): 549.

Rizzo C., Ronca R., Fiorentino G.*, et al.*, 2011 – *Humoral response to the* Anopheles gambiae *salivary protein gSG6: a serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors*. - PLoS One, 6 (3): e17980.

Ronca R., Kotsyfakis M., Lombardo F.*, et al.*, 2012 – *The* Anopheles gambiae *cE5, a tight- and fast-binding thrombin inhibitor with post-transcriptionally regulated salivary-restricted expression*. - Insect Biochem Mol Biol, 42 (9): 610-620.

Sagna A. B., Yobo M. C., Elanga Ndille E., *et al.*, 2018 - *New Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to Aedes Vector Bites: From Concept to Applications*. - Trop Med Infect Dis, 3 (3).

Stone W., Bousema T., Jones S., *et al.*, 2012 – *IgG responses to* Anopheles gambiae *salivary antigen gSG6 detect variation in exposure to malaria vectors and disease risk*. - PLoS One, 7 (6): e40170.

Traore D. F., Sagna A. B., Adja A.M., *et al.*, 2018 – *Evaluation of Malaria Urban Risk Using an Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to Anopheles Bites*. - Am J Trop Med Hyg, 98 (5): 1353-1359.

Ya-Umphan P., Cerqueira D., Parker D.M., *et al.*, 2017 – *Use of an Anopheles Salivary Biomarker to Assess Malaria Transmission Risk Along the Thailand-Myanmar Border*. - J Infect Dis, 215 (3): 396-404.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 129-133*

# I BATTERI SIMBIONTI NEL CONTROLLO DELLE MALATTIE TRASMESSE DA INSETTI VETTORI

GUIDO FAVIA[a]

[a] *Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino.*
E mail: guido.favia@unicam.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2018.

*Symbiotic control of insect pests*

It is well known that the microbiota of insects has a key role in their evolutionary success. Examples of bacterial symbiosis are remarkably common in insects, in particular in species involved in the transmission of diseases: numerous studies were carried out to reveal the basic mechanisms of the host–symbiont relationships and to develop alternative strategies to control vector borne diseases. The 'Symbiotic control', a new multifaceted approach that uses symbiotic microorganisms to control insect pests or reduce vector competence, has attracted much interest in the last few years. Three such approaches currently at the cutting edge are: (1) the disruption of microbial symbionts required by insect pests by intervening of their fitness; (2) the manipulation of symbionts expressing anti-pathogen molecules within the host; and (3) the introduction of exogenous microbes affecting life-span and vector capacity of the new hosts in insect populations. This work reviews the current knowledge on microbial symbiosis in mosquitoes that holds promise for the development of interventions of symbiotic control for mosquito borne diseases.

KEY WORDS: Microbiota, Symbiotic Control, Paratransgenesis, Insect pests, Insect vectors.

## INTRODUZIONE

Considerando la loro biodiversità e abbondanza, gli insetti possono essere considerati tra gli animali di maggior successo sulla Terra. Delle tantissime specie di insetti descritte, molte sono vettrici di agenti patogeni per gli animali e le piante. In questo contesto, le zanzare contribuiscono in modo significativo alla biodiversità e alla biomassa degli insetti. Al momento ne sono state descritte circa 3500 specie, alcune delle quali pongono seri problemi di natura sanitaria e socio-economica in molte regioni, con particolare riguardo all'Africa sub-sahariana. Le zanzare possono trasmettere tra i tanti, i patogeni responsabili della malaria, della febbre gialla, della dengue, della febbre del Nilo occidentale, della chikungunya e di alcune filariosi. Di conseguenza più della metà della popolazione umana globale è a rischio di esposizione alle infezioni trasmesse dalle zanzare e alcuni milioni di infezioni umane sono registrate ogni anno. Le zanzare sono state descritte in quasi tutti i continenti, adattandosi ad una grande varietà di habitat diversi nei quali svolgono importanti ruoli ecologici e funzionali.

I simbionti microbici, in particolare i batteri, possono influenzare tratti specifici della biologia dell'insetto-ospite, quali per esempio il riconoscimento per l'accoppiamento specie- specifico, come riportato in *Drosophila paulistorum* (MILLER, 2010), o la resistenza ad alcuni insetticidi, come riportato in *Riptortus pedestris* (KIKUCHI, 2012), o ancora, avere effetti sulla fitness, la nutrizione, la difesa da predatori, e la riproduzione, in un numero significativo di specie di insetti (SIMON & VAVRE, 2011; FERRARI, 2011). Così come per molte specie di insetti, le relazioni simbiotiche tra zanzare e diversi microrganismi hanno avuto, molto probabilmente, implicazioni importanti nel loro successo evolutivo, incidendo positivamente anche sulla loro diffusa distribuzione geografica. In particolare, alcune componenti del microbiota associato a zanzare vettrici possono inibire lo sviluppo di agenti patogeni bloccandone la trasmissione (PUMPUNI *et al.*, 1993); pertanto diversi microbi potrebbero potenzialmente essere utilizzati per manipolare la capacità delle zanzare di trasmettere agenti patogeni all'uomo, agli animali o alle piante. Conseguentemente, negli ultimi anni si è registrata un'intensificazione degli studi mirati alla descrizione del microbiota in diverse specie di zanzare. Difatti, sebbene i primi studi sulla relazione tra batteri e le zanzare risalgano alla metà degli anni '20, quando HERTIG & WOLBACH (1924) descrissero per la prima volta la presenza di batteri della specie *Wolbachia pipentis* all'interno degli organi riproduttivi della zanzara *Culex pipiens* (HERTIG, 1936), solo di recente lo studio della simbiosi microbica nelle zanzare ha trovato un forte interesse risultante in un numero rilevante di pubblicazioni nel settore.

– Pubblicato marzo 2019

La manipolazione di alcuni simbionti di zanzara può offrire nuovi metodi di controllo che sono uniformemente definiti come Controllo Simbiotico (CS). In questo contesto, a seguire descriverò quei rapporti tra simbionti e zanzare vettrici che sembrano aprire le migliori prospettive applicative per il controllo delle malattie trasmesse da zanzare.

## *Wolbachia* e zanzare: un rapporto antico con nuove prospettive per il controllo di malattie trasmesse da insetti

I batteri del genere *Wolbachia* rappresentano un gruppo di batteri intracellulari, ereditati per *via materna*, e descritti per la prima volta in *Culex pipiens* (Hertig,1936). Più recentemente è stato riscontrato in un numero elevato di specie di insetti. In zanzara, *Wolbachia* è stato rilevato in diversi generi tra cui *Aedes*, *Culex*, *Coquillettidia* e *Mansonia*, ma solo negli ultimissimi anni in alcune popolazioni di specie del genere *Anopheles* (Baldini *et al.*, 2014; Jeffries *et al.*, 2018; Baldini *et al.*, 2018; Niang *et al.,* 2018) che comprende le circa sessanta specie coinvolte nella trasmissione della malaria umana. *Wolbachia* inoltre non è mai stata rilevata in popolazioni naturali della specie *Aedes aegypti*, principale vettore di dengue e febbre gialla. La trasmissione materna di *Wolbachia* avviene attraverso il citoplasma dell'uovo e causa diversi disturbi riproduttivi nell'ospite dell'insetto, comprensivi dell'incompatibilità citoplasmatica, della partenogenesi, della femminilizzazione e del "male killing" (Stouthamer *et al.*, 1999). Attraverso l'incompatibilità citoplasmatica, i batteri sono in grado di diffondersi nelle popolazioni delle zanzare, conseguentemente la *Wolbachia* è stata proposta come un "gene drive system" con la finalità di ridurre la dimensione della popolazione di zanzare e per interferire con la struttura della popolazione con possibili effetti sulla riduzione della trasmissione della malattia ad essa associata (Hoffmann *et al.*, 2011).

Recentemente, diversi studi hanno dimostrato il notevole potenziale dell'uso di *Wolbachia* per il controllo delle malattie trasmesse dalle zanzare. In particolare, l'introduzione "forzata" di alcuni ceppi di *Wolbachia* in *Ae. aegypti* provoca una serie di fenomeni tra i quali la riduzione della longevità della zanzara (McMeniman *et al.*, 2009) e un potenziamento della risposta immunitaria tale da rendere le zanzare refrattarie alle infezioni da dengue e quindi incapaci di trasmettere il virus (Kambris *et al.*, 2009). Le popolazioni di *Ae. aegypti* rese resistenti alle infezioni da dengue tramite l'uso di *Wolbachia* sono in grado di sostituire rapidamente le popolazioni naturali e sensibili dimostrando la fattibilità di questa strategia nel contrasto alla dengue nel mondo.

Il controllo biologico della trasmissione delle zanzare mediante *Wolbachia* è stato dapprima validato con successo con piccoli test sul campo, per poi essere esportato con successo in trials più estesi a Townsville, in Australia, ed è stato poi applicato con risultati positivi in più di 10 paesi diversi attraverso il programma *Eliminate Dengue*. La sua più ampia applicazione, oltre a limitare la trasmissione della dengue e includere altre specie di zanzare, ha visto il programma crescere in un'iniziativa globale senza fini di lucro, nota come World Mosquito Program.

Difatti, esperimenti simili sono stati condotti in *An. gambiae*, il maggior vettore di malaria Afro-tropicale, dimostrando che un'infezione indotta da *Wolbachia* può inibire lo sviluppo del parassita malarico *Plasmodium* nella zanzara (Hughes *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2017). È opportuno ricordare che non tutti i ceppi di *Wolbachia* esercitano un fenotipo protettivo nel proprio ospite come mostrato da uno studio comparativo volto a valutare l'effetto di due ceppi di *Wolbachia*, wAlbB (isolato da *Ae.albopticus*) e wMelPop (isolato da *Drosophila melanogaster*), sulla competenza vettrice di *An. gambiae* (Hughes *et al.*, 2011). Il ceppo wAlbB aumenta in modo significativo i livelli di oocisti di *Plasmodium* nel midgut delle zanzare, mentre wMelPop inibisce moderatamente lo sviluppo delle oocisti. Inoltre, il ceppo wAlbB non è virulento per le zanzare, al contrario del ceppo wMelPop. Tutto ciò dimostra che differenti ceppi di *Wolbachia* possono avere differenti tipi di interazione con l'ospite e con i patogeni che esso può trasmettere. Questi studi, seppur preliminari, dimostrano quindi il potenziale utilizzo di *Wolbachia* anche nella lotta al controllo della malaria, confortando le evidenze che indicano che la presenza di *Wolbachia* in popolazioni naturali di *An. gambiae* determina un marcato effetto deleterio sugli sporozoiti e conseguentemente sulla trasmissione della malaria.

## Manipolazione genetica di simbionti: cavalli di Troia per esprimere molecole "anti-patogeno" all'interno dell'insetto vettore

Con il termine paratransgenesi si intende una metodica mirata all'eliminazione di agenti patogeni da popolazioni di insetti vettori/dannosi attraverso la manipolazione genetica di simbionti dell'insetto. Si tratta di una metodica che ha già avuto numerosi riscontri positivi: uno dei migliori esempi di fattibilità dell' uso della paratransgenesi per il controllo delle malattie trasmesse da vettori riguarda la malattia di Chagas, ovvero la tripanosomiasi americana (Durvasula *et al.,* 1997). La malattia di Chagas è causata dal protozoo parassita *Trypanosoma cruzi*, trasmesso dal cosiddetto *kissing bug*, un insetto appartenente alla famiglia delle

Reduviidae (sottofamiglia Triatominae). Il vettore *Rhodnius prolixus,* si nutre per tutto il suo intero ciclo di sviluppo di sangue del vertebrato ospite. Nell'intestino esso alberga batteri simbionti della specie *Rhodococcus rhodnii* che producono sostanze nutritive, come le vitamine, che consentono all'insetto di compensare una dieta costituita esclusivamente da pasti sangue. È stato possibile coltivare popolazioni di questo simbionte, modificarle geneticamente per produrre molecole effettrici anti-tripanosoma e reinserirle nella triatomina per esprimere la/e molecola/e antiparassita nell'intestino degli insetti. Tale metodica ha effettivamente dimostrato il blocco della trasmissione del patogeno attraverso l'inibizione dello sviluppo del parassita nel vettore (Beard *et al.,* 2002). Inoltre, prove di campo hanno dimostrato la diffusione controllata di simbionti geneticamente modificati in popolazioni naturali di vettori di triatomine, rafforzando quindi la fattibilità della paratransgenesi come parte di un programma di controllo integrato (Durvasula *et al.,* 1999; Hurwitz *et al.,* 2011).

Un altro esempio di successo, riguarda una strategia paratransgenica mirata all'interruzione della trasmissione di *Xylella fastidiosa*, uno dei principali agenti patogeni batterici in agricoltura, trasmesso da *Homalodisca vitripennis* (noto con il nome di "Glassed-Winged Sharpshooter", GWSS), utilizzando *Pantoea agglomerans*, un simbionte batterico del GWSS come agente di controllo paratransgenico. Ceppi di *P. agglomerans* geneticamente modificati per esprimere due peptidi antimicrobici, un'(AMP)-melittina e una molecola simile alla scorpina (SLM), che hanno un'attività anti-*Xylella* a concentrazioni non letali per *P. agglomerans*, sono risultati capaci di interrompere la trasmissione del patogeno dagli insetti alle piante d'uva (Arora *et al.*, 2018).

Questi risultati in insetti vettori diversi dalle zanzare, hanno fortemente incoraggiato i ricercatori a sviluppare approcci simili per controllare le malattie trasmesse da zanzare, indicando che per la messa a punto di un efficiente approccio paratransgenico al controllo delle malattie trasmesse da zanzare (e più generalmente di insetti vettori/dannosi), microrganismi simbionti con peculiari e ben definite caratteristiche, devono essere identificati e caratterizzati a livello microbiologico e genetico. Difatti occorre che i simbionti selezionabili siano coltivabili e geneticamente modificabili in modo stabile per esprimere e secernere la/le proteine/e anti-patogeno. Inoltre la fitness del simbionte non deve essere compromessa dal processo di manipolazione.

Un altro elemento molto importante riguarda la definizione di un efficiente mezzo di diffusione del simbionte manipolato nelle popolazioni di insetti *targets*. Ad oggi, alcuni batteri sono già stati progettati per esprimere molecole anti-patogeno in zanzara. Riehle e collaboratori (2007) hanno ingegnerizzato batteri della specie *Escherichia coli* capaci di esporre due molecole effettrici anti-*Plasmodium* sulla loro membrana esterna. Utilizzando entrambe le molecole effettrici si é registrata una significativa inibizione dello sviluppo di *Plasmodium berghei*, allorquando le zanzare sono state alimentate con i batteri ingegnerizzati, ventiquattro ore prime del pasto di sangue infetto. Nonostante il numero e la prevalenza dei batteri ricombinanti aumenti significativamente dopo il pasto di sangue, *E. coli* sopravvive con difficoltà nelle zanzare ospiti. Conseguentemente altre specie di batteri simbionti delle zanzare sono state isolate. Tra questi, ottimi candidati per applicazioni paratransgeniche per il controllo delle malattie trasmesse da zanzare sono state giudicate le specie *Enterobacter agglomerans* e *Pantoea agglomerans*.

Uno studio recente ha dimostrato che ceppi di *P. agglomerans* ingegnerizzati per esprimere alcune molecole effettrici anti-*Plasmodium,* hanno inibito lo sviluppo del parassita umano della malaria (*Plasmodium falciparum*) e del parassita malarico dei roditori (*Pl.* B*erghei*) fino al 98% in vivo. Questa è una ulteriore dimostrazione che l'approccio paratransgenico può essere uno strumento potente per il controllo della malaria (Wang *et al.*, 2012).

In questo contesto, un simbionte che negli ultimi dodici anni circa ha attratto grande interesse, è il batterio acetico *Asaia* (Favia *et al*., 2007). Questo alfa-proteobatterio ha stabilito una peculiare relazione simbiotica con molte specie di zanzare e, più in generale, con molte specie di insetti. Questa peculiarità si riferisce a diversi elementi: prima di tutto *Asaia* si localizza nell'intestino, nelle ghiandole salivari e negli organi riproduttori delle zanzare di entrambi i sessi in molte specie dei generi *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (Favia *et al*., 2007; Damiani *et al*., 2010, Crotti *et al*., 2009; DeFreece *et al*., 2014). In secondo luogo, *Asaia* è presente in tutte le fasi dello sviluppo delle zanzare vettrici studiate, con prevalenze variabili all'interno delle popolazioni ospiti, ma spesso risultando il batterio dominante (a volte raggiungendo il 100% di prevalenza). L'*Asaia* è facilmente coltivabile fuori dall'ospite in "cell-free media" ed è stata geneticamente trasformata per esprimere proteine esogene. La re-introduzione dei batteri modificati, tali da esprimere molecole fluorescenti nelle zanzare, ha mostrato inequivocabilmente la loro capacità di colonizzare massivamente gli organi originali, in un numero rilevante di zanzare delle popolazioni destinatarie (Fig. 1). È inoltre da sottolineare che *Asaia* utilizza diversi percorsi di trasmissione all'interno e tra le popolazioni di zanzare. Può essere trasmesso verticalmente alla discendenza per via materna o paterna e in maniera trans-stadiale, può inoltre essere trasmesso orizzontalmente tra individui mediante copula o "co-feeding". Questo offre grandissime possibilità per l'introduzione e la diffusione

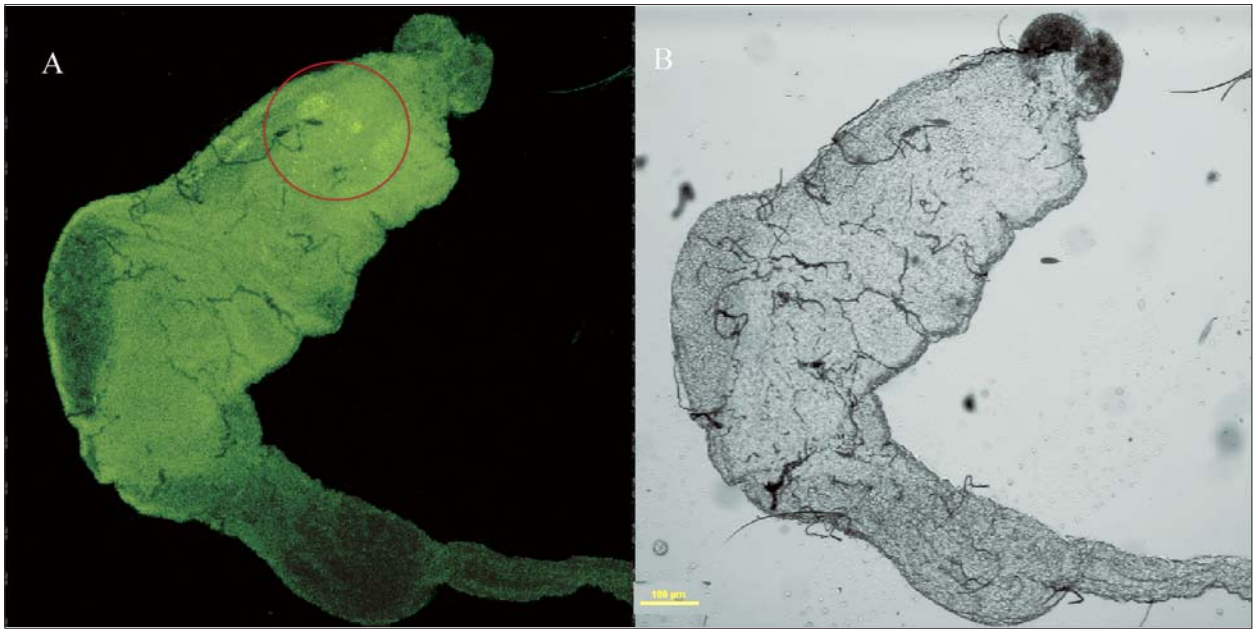



Figura 1 – A. Colonizzazione dell'intestino di zanzara della specie *Anopheles stephensi*, da parte di batteri del genere *Asaia* modificati allo scopo di produrre la Green Fluorescent Protein. Nel cerchio rosso è possibile vedere una intensa colonizzazione di batteri esprimenti la proteina ricombinante. B. Immagine dell'intestino colonizzato a contrasto di fase.

delle molecole effettrici anti-patogeno nelle popolazioni naturali. Recentemente l'*Asaia* è stata ingegnerizzata per esprimere condizionalmente la proteina scorpina ad azione antiplasmodiale una volta avvenuto il pasto di sangue. Questi ceppi di *Asaia* hanno mostrato di inibire l'infezione da *Plasmodium* aprendo la possibilità di applicare questa strategia per il controllo della malaria su campo (Shane *et al.*, 2018.).

## Variabilità del microbiota delle zanzare

Tra gli artropodi, il microbiota dell'intestino di molte specie/popolazioni di insetto è stato ampiamente studiato, fornendo informazioni cruciali sul ruolo e le implicazioni delle relazioni simbionte-ospite. Questi studi hanno ampiamente rilevato come popolazioni di una stessa specie ma provenienti da aree geografiche differenti, si caratterizzino per una composizione del microbiota "popolazione-specifica". Un esempio tra i tanti riguarda le variazioni del microbiota in *Culex nigripalpus*, vettore del virus del Nilo occidentale e dell'encefalite di Saint Louis, in popolazioni provenienti da diverse località geografiche (Duguma *et al.*, 2019).

Un numero limitato di studi ha invece avuto come obiettivo lo studio della composizione del microbiota delle ghiandole salivari e degli organi riproduttori, entrambi organi cruciali per l'invasione dei patogeni e per l'eventuale trasmissione verticale di microrganismi simbiotici. Ciononostante, la caratterizzazione del microbiota dell'intestino, delle ghiandole salivari e degli organi riproduttori di diverse specie di zanzare, rappresentative di alcuni dei principali vettori di malattie, allo scopo di descrivere le dinamiche delle comunità batteriche all'interno delle differenti popolazioni e dei differenti organi, ha evidenziando che le zanzare sono caratterizzate da un microbiota distintivo in diversi organi, probabilmente riflettendo diverse funzioni e/o processi di adattamento di tipo organo-specifico, specie-specifico o addirittura popolazione-specifico (Mancini *et al*., 2018).

In definitiva, molteplici fattori, come la condizione dell'habitat e la specie/popolazione di appartenenza delle zanzare possono influenzare la composizione complessiva della comunità microbica e quindi fornire una base per ulteriori indagini sulle interazioni tra i vettori, le loro comunità microbiche, l'ambiente e gli ospiti vertebrati che in ultimo, da un lato possono influenzare il rischio di malattia trasmessa da vettori, dall'altro offrire possibili "tools" per il contrasto alle malattie trasmesse dalle zanzare.

## Bibliografia

Arora A.K. *et al.,* 2018 – *A paratransgenic strategy to block transmission of* Xylella fastidiosa *from the glassy-winged sharpshooter* Homalodisca vitripennis. - BMC Biotechnol., 18(1):50.

Baldini F. *et al.,* 2018 – *First report of natural* Wolbachia *infection in the malaria mosquito* Anopheles arabiensis *in Tanzania*. - Parasit. Vectors., 11(1):635.

Beard C.B. *et al.,* 2002 – *Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission.* - Annu Rev Entomol. 47:123-41.

Crotti E. *et al.,* 2009 – Asaia, *a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects*

*of phylogenetically distant genera and orders*. - Environ. Microbiol., 11(12):3252-3264.

Damiani C. *et al.,* 2010 – *Mosquito-bacteria symbiosis: the case of* Anopheles gambiae *and* Asaia. - Microb. Ecol., 60(3):644-654.

De Freece C. *et al.,* 2014 – *Detection and isolation of the α-proteobacterium* Asaia *in* Culex *mosquitoes*. - Med. Vet. Entomol. 28(4):438-442.

Duguma D. *et al*., 2019 – *Microbiota variations in* Culex nigripalpus *disease vector mosquito of West Nile virus and Saint Louis Encephalitis from different geographic origins.* – Peer J., 6:e6168.

Durvasula R.V. *et al*., 1997. – *Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria.* - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 94(7):3274-3278.

Durvasula R.V. *et al.,* 1999. – *Expression of a functional antibody fragment in the gut of* Rhodnius prolixus *via transgenic bacterial symbiont* Rhodococcus rhodnii. - Med. Vet. Entomol., 13(2):115-119.

Favia G. *et. al,* 2007 – *Bacteria of the genus* Asaia *stably associate with* Anopheles stephensi, *an Asian malarial mosquito vector.* - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 104(21):9047-9051.

Ferrari J., Vavre F., 2011 – *Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities.* Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 366(1569):1389-400.

Gomes F.M. *et al.,* 2017 – *Effect of naturally occurring* Wolbachia *in* Anopheles gambiae *s.l. mosquitoes from Mali on* Plasmodium falciparum *malaria transmission.* - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 114(47): 12566–12571.

Hertig M., Wolbach S.B., 1924. – *Studies on rickettsia-like microorganisms in insects.* - J. med. Res., 44: 329-374.7.

Hertig M., 1936 – *The Rickettsia*, Wolbachia pipientis *(gen. et sp.n.) and associated inclusions of the mosquito*, Culex pipiens. - Parasitology, 28: 453.

Hoffmann A.A. *et al.,* 2011 – *Successful establishment of* Wolbachia *in* Aedes *populations to suppress dengue transmission.* - Nature, 476(7361):454-457.

Hughes G.L. *et al.,* 2011 – Wolbachia *Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite* Plasmodium Falciparum *in* Anopheles Gambiae. - PLoS Pathog., 7(5): e1002043.

Hurwitz I. *et al.,* 2011 – Paratransgenic control of vector borne diseases. - Int. J. Biol. Sci., 7(9):1334-1344.

Jeffries C.L. *et al*., 2018. – *Novel* Wolbachia *strains in* Anopheles *malaria vectors from Sub-Saharan Africa.*Version 2. Wellcome - Open Res. 3:113.

Kambris Z. *et al.,* 2009 – *Immune activation by life-shortening* Wolbachia *and reduced filarial competence in mosquitoes.* - Science, 326(5949):134-6.

Kikuchi Y. *et al.,* 2012 – *Symbiont-mediated insecticide resistance.* - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 109(22): 8618–8622.

Mancini M.V. *et al.,* 2018 – *Estimating bacteria diversity in different organs of nine species of mosquito by next generation sequencing.* - BMC Microbiol., 18(1):126.

McMeniman C.J. *et al.,* 2009 – *Stable introduction of a life-shortening* Wolbachia *infection into the mosquito* Aedes aegypti. - Science, 323(5910):141-144.

Miller W.J. *et al.,* 2010 – *Infectious Speciation Revisited: Impact of Symbiont-Depletion on Female Fitness and Mating Behavior of* Drosophila paulistorum. - PLoS Pathog. 6(12): e1001214.

Niang E.H.A. *et al.,* 2018 – *First report of natural* Wolbachia *infection in wild* Anopheles funestus *population in Senegal*. - Malar J. 17(1):408.

Pumpuni C.B. *et al*., 1993. – Plasmodium falciparum: *inhibition of sporogonic development in* Anopheles stephensi *by Gram-negative bacteria.* - Exp. Parasitol. 77: 195-199.

Riehle M.A. *et al.,* 2007 -*Using bacteria to express and display anti*-Plasmodium *molecules in the mosquito midgut.*. - Int. J. Parasitol., 37(6):595-603.

Shane J.L. *et al.,* 2018 – *Blood meal-induced inhibition of vector-borne disease by transgenic microbiota.* - Nat. Commun., 9(1):4127.

Simon J.C. *et al.,* 2011 – *Facultative symbiont infections affect aphid reproduction.* - PLoS One.; 6(7):e21831.

Stouthamer R. *et al*., 1999 – Wolbachia pipientis: *microbial manipulator of arthropod reproduction.* - Annu. Rev. Microbiol., 53:71-102.

Wang S. *et al.,* 2012 – *Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes.* - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 109(31):12734-12739.

134 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 135-139*

# THE ROLE OF THE ENDOSYMBIOTIC BACTERIUM *WOLBACHIA* IN THE CONTROL OF *AEDES ALBOPICTUS*-BORNE HUMAN DISEASES

MAURIZIO CALVITTI[a] - RICCARDO MORETTI[a] - ELENA LAMPAZZI[a]

[a] *ENEA, Dipartimento per la Sostenibilità- Divisione Biotecnologie e Agroindustria, Via Anguillarese, 301, 00123 Roma*;
e-mail: maurizio.calvitti@enea.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario". Seduta pubblica dell'Accademia- Firenze, 8 giugno 2018

*The role of the endosymbiont bacterium Wolbachia in the control of* Aedes albopictus*-borne human diseases*

In recent years, the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis* acquired a leading role in the context of the biotechnological tools available for the development of innovative control strategies against vector mosquitoes. This success is mainly due to two biological properties shown by certain strains of this bacterial endosymbiont: i) the ability to induce a post-mating mechanism of reproductive incompatibility, known as Cytoplasmic Incompatibility (CI); ii) the induction of a reduced vector competence for various severe viruses once an appropriate *Wolbachia* infection has been established in suitable vectors. These properties, both alone or combined, can be exploited to reduce the epidemiological role of a target vector species through the trans-infection of opportune *Wolbachia* strains. This objective was pursued at ENEA focusing on *Aedes albopictus* through the replacement of its native *Wolbachia* infection with specific foreign strains. Herein, we review all of the results achieved by this research program and discuss them in the context of developing opportune strategies of field application. Specifically, we highlight the potential of a method of *Ae. albopictus* suppression based on the exploitation of *Wolbachia* also pointing out the needed safety and sustainability issues.

KEY WORDS: Incompatible Insect Technique, Cytoplasmic Incompatibility, vector competence, population replacement

## INTRODUCTION

*Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae), commonly known as the Asian tiger mosquito, is currently among the most invasive insect species of the world. Following the outbreaks of chikungunya virus in the Indian Ocean islands in 2005-2006 (ZELLER *et al.*, 2018) and in Italy in the summer of 2007 (207 cases) (ANGELINI *et al.*, 2007), the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) closely collaborated with experts in entomology to ensure a comprehensive understanding of the vector-related risk for introduction of the virus in Europe (ECDC, 2009). In fact, due to the effects of global warming (BARCLAY, 2008), re-emerging arboviral pathogens such as dengue and chikungunya viruses (respectively, DENV and CHIKV) have been becoming an increasing threat also in temperate regions (GASPERI *et al.*, 2012), as recently confirmed by a second Italian CHIKV outbreak occurred in summer 2017 in the Southern province of Rome (MANICA *et al.*, 2017).

The concept that vector control remains a key option in the general strategy to reduce the incidence of vector mediated diseases in humans is now consolidated in the scientific community. This is a strong incentive to focus research efforts towards the development of innovative technologies for vector control.

## THE GENETIC CONTROL METHODS: A POWERFUL WEAPON AGAINST MOSQUITO VECTORS

Current control methods against *Ae. albopictus* (insecticide spraying, larval control, source removal, community participation) show unsatisfactory results in terms of a sustainable reduction of vector density (RITCHIE and JOHNSON, 2017). It could be argued that the main reason for the weakness of conventional control practices lies in the eco-ethology of the species that makes it very adaptable to colonize a number of artificial habitats. Also, mosquitoes showed remarkable capacity to acquire resistance to several insecticides (MOYES *et al.*, 2017) and breeding sites are often located in private properties, thus making control by public institutions extremely difficult because of limited access to private properties and to the high costs of running control programs.

This, combined with recent enabling technical advances in mosquito genetics, provides the underlying motivation for the development of new genetics-based approaches that basically are imple-

– Pubblicato marzo 2019

mented as "population suppressors and/or pathogen blockers".

Among genetic control strategies, the Sterile Insect Technique (SIT) exploits the mutagenic properties of ionizing radiations (gamma and X rays) to induce male sterility (Lees *et al.*, 2015), thus exploiting classical genetic principles, while more recent genetic systems such as innovative recombinant DNA methods (Alphey *et al.*, 2010) and gene drive (Kyrou *et al.*, 2018) (Hammond *et al.*, 2016) have opened the door to the development of powerful genetics-based tools with which to fight major vector-borne diseases.

## Endosymbiotic control: *Wolbachia* as a means to induce egg sterility

A third way, the exploitation of endosymbiotic bacteria, in particular *Wolbachia*, has been progressively affirming in the last decade. *Wolbachia pipientis* is a widespread intracellular bacterium, carried by an estimated 60% of insect species as well as by some crustaceans, mites and filarial nematodes (Zug and Hammerstein, 2012). This bacterium acts like a real manipulator of host reproduction (Werren *et al.*, 2008) but some strains also inhibit pathogenic viruses replication in the vector mosquitoes representing a very promising powerful tool for controlling vectors of human diseases (Bourtzis *et al.*, 2014) (Sinkins, 2013).

Cytoplasmic incompatibility (CI) is the most frequently found *Wolbachia*-induced phenotype and has been described in several arachnids, isopods and insect orders (Werren, 2008). Sperm from *Wolbachia*-infected males is incompatible with eggs from females that do not harbour *Wolbachia* or are infected with a different *Wolbachia* strain (or strains). *Wolbachia*-mediated CI acts through two distinct mechanisms: sperm modification during spermatogenesis and rescue of this modification in eggs infected with the same *Wolbachia* strain. In the absence of compatible *Wolbachia* strains, the fertilisation fails and development of the embryo is disrupted. The molecular mechanisms that underlie CI are still not known with certainty, despite considerable work carried out on the phenomenon and various proposed mechanisms (Bossan *et al.*, 2011) (Le Page *et al.*, 2017) (Beckmann *et al.*, 2017).

## Exploiting *Wolbachia*-induced sterility to enhance suppression strategies against *Ae. albopictus*

Modern biotechnology techniques allow us to artificially transfer this endosymbiont bacterium from a species to the other, offering the possibility to generate new patterns of CI and enlarging the list of target species for *Wolbachia*-based control strategies. The technology used for this purpose, namely transinfection, is based on the microinjection of *Wolbachia* infected ooplasm containing the appropriate *Wolbachia* strain into recipient insect embryos.

In 2008, a new *Ae. albopictus* line was established in ENEA Casaccia Research Center (Roma) through the replacement of the wild-type *Wolbachia* infection (wAlbA and wAlbB strains) with a *Wolbachia* strain caught from *Culex pipiens molestus* (Calvitti *et al.*, 2010). The new mosquito line, named ARwP, was characterized in the subsequent years and selected to eliminate the fitness costs initially associated with the new infection (Calvitti *et al.*, 2012). ARwP *Ae. albopictus* displays a bidirectional CI pattern with the wild-type populations and shows other biological traits which were found favourable for mass production and field application as a suppression tool against this vector species (Puggioli *et al.*, 2016).

The *Wolbachia*-based Incompatible Insect Technique (IIT), relies on the release of large numbers of "incompatible males" to significantly reduce the mean egg fertility of the target population. It may offer a highly efficient approach to reach this objective because it can conjugate high efficacy and specificity with sustainable costs and negligible side-effects (Brelsfoard and Dobson, 2009) (Jeffries *et al.*, 2016). The efficiency of the approach is starting being demonstrated in the field with *Ae. albopictus* in USA (Mains *et al.*, 2016) and, more recently, ENEA obtained the authorization by the Italian Ministry of Health to carry out similar pilot trials also in Rome (Italy).

The advantage of incompatible over irradiated males, is due to the fact that the achievement of a 100% unconditional sterility, by irradiation, is generally associated with significant somatic effects which may negatively affect their male mating competitiveness and survival (Bellini *et al.*, 2013). In contrast, ARwP incompatible males preserve actually a status of healthy fertility (Moretti and Calvitti, 2013). Basically, they are sterile only when necessary, that is when they mate with wild-type females. Consequently, incompatible males preserve a natural level of mating competitiveness as demonstrated in trials performed both in small laboratory cages (Atyame *et al.*, 2016) and even more evidently under large enclosures in the field (Puggioli *et al.*, 2016).

## Managing the lack of a perfect method for sex separation

If on the one hand incompatible males may enhance the traditional SIT approach, on the other, the lack of

effective methods for sex separation remains a major constraint even more pressing in the case of IIT (Calvitti *et al.*, 2015) (Zhang *et al.*, 2015). Indeed, in large scale operations, millions of male adult mosquitoes are released each time and even a small percentage of residual females would mean that thousands of females are released. It is certain that releasing additional disease vectors in areas subjected to epidemics would not be acceptable.

While innovative methods to achieve a perfect sexing are under investigation, it is important to note that different *Wolbachia* infection types may lead to two main incompatibility patterns which drastically affect the possibility to manage the females possibly escaping from the sexing procedures.

In the case of an incompatibility pattern based on unidirectional CI (i.e releasing a triple infected *Ae. albopictus*), once contaminant females have been released into the field, they can produce progeny also by mating with wild-type males. This reproductive advantage over the wild-type females would lead to a progressive replacement of the local mosquito population by the new infection type which would reduce the effectiveness of population suppression and rule out any possibility of eradication. In addition, the new infection might spread through spatial waves gradually leading to a widespread replacement phenomenon (Dobson *et al.*, 2002) (Jiggins, 2017). Combining CI with irradiation at doses only capable to sterilise females has been proposed as a mean to reduce this risk and allow to co-releases incompatible males and a few sterile females (Zhang *et al.*, 2015).

In the case of bidirectional CI patterns, simulation models (Dobson *et al.*, 2002) and recent validation experiments (Moretti *et al.*, 2018a) support the conclusion that repeated releases of incompatible males with small percentages of contaminant females have few chances of inducing population replacement except when environments are confined or isolated and thus closed to migration. The latter condition does not impedes the occurrence of spatial waves of spreading of the new infection type that could preclude eradication purposes of isolated target populations. In contrast, when targeting population suppression in areas open to the a constant input of wild-type mosquitoes (i.e. operating in heavily infested urban areas), low rates of female co-release could be managed to target high efficiency and sustainability in wild-type suppression. In fact, the temporary establishment of conditions of coexistence between two incompatible populations (Keeling *et al.*, 2003) may enhance the effectiveness of the incompatibility in reducing the overall mean egg fertility. Because of a high rate of unproductive matings (due to bidirectional CI), these mixed populations would slow down their growth rate, until the restoration of the predominance of the wild-type population (Moretti *et al.*, 2018a).

In this context, the costs for sterile males production could be also decreased as sexing protocols could be less severe and males to be released could be reduced with respect to other approaches.

## Exploiting an *Aedes albopictus* line producing incompatible males and showing a strongly reduced vector competence

In addition to the suppression effects associated to the release of incompatible males, establishing the coexistence of two bi-directionally incompatible populations means to extend longer the slowing effect on the population growth rate, also once male releases have been stopped. In order to apply this suppression strategy we need that co-released females show a not increased or better a significantly reduced vector competence.

To generate an *Ae. albopictus* line with such characteristics, we recently microinjected the *w*Mel strain of *Wolbachia* in ARwP embryos. A new *Ae. albopictus* line was established (ARwP-M) which combines the remarkable suitability to the mass rearing protocols and male mating competitiveness shown durably by ARwP, with a reduction in the vector competence of females (Moretti *et al.*, 2018b).

Currently, this new line is under testing in laboratory to monitor the stability of the double *w*Pip and *w*Mel *Wolbachia* infection over the generations and under various rearing conditions.

## Future perspectives and conclusions

After a long phase of laboratory and semi-field studies, aimed at verifying the long-term stability of the "*w*Pip" infection in *Ae. albopictus* and its related effects on host, ARwP *Ae. albopictus* is ready for open field evaluation. In the summer of 2018 we long last obtained the permission from European and National authorities to start the first European field trials in Rome involving a mosquito line with manipulated *Wolbachia* infection. Incompatible male releases started in a limited green area of Rome (Villa Mirafiori) at the University "La Sapienza" of Rome. The project is being conducted in cooperation with the Department of Public Health of the Sapienza University of Rome and the Centro Agricoltura e Ambiente (CAA) G. Nicoli of Crevalcore (BO). The collection of data is still being completed and results, now under analysis, will be published shortly.

We hope to expand the experimental areas, as early as next year, in order to consolidate the data and obtain valuable indications on how to implement the operating issues.

## RIASSUNTO

Negli ultimi anni, il batterio endosimbionte *Wolbachia pipientis* ha acquisito un ruolo di primo piano nel contesto degli approcci biotecnologici e molecolari disponibili per lo sviluppo di strategie innovative di controllo di zanzare vettori. Tale successo è dovuto principalmente a due proprietà biologiche mostrate da alcuni ceppi di questo batterio: i) l'induzione di un meccanismo di sterilità condizionale in post-copula, noto come Incompatibilità citoplasmatica (CI); ii) l'interferenza negativa con i processi di replicazione e trasmissione di importanti virus patogeni per l'uomo.

La combinazione di queste due caratteristiche, attraverso l'impiego di linee di *Ae. albopictus* con adeguate simbiosi batteriche, può essere la base per sviluppare nuove strategie di controllo dei vettori ad elevata sostenibilità, integrabili con altre tecniche e con effetti nel lungo termine.

Nel caso di *Ae. albopictus*, modelli teorici e dati sperimentali di validazione suggeriscono che in aree target ad elevata densità di infestazione e con flussi attivi di popolazione (caratteristica di molte aree urbane), il rilascio di maschi incompatibili può agire efficacemente, secondo i canoni classici della tecnica di lotta col maschio sterile, riducendo la fertilità media della popolazione selvatica e rallentandone così il tasso di accrescimento. Tuttavia, in aree non confinate ad alta densità di zanzare, ci si aspetta che la pressione migratoria renda improbabile l'eradicazione e che, in caso di interruzione dei lanci di maschi incompatibili, la popolazione selvatica riacquisisca immediatamente il naturale tasso d'accrescimento.

Gli attuali protocolli di separazione dei sessi della zanzara tigre non consentono di escludere in modo assoluto la presenza di femmine residuali (0,2 - 1%) tra i maschi sterili da rilasciare. Nel caso si disponga di linee di *Ae. albopictus* in grado di produrre maschi incompatibili e femmine con attenuata competenza vettoriale, il ripetuto co-rilascio di femmine può determinare locali e temporanei episodi di coesistenza tra popolazione selvatica e popolazione simbioticamente modificata che, essendo tra loro sterili in modo bidirezionale, generano accoppiamenti improduttivi. Simulazioni modellistiche e verifiche sperimentali hanno evidenziato che queste condizioni inducono un significativo rallentamento della ripresa demografica della popolazione target che si protrae nel tempo anche una volta terminati i lanci di maschi. Questo si traduce in evidenti benefici per quanto riguarda la sostenibilità a lungo termine degli approcci di controllo basati su *Wolbachia* e la loro integrabilità con altri metodi di lotta.


## REFERENCES


Alphey L., Benedict M., Bellini R., Clark G.G., Dame D.A., Service M.W., Dobson S.L., 2010 – *Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis*. - Vector Borne Zoonotic Dis., 10: 295–311.

Angelini R., Finarelli A., Angelini P., Po C., Petropulacos K., Macini P., Fiorentini C., Fortuna C., Venturi G., Romi R., Majori G., Nicoletti L., Rezza G., Cassone A., 2007 – *An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy*. - Euro Surveill., 12: 3260.

Atyame C.M., Labbé P., Lebon C., Weill M., Moretti R., Marini F., Gouagna L.C., Calvitti M., Tortosa P., 2016 – *Comparison of irradiation and* Wolbachia *based approaches for sterile-male strategies targeting* Aedes albopictus*.* - PLoS One, 11: e0146834.

Barclay E., 2008 – *Is climate change affecting dengue in the Americas*? - Lancet, 371: 973-974

Beckmann J.F., Ronau J.A., Hochstrasser M., 2017 – *A* Wolbachia *deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility.* - Nat. Microbiol., 2: 17007.

Bellini R., Balestrino F., Medici A, Gentile G., Veronesi R., Carrieri M., 2013 – *Mating competitiveness of* Aedes albopictus *radio-sterilized males in large enclosures exposed to natural conditions*. - J. Med. Entomol., 50: 94-102.

Bossan B., Koehncke A., Hammerstein P., 2011 – *A new model and method for understanding* Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility*. - PLoS One, 6: e19757.

Brelsfoard C.L., Dobson S.L., 2009 – Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors*. - Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol., 17: 55–63.

Calvitti M., Marini F., Desiderio A., Puggioli A., Moretti R., 2015 – Wolbachia *density and cytoplasmic incompatibility in* Aedes albopictus*: concerns with using artificial Wolbachia infection as a vector suppression tool*. - PLoS One, 10(3): e0121813..

Calvitti M., Moretti R., Lampazzi E., Bellini R., Dobson S.L., 2010 – *Characterization of a new* Aedes albopictus *(Diptera: Culicidae)*-Wolbachia pipientis *(Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the* w*Pip strain from* Culex pipiens *(Diptera: Culicidae)*. - J. Med. Entomol., 47: 179–187.

Calvitti M., Moretti R., Skidmore A.R., Dobson S.L., 2012 – Wolbachia *strain* w*Pip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a* Wolbachia*-based suppression strategy against the disease vector* Aedes albopictus. - Parasit. Vectors, 5: 254.

Dobson S.L., Fox C.W., Jiggins F.M., 2002 – *The effect of* Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated systems.* - Proc. Biol. Sci., 269: 437–45.

ECDC, 2009 – *Development of* Aedes albopictus *risk maps*. Stockholm, May 2009.

Gasperi G., Bellini R., Malacrida A.R., Crisanti A., Dottori M., Aksoy S., 2012 – *A new threat looming over the Mediterranean Basin: Emergence of viral diseases transmitted by* Aedes albopictus *mosquitoes.* - PLoS Negl. Trop. Dis., 6: e1836.

Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Simoni A., Siniscalchi C., Katsanos D., Gribble M., Baker D., Marois E., Russell S., Burt A., Windbichler N., Crisanti A., Nolan T., 2016 – *A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector* Anopheles gambiae. - Nat. Biotechnol., 34: 78–83.

Jeffries C.L., Walker T., 2016 – Wolbachia *biocontrol strategies for arboviral diseases and the potential influence of resident* Wolbachia *strains in mosquitoes*. - Curr. Trop. Med. Reports, 3: 20–25.

Jiggins F.M., 2017 – *The spread of* Wolbachia *through mosquito populations*.- PLoS Biol., 15: e2002780.

Keeling MJ., Jiggins FM., Read JM 2003 – *The invasion and coexistence of competing* Wolbachia *strains*. - Herediy (2003) 91 382-388

Kyrou K., Hammond A.M., Galizi R., Kranjc N., Burt A., Beaghton A.K., Nolan T., Crisanti A., 2018 – OPEN A CRISPR – *Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged* Anopheles gambiae *mosquitoes* 36.

Le Page D.P., Metcalf J.A., Bordenstein S.R., On J., Perlmutter J.I., Shropshire J.D., Layton E.M., Funkhouser-Jones L.J., Beckmann J.F., Bordenstein

S.R., 2017 – *Prophage WO genes recapitulate and enhance* Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility*. - Nature, 543: 243–247.

Lees R.S., Gilles J.R., Hendrichs J., Vreysen M.J., Bourtzis K., 2015 – *Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors*. - Curr. Opin. Insect Sci., 10: 156-162.

Mains J.W., Brelsfoard C.L., Rose R.I., Dobson S.L., 2016 – *Female adult* Aedes albopictus *suppression by* Wolbachia*–infected male mosquitoes*.- Sci. Rep., 6: 33846.

Manica M., Guzzetta G., Poletti P., Filipponi F., Solimini A., Caputo B., Rosà R., Merler S., 2017 –*Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy: from coastal areas to the metropolitan city of Rome, summer 2017.* - Euro Surveill., 22: 1–8.

Moretti R., Calvitti M., 2013 – *Male mating performance and cytoplasmic incompatibility in a* wPip Wolbachia *trans-infected line of* Aedes albopictus *(*Stegomyia albopicta*)*. - Med. Vet. Entomol., 27: 377–386.

Moretti R., Marzo G.A., Lampazzi E., Calvitti M., 2018a – *Cytoplasmic incompatibility management to support Incompatible Insect Technique against* Aedes albopictus. - Parasit. Vectors, in press. doi: https://doi.org/10.1186/s13071-018-3208-7

Moretti R., Yen P., Houé V., Lampazzi E., Desiderio A., Failloux A., Calvitti M., 2018b – *Combining* Wolbachia*-induced sterility and virus protection to fight* Aedes albopictus*-borne viruses.* - PLoS Negl. Trop. Dis., 12: e0006626.

Moyes C.L., Vontas J., Martins A.J., Ng L.C., Koou S.Y., Dusfour I., Raghavendra K., Corbel V., David P., Weetman D., 2017 – *Contemporary status of insecticide resistance in the major* Aedes *vectors of arboviruses infecting humans*. - PLoS Med., 11: e0005625.

Puggioli A., Calvitti M., Moretti R., Bellini R., 2016 – w*Pip* Wolbachia *contribution to* Aedes albopictus *SIT performance: advantages under intensive rearing*. - Acta Trop., 164: 473-481.

Ritchie S.A., Johnson B.J., 2017 – *Advances in vector control science: rear-and-release strategies show promise… but don't forget the basics.* - J. Infect. Dis., 215(Suppl. 2): S103-S108.

Sinkins S.P., 2013 – Wolbachia *and arbovirus inhibition in mosquitoes*. - Future Microbiol., 8: 1249–1256.

Werren J.H., Baldo L., Clark M.E., 2008 – Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology*. - Nat. Rev Microbiol., 6: 741–751.

Zeller H., Van Bortel W., Sudre B., 2018 – *Chikungunya: its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013 – 2014*. - J. Infect. Dis., 214 (Suppl. 5): S436-S440.

Zhang D., Lees R.S., Xi Z., Gilles J.R.L., Bourtzis K., 2015 – *Combining the sterile insect technique with* Wolbachia*-based approaches: II - A safer approach to* Aedes albopictus *population suppression programmes, designed to minimize the consequences of inadvertent female release*. - PLoS One, 10: e0135194.

Zug R., Hammerstein P., 2012 – *Still a host of hosts for* Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected*. PLoS One, 7: e38544.

# 140 - Pagina bianca

Seduta pubblica, Firenze 16 novembre 2018

Tavola Rotonda su:

# ESTINZIONI GLOBALI ED ESTINZIONI LOCALI

Coordinatori:
Achille Casale e Emilio Balletto, Accademici

142 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 143-148*

# ESTINZIONI LOCALI O GLOBALI. L'ESTINZIONE IN ENTOMOLOGIA: MITO O REALTÀ? INTRODUZIONE A UNA TAVOLA ROTONDA

ACHILLE CASALE[a]

[a] *C/o Università di Sassari (Zoologia). Privato: Corso Raffaello 12, 10126 Torino*.
E-mail: a_casale@libero.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018.

*Local or Global extinctions. Extinction in Entomology: myth or reality? Introduction to a Round Table*

A brief overview of the current knowledge of the biological Extinction as a whole, and the insect species extinction in particular, is presented. The Italian National Academy of Entomology has organized in Florence (November 16, 2018) a Round Table entitled "Global extinctions and local extinctions", intended to provide a general overview of a well known phenomenon in the history of life – the Extinction – with particular focus to insects of Italian and European faunas. This round table has been attended by Italian researchers, affiliated to the Universities of Aarhus (Slaelse, Denmark), Cosenza, L'Aquila, Rome Sapienza, Roma 2, Rome 3, Sassari, Turin, Viterbo, who presented syntheses of problems related to various taxonomic groups of insects (in particular Lepidoptera and Coleoptera, for which many data are available). Aim of this note is to present some introductory remarks on general or particular cases of ancient and recent Extinction, which should be also important for planning future conservation strategies of species and their habitats.

KEY WORDS: Extinction, insects, little knowledge, habitat loss, alien species.

## L'ESTINZIONE: UN FENOMENO NATURALE E INELUTTABILE NELLA STORIA DELLA VITA SULLA TERRA

Nel trattare di Estinzione in Entomologia, merita indubbiamente inquadrare e riassumere il fenomeno in un contesto molto più ampio, che riguarda in generale sia la Biologia evolutiva, sia la Biologia della Conservazione. Alcuni dei dati che seguono potranno pertanto sembrare scontati o molto semplificati a chi si occupi di tali problemi, ma forse riusciranno interessanti nel loro insieme.

Come ha recentemente ricordato MANZI (2017), quando la nostra specie (*Homo sapiens*) comparve sulla terra più di 200.000 anni fa, il 99% delle specie esistite in precedenza si era estinto. L'estinzione di una specie rappresenta dunque un evento ineluttabile e complesso nel corso dell'Evoluzione (LÖVEI, 2001), così come lo è la morte di un individuo al termine del suo ciclo vitale.

Esistono tuttavia diverse tipologie di estinzioni documentate: 1. Le estinzioni possono essere di tipo quasi subitaneo ed essere causate da eventi catastrofici o da radicali mutamenti delle condizioni ambientali del pianeta. Possono coinvolgere in questo caso interi gruppi animali. Com'è noto, le maggiori estinzioni nella storia della Terra sono state almeno cinque, con un drammatico picco alla fine del Permiano (BENTON, 2015), e di ciascuna di esse un'enorme letteratura scientifica è disponibile e in gran parte consultabile on line. 2. Possono altresì essere di tipo cronico, progressivo, globale o locale, o in anni recenti causate da rapide modificazioni ambientali, cambiamenti climatici, uso di pesticidi, prelievo eccessivo da parte dell'uomo o introduzione di specie alloctone (fenomeno quest'ultimo particolarmente drammatico e documentato nelle aree insulari, *Homo sapiens* incluso).

La letteratura moderna ci informa che nell'era attuale, cosiddetta Antropocene, i tassi di estinzione nel mondo sono cresciuti in modo allarmante negli ultimi 150 anni e numerose specie sono oggi considerate "critically endangered". Ciononostante, i dati disponibili sui tassi di estinzioni attuali e sulle stime di estinzioni future sono estremamente eterogenei e spesso non confrontabili, o non supportati da dati oggettivi. I grandi numeri di estinzioni (10.000 specie/anno, molte delle quali mai descritte), di cui si sente talora parlare a livello mediatico, sono spesso basate su estrapolazioni della curva specie-area ottenute in base ai calcoli delle Biogeografia Insulare trasferiti su scale continentali (Balletto, com. personali). Ad esempio: 1, Se un solo albero della foresta amazzonica ospita un tot di specie, e 2, se ogni anno si distrugge un $x$ di foreste tropicali, a questo deve corrispondere un $y$ di estinzioni. In base a questo postulato, si è pure preteso di calcolare il numero totale delle specie presenti sul pianeta (MAY, 1986).

– Pubblicato marzo 2019

## Estinzione e conservazione: una lotta impari

La IUCN elenca 697 specie animali che si sono estinte (EX) a partire dal 1500. A queste si aggiungono 36 specie oggi estinte nei loro ambienti naturali (EW). La Lista rossa della IUCN 2018 segnala inoltre 26.500 specie di piante e animali minacciate di estinzione.

I casi ben documentati di estinzioni, o di allarmanti riduzioni delle popolazioni conosciute, riguardano essenzialmente vertebrati, in particolar modo i mammiferi: solo negli ultimi 25 anni, il continente africano ha perso il 40% delle popolazioni di leoni e giraffe, il 48% di elefanti e il 60% di rinoceronti e di gorilla. Ma pure paesi europei come la Scozia, in 60 anni, hanno perso il 99% della locale popolazione di lepre variabile (*Lepus timidus*), e l'orso bruno ("grizzly") occupa oggi meno del 2% del suo originario areale in Nord America. Per quanto riguarda i mammiferi, l'America centrale, il Madagascar e l'Indonesia sono le aree con il massimo rischio di estinzioni in un prossimo futuro (World Bank Data, 2018). Ma pure numerose specie di pesci di acque interne o stigobi, di anfibi, rettili e uccelli sono considerate *threatened* o *endangered*, oppure già estinte. Va detto che gli sforzi per la conservazione hanno avuto in anni recenti qualche buon risultato: ad esempio alcuni cetacei, il gorilla di Montagna (*Gorilla beringei*), numerose specie di uccelli e altri taxa, grazie a un significativo incremento di individui censiti, sono stati rimossi dalla categoria di "*Critically Endangered*" a quella di "*Endangered"*.

Un'analisi interessante ci viene inoltre fornita da tre anni di indagini portate avanti da Alliance for Zero Extinction (AZE), BirdLife International, International Union for Conservation of Nature (IUCN) and American Bird Conservancy (ABC), che hanno mappato e identificato le uniche località del mondo dove sono presenti specie di piante e animali altamente minacciate. La ricerca ha individuato 1.483 specie minacciate presenti in una sola località e 853 aree AZE. Delle 1.483 specie censite, 41% appartengono agli anfibi, 15% ai mammiferi, 13% agli uccelli, 10% ai crostacei di acque dolci, 9% alle Cactacee, 4% alle Cycadales e l'8% appartengono ad altri taxa. Il 78% degli 853 siti AZE sono indicati per una singola specie, ma alcuni ospitano numerose specie di differenti gruppi tassonomic (IUCN Red List of Threatened Species™).

Minelli & Rigato (2013) hanno sottolineato come la maggior parte degli sforzi che l'uomo compie per la salvaguardia delle specie animali minacciate si concentri su una frazione limitata di queste, privilegiando i rappresentanti di Mammiferi e Uccelli e, fra questi, alcune specie più vistose, carismatiche o iconiche, come ad esempio la tigre, il panda maggiore, le scimmie antropomorfe, i lemuri. La posizione di privilegio di cui godono questi animali è già evidenziata dal fatto che solo per esse sono disponibili informazioni dettagliate e regolarmente aggiornate. Informazioni di questo tipo, che rappresentano il punto di partenza per una qualsiasi misura di politica di conservazione, sono assenti per la stragrande maggioranza delle specie animali.

Vorrei tuttavia aggiungere che la funzione pratica di queste specie, come "specie ombrello" per la tutela di determinate aree, non va sottovalutata. Il concetto di *umbrella species,* più volte criticato in un recente passato, è stato di recente discusso e rivalutato (si veda ad es. Breckheimer *et al.*, 2014). Se è vero che la conservazione di una singola "specie ombrello" non può di per se sola garantire la conservazione di un intero ecosistema, è pur vero che da un punto di vista pragmatico è più facile proporre a un governo l'istituzione di un parco nazionale o di un'area protetta per la conservazione di un gorilla, di una tigre o di un lemure che per la conservazione di una farfalla o di un coleottero, e quell'area protetta potrà garantire, entro certi limiti, la conservazione di un ecosistema tutelato per il prossimo futuro. In fondo, questo concetto non è molto lontano da quello della Direttiva Habitat dell'Unione Europea, che ha individuato un certo numero di specie (in varie categorie di priorità di conservazione, talora scelte con criteri molto discutibili), grazie alle quali sono stati istituiti numerosissimi SIC e ZPS nell'ambito del progetto Bioitaly-Natura 2000.

Va anche detto che la perdita di alcune specie di mammiferi, di per sé sola, rappresenterebbe una perdita di decine di milioni di anni di evoluzione (Davis *at al*., 2018), e che coloro che si occupano correntemente di conservazione non dispongono di risorse illimitate per il loro lavoro, ma anzi spesso si scontrano con difficoltà di ogni genere.

## L'estinzione in Entomologia: un fatto ben documentato

Per quanto riguarda gli invertebrati, si può affermare che una frazione importante delle circa 1.500.000 specie animali descritte fino ad oggi è conosciuta solo sulla base di un singolo o di pochi esemplari sui quali la specie è stata descritta. Sostanzialmente, l'unico dato di cui disponiamo è sapere che tali specie esistono.

Ma cosa sappiamo degli Insetti estinti? Non meno di 15.000 taxa di Insetti fossili o subfossili sono stati descritti finora, e alcuni appartengono a Ordini attualmente estinti. Alla fine del Permiano, si assiste all'estinzione di molti gruppi tipici del Paleozoico e all'avvento di ordini presenti ancora oggi (Labandeira & Sepkoski, 1993). Fino a non molti anni fa, gran parte delle conoscenze sugli insetti fossili ci proveniva da reperti in ambra baltica, risalente a 40-45 milioni

di anni fa, o fissati su lastre di varia datazione. Negli ultimi anni, un gran numero di reperti sono stati pubblicati su diverse riviste, provenienti da sedimenti del Mesozoico localizzati in Cina, Myanmar, Giappone, Argentina, Sudafrica e in altre aree. Ma pure reperti in Europa hanno fornito una grande quantità di dati su taxa estinti: un buon esempio è il sito fossilifero di Monte San Giorgio, al confine italo-svizzero, che ha rivelato campioni eccezionalmente ben conservati risalenti al Triassico Medio (Montagna *et al*., 2018).

È stato anche possibile ricostruire la storia evolutiva di gruppi molto antichi quali gli Archostemata, piccolo sottordine di Coleotteri con circa 50 specie conosciute divise in 5 famiglie. I depositi fossili del Permiano mostrano una grande distribuzione del sottordine in tutto il globo. Le specie sopravvissute di alcune famiglie (es. Cupedidae) sono relitti di antiche distribuzioni (Friedrich *et al.*, 2008). Non sono inoltre da sottovalutare gli enormi risultati ottenuti recentemente nello studio di tali reperti, grazie a indagini realizzate con tecnologie molto avanzate, quali la dissezione virtuale di esemplari mediante la microtomografia ai raggi X in laboratori attrezzati (Perreau, 2011).

## Estinzioni recenti o attuali in Entomologia, fra mito e realtà

E veniamo ai dati, e ai fatti, che riguardano le conoscenze sulle Estinzioni attuali in Entomologia. Conosciamo perfettamente alcuni dati: numero enorme di specie in continua crescita (centinaia di nuove specie descritte ogni anno, a dispetto della "crisi della tassonomia"), estrema scarsità di conoscenze su alcuni gruppi e in alcune aree, difficoltà di censimento, poca o errata conoscenza dell'habitat di elezione, in molti casi estrema brevità di fenologia di alcune specie o addirittura di un solo sesso di una specie, difficoltà di reperimento di specie criptiche legate ad ambienti particolari (ad esempio: ambienti sotterranei o *canopies* di foreste tropicali). Inoltre, continuamente, in tutte le parti del mondo sono segnalate le "riscoperte" di specie non più reperite da decenni o già dichiarate estinte.

Se le estinzioni o le drammatiche rarefazioni locali di popolazioni sono facilmente documentabili e dimostrate per profonde modificazioni ambientali apportate dall'urbanizzazione, dalla deforestazione, da pratiche di agricoltura intensiva o da altre modificazioni di habitat, le estinzioni globali meritano invece di essere sempre verificate. Parafrasando quanto scritto da Edgard Wilson (1993), nel suo stupendo testo che ha creato il termine di Biodiversità, "nessuno potrà mai sapere quando l'ultimo rappresentante di una specie di farfalle sarà predato in una notte sulla volta di una foresta tropicale".

In Italia, a partire dalla metà del secolo scorso, alcuni autori hanno richiamato l'attenzione su specie presumibilmente minacciate da overcollecting per collezionismo, a causa della loro rarità, localizzazione o bellezza. Sono da citare ad esempio, fra i "miti" in un gruppo di cui lo scrivente si è particolarmente occupato, *Carabus olympiae* nelle Alpi occidentali (Fig. 1A), che è divenuto il "Carabo estinto" per antonomasia grazie a un delizioso capitolo che Mario Sturani dedicò a questa specie nel suo libro Caccia Grossa fra le Erbe (Sturani, 1942). Lo stesso Sturani, tuttavia, fu in grado successivamente di ritrovare la specie in natura e di documentarla in pregevoli contributi scientifici (1947). In anni più recenti Bruno (1968) e Tassi (1969), in contributi in gran parte aneddotici, hanno citato rispettivamente come estinti o minacciati *Carabus planatus,* specie endemica di Madonie e Nebrodi (Sicilia) e *Carabus cavernosus variolatus* nell'Appennino centrale. Tali informazioni si sono rivelate palesemente errate (Casale *et al*., 1982), ma comunque pionieristiche nel panorama entomologico nazionale, che cominciava a prendere coscienza di reali problemi di conservazione. Nel caso di *Carabus olympiae*, infatti, un monitoraggio recente mediante radiotracking (Negro *et al.,* 2008) ha dimostrato come tale specie sia vulnerabile, essendo strettamente legata ad ambienti coperti da foreste di latifoglie (*Fagetalia*) o cespugli (*Rhodoreto-Vaccinetum*), e incapace di disperdersi attraverso terreni aperti e denudati trasformati in pascoli o piste da sci (Fig. 1B).

Non mancano poi i casi di presunte estinzioni di organismi ipogei, di piccolissime dimensioni, rari, estremamente localizzati e difficilissimi da censire: da citare fra i molti il caso del Coleottero Carabide *Duvalius sardous* (endemico del Monte Albo, Sardegna orientale) (Cassola, 1982), poi ritrovato in numerose cavità dallo scrivente, o del Ditiscide *Siettitia balsetensis,* scoperto in Francia e descritto nel 1904 da Abeille de Perrin, oggi considerato estinto nella red list dell'IUCN, di un gruppo di Coleotteri stigobi e freatici la cui conoscenza è scarsissima e legata a reperti occasionali, come dimostrato dalla recente descrizione di un nuovo genere e specie (*Etruscodytes nethuns*) in località ben investigate della Toscana (Mazza *et al*., 2013).

Rimane il fatto che le iniziative e i provvedimenti per la conservazione di specie di Insetti si sono rivelati quasi sempre inadeguati, velleitari, talora patetici o addirittura palesemente dannosi alla Scienza: "liste rosse" di vario livello, "direttive", leggi regionali per proteggere una singola specie (o addirittura "generi", poi modificati per ragioni di nomenclatura o per revisioni a livello filogenetico), divieti di raccolta in determinati ambienti, fino al divieto assoluto di prelievo su interi territori nazionali (ad esempio in Spagna o in Croazia). Tutte norme risultate palesemente inattuabili, irrealizzabili e antiscientifiche, e come tali mai rispettate e mai fatte rispettare da nessuno, mentre le modificazioni

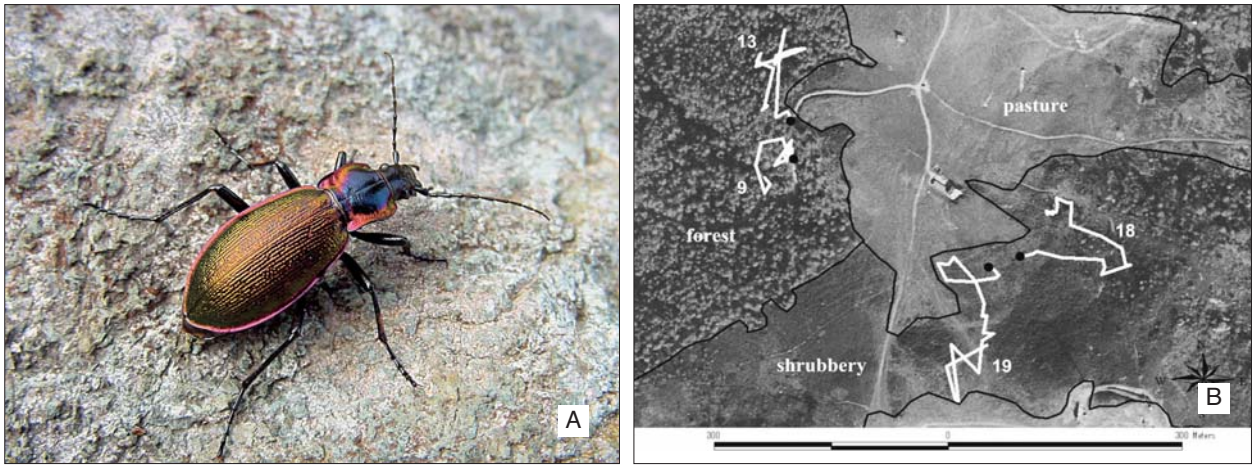



Fig. 1 – A: *Carabus olympiae* Sella, 1855, il "carabo estinto" per antonomasia (foto M. Raviglione); B: movimenti di quattro individui di *C. olympiae* muniti di radiocollare in località tipica (alta Val Sessera, Piemonte), da cui si evidenzia lo stretto legame della specie ad ambienti con foresta a *Fagus* e fitti cespugli di Rododendro e Mirtillo, e la sua incapacità di colonizzare aree denudate da pascoli o piste da sci (da Negro et al., 2008).

e le distruzioni degli ambienti, il consumo del suolo, l'uso di pesticidi e le pratiche colturali hanno continuato e continuano senza sosta a erodere la diversità biologica e a determinare la scomparsa di popolazioni di specie di grande interesse, spesso ignorate in quanto non amate dal pubblico e irrilevanti dal punto di vista estetico.

L'estinzione attuale e totale in Entomologia tuttavia esiste, e talora può essere indotta da fattori inaspettati che agiscono molto rapidamente. Un caso (ben documentato e seguito dallo scrivente in Italia per molti anni) riguarda un Coleottero Carabide di notevoli dimensioni e di grande interesse, appartenente a una sottospecie endemica italiana. Si tratta di *Carabus clatratus antonellii*, descritta da Luigioni nel 1921 del Lazio (Maccarese) (Fig. 4 A), la cui distribuzione storica e la cronogeonemia in Italia è nota in dettaglio (Brandmayr *et al*., 2006) (Fig. 3). *C. clatratus* è una delle pochissime specie del genere, su 800 circa conosciute nella Regione Oloartica, i cui adulti presentano obbligatoriamente abitudini acquatiche (Fig. 4 B), e quindi necessitano di ambienti umidi sufficientemente estesi e ben conservati (Fig. 2 A, B). Essa inoltre, come altri Carabidi pteridimorfici con alcuni individui in grado di volare, presenta (o presentava) una grande distribuzione in gran parte dell'Europa (Penisola Iberica esclusa) e in Asia fino alla Siberia. La scomparsa o la modificazione di molte zone umide in tutto l'areale ha portato la specie, peraltro non tutelata da alcun norma di protezione, al rischio di estinzione in molti paesi europei (Turin *et al*., 2003). Ciò è tanto più grave nelle nazioni meridionali del continente europeo (Francia, Italia, Penisola Balcanica), dove il taxon – vero relitto pleistocenico – è (o era) rappresentato da sottospecie molto ben differenziate sia morfologicamente, sia da un punto di visto genetico (Mossakowski, in litteris).

A partire dal 1985-90, *C. clatratus* ha iniziato un veloce quanto inaspettato declino in alcune località italiane (Padule di Fucecchio in Toscana, zona di Ravenna in Emilia-Romagna, fra le altre), peraltro ben conservate, dove fino a quel momento era stato molto abbondante. Inizialmente, tale declino fu attribuito alle condizioni particolarmente calde e

Fig. 2 – A: Zona umida protetta in Italia (Padule di Bientina, Toscana), dove *C. clatratus antonellii* era presente, ma oggi risulta introvabile a causa della presenza invasiva di *Procambarus clarkii* (foto A. Casale e M. Meregalli, 2018). B: Zona umida protetta in Olanda settentrionale, dove *C. clatratus clatratus* è ancora presente e abbondante (foto A. Casale, 2014);

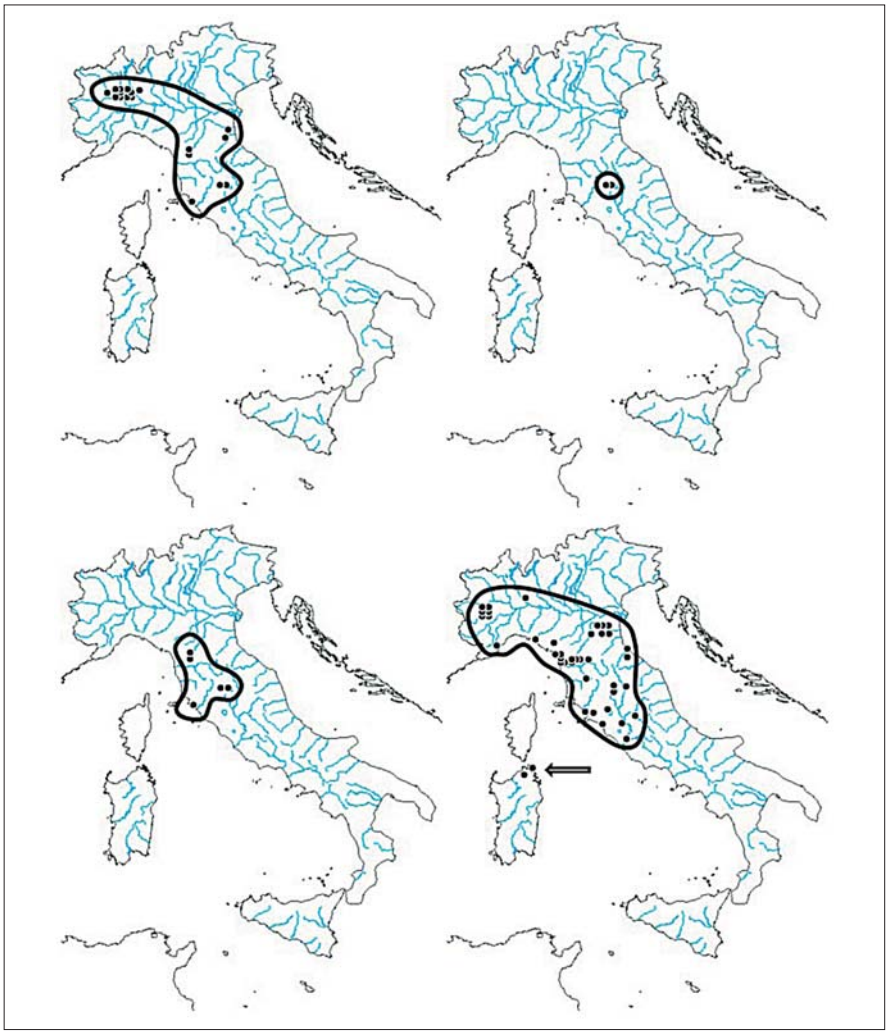


Fig. 3 – Cronogeonemia di *Carabus clatratus antonellii* Luigioni, 1921 e di *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Italia. In alto a sinistra: *C. clatratus antonellii* 1970-1980; in basso a sinistra: 1990; in alto a destra: 2000-2007 (Laghi di Chiusi e Montepulciano, Toscana); in basso a destra: espansione di *P. clarkii* in Italia dal 1980 al 2007.

Fig. 4 – A: *Carabus clatratus antonellii*, esemplare in ibernazione al Lago di Chiusi (Toscana) (foto A. Vigna Taglianti); B: *C. clatratus antonellii,* esemplare in acqua-terrario (foto E. Busato); C: predazione di *C. clatratus antonellii da parte di P. clarkii* (foto E. Busato) (da Casale & Busato, 2008).

siccitose dell'anno 2003 in tutta la penisola italiana. Successivamente, grazie a numerose osservazioni sul campo e in laboratorio, tale declino fu documentato e attribuito all'espansione drammatica in tutta Italia di una specie aliena di grandi dimensioni, il gambero della Louisiana *Procambarus clarkii*, in grado di predare efficacemente il carabo negli ambienti acquatici frequentati (Fig. 4 C). Gli ultimi esemplari censiti con certezza provengono dai Laghi di Chiusi e Montepulciano (Toscana) nel 2006 e 2007, dove furono prelevati e posti in allevamento nei laboratori dell'Università di Torino, dai quali furono ottenuti da E. Busato numerosissimi individui adulti rilasciati in natura in aree idonee e ritenute non invase da *Procambarus clarkii* (Casale & Busato, 2008). Purtroppo, la specie aliena e invasiva ha rapidamente colonizzato anche tali aree, e *Carabus clatratus* (con la sua sottospecie endemica italiana *antonellii*), in base anche a ricerche effettuate molto recentemente (2018) in siti idonei dallo scrivente, è oggi da ritenere definitivamente estinta in Italia, fino a prova contraria. Da informazioni attendibili, il medesimo fenomeno pare essere in atto o già avvenuto in gran parte della Francia meridionale, dove era presente *C. clatratus arelatensis*.

In questo caso, sostanzialmente, in un'area continentale si è riprodotto un fenomeno ben noto in aree insulari, dove l'introduzione di specie aliene può causare e ha causato estinzioni di specie o sottospecie endemiche in un arco temporale molto breve.

## BIBLIOGRAFIA


Benton M.J., 2015 – *When Life Nearly Died: the Greatest Mass Extinction of All Time* (Revised Edition). London, Thames & Hudson.

Brandmayr P., Casale A., Puzzo F., Scalercio S., 2006 – *Chronogeonemy analysis: some examples regarding species of the Italian fauna.* In: Ruffo S. & Stoch F. (Eds.). Checklist and distribution of the Italian fauna. Memorie del Museo civico di Storia naturale, Verona, 2.serie, Sezione Scienze della Vita, 17: 41-45.

Breckheimer I., Haddad N., Morris W. F., Trainor A., Fields W.R., Jobe R.T., Hudgens B.R., Moody A., Walters J.R., 2014 – *Defining and Evaluating the Umbrella Species Concept for Conserving and Restoring Landscape Connectivity*. - Conservation Biology, 28 (6): 1584-1593.

Bruno S., 1968 – *Distribuzione, morfologia ed ecologia del Carabus* (*Macrothorax*) *planatus* Chaudoir 1843 (Coleoptera, Carabidae, Carabinae). - Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze naturali, Catania, 4 (9): 733-753.

Casale A., Busato E., 2008 – *A real time extinction: the case of Carabus clatratus in Italy* (Coleoptera, Carabidae). In: Penev L., Erwin T, Assmann T. (Eds.). Back to the Roots and Back to the Future. Proceedings of the XIII European Carabidologists Meeting, Blagoevgrad, August 20-24, 2007: 353-362.

Casale A., Sturani M., Vigna Taglianti A., 1982 – *Coleoptera, Carabidae. I. Introduzione, Paussinae, Carabinae*. Fauna d'Italia, 18, Calderini (ed.), Bologna, 499 pp.

Cassola F., 1982 – *Il popolamento cavernicolo della Sardegna.* - Lavori della Società italiana di Biogeografia, Siena (n.s.) 7 (1978): 615-755.

Davis M., Faurby S., Svenning J.-C., 2018 – *Mammal diversity will take millions of years to recover from the current biodiversity crisis*. - Proceedings of the National Academy of Sciences, 115*(44), 11262-11267.* DOI: 10.1073/pnas.1804906115

Friedrich F., Farrell B.D., Beutel R.G., 2008 – *The thoracic morphology of Archostemata and the relationships of the extant suborders of* Coleoptera (Hexapoda). - Cladistics, 24: 1-37.

Labandeira C.C., Sepkoski J.J., 1993 – *Insect diversity in the fossil record*. Science, 261: 310-315.

Lövei G., 2001 – *Extinctions, modern examples of*. In: Encyclopedia of Biodiversity, 2. Academic Press.

Manzi G., 2017 – *Ultime Notizie sull'Evoluzione Umana*. Il Mulino Ed., Bologna.

Mazza G., Cianferoni F., Rocchi S., 2013 – *Etruscodytes nethuns* n. gen., n. sp.: *the first phreatic water beetle from Italy* (Coleoptera: Dytiscidae: Hydroporinae). - Italian Journal of Zoology, 2013: 1-9.

May R. M., 1986 – *How many species are there?* - Nature, 324: 514-515.

Minelli A. & Rigato E., 2013 – *L'uomo e le specie minacciate da un involontario parassitismo a un'auspicabile simbiosi mutualistica*. - Animal Studies, Roma, 2: 38-53.

Montagna M., Strada L., Dioli P., Tintori A., 2018 – *The Middle Triassic lagerstätte of Monte San Giorgio reveals the oldest lace bugs* (Hemiptera: Tingidae): *Archetingis ladinica* gen. n. sp. n. - Rivista italiana di Paleontologia, 124: 35-44.

Negro M., Casale A., Migliore L., Palestrini C., Rolando A., 2008 – *Habitat use and movement patterns in the endangered ground beetle species Carabus olympiae* (Coleoptera, Carabidae). - European Journal of Entomology, 105: 105-112.

Perreau M., 2011 – *Virtual dissection using phase-contrast X-ray synchrotron microtomography: reducing the gap between fossils and extant species*. - Systematic Entomology, 36: 573-580.

Sturani M., 1942 – *Il carabo estinto*. In: Caccia Grossa fra le Erbe. Torino, Einaudi, 113 pp.

Sturani M., 1947 – *Notizie ecologiche ed etologiche sul Carabus olympiae* Sella (Coleoptera Carabidae). - Bollettino dell'Istituto di Entomologia dell'Università di Bologna, 16: 23-84.

Tassi F., 1969 – *Problemi di conservazione nel campo dell'Entomologia*. - Memorie della Società entomologica Italiana, 48: 609-626.

Turin H., Penev L., Casale A. (Eds.), 2003 – *The genus Carabus in Europe - a synthesis*. Pensoft Publishers & European Invertebrate Survey, Sofia, Moscow & Leiden, 511 pp.

Wilson E. O., 1993 – *The diversity of life*. Harvard (Ediz. Italiana: Rizzoli).

World Bank Data, 2018 – 3.4 *World Development Indicators: Deforestation and biodiversity*. Available on line.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 149-150*

# THE POSSIBLE CONSEQUENCES OF INVASIONS: WILL THEY CAUSE EXTINCTIONS OR NOT?

GÁBOR L. LÖVEI[a]

[a] *Aarhus University, Department of Agroecology, Flakkebjerg Research Centre, DK-4200 Slagelse, Denmark;*
e-mail: gabor.lovei@agro.au.dk
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018.

*The possible consequences of invasions: will they cause extinctions or not?*

Invasions are arguably one of the major factors in global change, and cause profound ecological effects in the invaded areas. Many of these effects are negative and unwanted, yet there is serious debate whether invasions can cause extinctions - except on islands that are acknowledged to be especially vulnerable. Invasions are increasing world-wide, and the traditional view that Europe and Europeans are mostly responsible for supplying non-native species to areas they colonised, is no longer tenable. Europe today has over 10,000 non-native, naturalised species, several of them causing environmental harm. Although records of invertebrate extinctions are scarce, a recent global synthesis for vertebrates indicates the potential of invasive organisms to cause extinctions in the invaded areas. Simple biogeographical considerations show that isolation has been important in generating the current global biodiversity. Unchecked, unlimited invasions will decrease global biodiversity, mainly by removing these biogeographical barriers. Due to the phenomenon of extinction debt, these detrimental effects may remain hidden for centuries.

KEY WORDS: biodiversity, invasive organisms, ecological effects, extinction.

Humankind's predilection for the "exotic" has been a continuous thread through history: exotic plants, fruits, flowers and animals have had a strong attraction, and high value, and consequently, have been moved regularly between countries and continents (LÖVEI, 2016). Many of our major cultivated plants are also more widely grown and more important elsewhere than in their areas of origin (LEFF *et al.,* 2004). We can state that humans have always been important agents in spreading non-native organisms world-wide. However, in the 20th century, a step change occurred: globalization has accelerated, and this increased connectivity, effectively removing biogeographical barriers and causing a huge increase in the frequency of such movements (PYSEK *et al.,* 2010), often inadvertently, and these often triggered invasions.

Invasions are increasing world-wide, and the traditional view that Europe and Europeans are mostly responsible for supplying non-native species to areas they colonised (CROSBY, 1993), is no longer tenable. Europe itself today has over 10,000 non-native, naturalised species (HULME & ROY, 2010), several of them causing environmental harm (VILA *et al.,* 2010).

The number of new records/y has increased exponentially since 1500. In Europe, there has been an acceleration in the number of non-native species since 1950; between 2000-2008, this amounted to 19.6 new alien species/y (ROQUES, 2010). This acceleration is most closely mirrored by phytophagous species, probably with the plant trade; the contribution of detritivores, parasitoids and predators has decreased (ROQUES, 2010).

Invasions are often listed as one of the major causes of biodiversity loss, and the classical paper by VITOUSEK *et al.* (1997) posited that invasions should be considered an element of global change. Indeed, many of the effects of invasions are negative and unwanted. But do they cause extinctions? Although records of invertebrate extinctions are scarce, a recent global synthesis for vertebrates indicates the potential of invasive organisms to cause extinctions in the invaded areas (BELLARD *et al.,* 2016a,b).

In spite of this, there is serious debate whether invasions can cause extinctions - except on islands that are acknowledged to be especially vulnerable. TILMAN (2011), for example, claims that: ..."In total, coexistence of trophically and ecologically similar species long has been the norm following speciation or migration among realms. ...". However, simple biogeographical considerations also show that isolation has been important in

– Pubblicato marzo 2019

generating the current global biodiversity. For example, the prediction, based on the well-known species-area relationship, is that all the terrestrial habitats, combined globally, would support ca. 2000 species of mammals. In reality, there are more than 4200 mammal species on Earth. WRIGHT (1987) proves that the same applies to several other groups of organisms, although the difference between predicted and actual numbers depend on dispersal power of the group in question. The role of biogeographical barriers in maintaining biodiversity is undeniable.

Unchecked, unlimited invasions would decrease global biodiversity, mainly by removing these biogeographical barriers. Human activity is already removing the pre-existing biogeographical barriers, essentially "recreating Pangea" (THOMAS, 2017). Consequently, entry is arguably no longer the main problem for invasive alien species.

Arguments against biodiversity loss as a consequence of invasions point to the fact that in several areas, overall local species richness increased rather than decreased. Due to the phenomenon of extinction debt (DIAMOND, 1972, HALLEY *et al.,* 2016), these detrimental effects may remain hidden for centuries. There can be little doubt, however, that unlimited invasions would create a world with a much lower biodiversity: invasions do cause extinctions.

## ACKNOWLEDGEMENT

This is the summary of the invited plenary talk given at the Round Table on Extinctions, held in Florence, Italy, 15 November 2018. I thank the organisers Prof. Achille Casale and Prof. Emilio Balletto and the Accademia Nazionale Italiana di Entomologia for inviting me to the symposium, and Prof. John Halley (University of Ioannina, Greece) for inspiring discussions on the topic.

## REFERENCES

BELLARD C., CASSEY P., BLACKBURN T.M., 2016a – *Alien species as a driver of recent extinctions.* - Biol. Lett., 12: 20150623.

BELLARD C., GENOVESI P. JESCHKE J.M., 2016b – *Global patterns in threats to vertebrates by biological invasions*. - Proc. R. Soc. B, 283: 20152454.

CROSBY A., 1986 - *Ecological Imperialism: The Biological Expansion of Europe, 900-1900.* Cambridge University Press, Cambridge, U.K. xiv + 368 pp.

DIAMOND J.M., 1972 – *Biogeographic kinetics: estimation of relaxation times for avifaunas of southwest Pacific islands.* - PNAS, 69: 3199-3203.

HALLEY J.M., MONOKROUSOS N., MAZARIS A.D., NEWMARK W.D., VOKOU D., 2016 – *Dynamics of extinction debt across five taxonomic groups.* Nature Comm., 7: Article number: 12283

HULME P.E., ROY D.B., 2010 - *DAISIE and arthropod invasions in Europe.* - BioRisk, 4: 1-3.

LEFF B., RAMANKUTTY N., FOLEY J.A., 2004 – *Geographic distribution of major crops across the world.* - Global Biogeochem. Cycles, 18: GB1009, doi:10.1029/2003 GB002108.

LÖVEI G.L., 2016 - *Thoughts of a travelling ecologist 10. Will fighting invasives ever succeed?* - J. Biosafety, 25: 75-76.

PYSEK P., JAROSIK V., HULME P. E. *ET AL.,* 2010 – *Disentangling the role of environmental and human pressures on biological invasions across Europe*. - PNAS, 107: 12157-12162.

ROQUES, A., 2010 – *Taxonomy, time and geographic patterns*. - BioRisk, 4: 11–26.

THOMAS C.D., 2017 – *The inheritors of the Earth.* Penguin Books, London, U.K. vii+300 pp.

TILMAN D., 2011 – *Diversification, biotic interchange, and universal trade-off hypothesis.* - Am.Nat., 78: 355-371.

VILA M., BASNOU C., PYSEK P., Josefsson M., GENOVESI P., GOLLASCH S., NENTWIG, W.*, ET AL.,* 2010 – *How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment*. - Front. Ecol. Environ., 8: 135–144.

VITOUSEK P.M., D'ANTONIO C.M., LOOPE L.L., *ET AL.,* 1997 – *Introduced species: A significant component of human-caused global change.* - N. Z. J. Ecol., 21: 1-16.

WRIGHT D. H., 1987 - *Estimating Human Effects on Global Extinction.* - Int. J. Biometeorol., 331: 293-299.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 151-157*

# LE ESTINZIONI NELLE FARFALLE DIURNE

EMILIO BALLETTO[a] - FRANCESCA BARBERO[a] - SIMONA BONELLI[a] - LUCA PIETRO CASACCI[a, b]
CRISTIANA CERRATO[a, c]

[a] *Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Via Accademia Albertina 13, 10123 Torino.*
[b] *Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, ul. Wilcza 64, 00-679, Warsaw.*
[c] *Parco nazionale del Gran Paradiso, Via Pio VII, 9 10135, Torino.*
Autore corrispondente: emilio.balletto@unito.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018

*Extinctions in Butterflies*

Three butterfly species are globally extinct, and at least another 6 have been missing for many years. Species/area relationships suggest that extinctions mainly affectedthe small isolates of specialist species. Only 1 species is extinct in Italy, *Lycaena helle*. Studies in the SW Alps show that while before 1970 many extinct populations were of forest species, butterflies occurring above the treeline are nowmoreseverely affected.

KEY WORDS: insular biogeography, over- vs. under-saturation, altitudinal specialists.

## ESTINZIONI

La lista rossa della IUCN elenca 697 specie zoologiche, compresi 59 insetti, globalmente scomparsi a partire dal 1500. I lepidotteri estinti sarebbero 27, l'85% (23) dei quali abitavano gli Stati Uniti, soprattutto le Hawaii (17, 63%). Tuttavia, per quanto riguarda gli Stati Uniti in particolare, soltanto 3 di queste specie sarebbero estinte con sicurezza, secondo Nature ServeExplorer, mentre 3 delle rimanenti, tutte hawaiane, e forse anche una quarta, sarebbero state ritrovate in tempi recenti.

Questa incertezza non deve stupire poiché sono ben oltre 100, comprese una balena e un elefante (!), le specie ritrovate viventi, molti anni dopo che ne era stata ipotizzata l'estinzione (WEIDENSAUL, 2003). Nel caso delle farfalle diurne, anche di grandi dimensioni, le "*Lazarus species*" comprendono *Libythea collenettei* (Nymphalidae: Libythaeinae), delle isole Marquesas, scomparsa nel 1925 e ritrovata nel 2001; *Polyura inopinata* (Nymphalidae: Charaxinae) descritta di "N. Celebes" (N. Sulawesi) nel 1939 e riscoperta in Papua New Guinea nel 2015; e *Cyclyrius mandersi* (Lycaenidae: Polyommatinae) di Mauritius, scomparso nel 1907 e ritrovato nel 2017.

## LE FARFALLE DIURNE

Tra le farfalle diurne, in ogni caso, si annoverano almeno 3 specie sicuramente estinte. Due sono Lycaenidae sudafricane: *Deloneura immaculata* Trimen, 1868 (Poritiinae), conosciuta di 3 sole femmine della Provincia del Capo (1863), e *Lepidochrysops hypopolis* (Trimen, 1887) (Polyommatinae), noto per 2 maschi raccolti nel 1870. Un terzo licenide, citato dalla IUCN come *Glaucopsyche xerces* (Boisduval, 1852) e originario dell'area occupata da San Francisco, è oggi considerato al più una 'sottospecie' di *G. lygdamus*. Infine, *Libythea cinyras* Trimen, 1866 (Nymphalidae: Libythaeinae), originaria di Mauritius, è conosciuta del solo olotipo, catturato 'ante 1865'.

Altre 6 specie mancano all'appello da diversi anni: *Euploea desjardinsii* (Guérin-Méneville, [1844]) (Nymphalidae: Danainae dell'isola di Rodriguez), scomparsa dal 1844; *Libythea ancoata* Grose-Smith, 1891(Madagascar), mancante dal 1932; *Heteropsis anceps* (Oberthür, 1916) (Nymphalidae: Satyrinae del Madagascar), dal 1966; *Pieris wollastoni* (Butler, 1886) (Pieridae, di Madeira), dal 1977; *Graphium levassori* (Oberthür, 1890) (Papilionidae: Leptocircini, di Grande Comore), dal 1984. *Heteropsis masoura* (Hewitson, 1875) (Nymphalidae: Satyrinae del Madagascar), scomparsa solo dal 1999, è così vistosa da lasciar supporre che qualcuno l'avrebbe comunque osservata.

## IL CONTRIBUTO DELLA BIOGEOGRAFIA INSULARE

Accertare l'estinzione di una data specie è sempre molto difficile. Numerosi autori hanno quindi cercato vie alternative all'osservazione diretta (es. DAPPORTO e DENNIS, 2008; KUEFFER *et al.,* 2014; VODĂ *et al.*, 2016).

– Pubblicato marzo 2019

Com'è noto, la teoria della biogeografia insulare (MACARTHUR e WILSON, 1967) fa riferimento alla relazione: $S = C * A^Z$ ovvero $\log_{10} S = z * \log_{10} A + \log_{10} C$, dove S è il numero di specie che abitano un'isola; z rappresenta la pendenza della retta di regressione che lega la superficie di ogni isola al numero di specie che essa ospita (vale spesso circa 0.3); **C** è l'intercetta sull'asse Y (specie) ed è funzione dell'area minima necessaria affinché una specie di un dato gruppo possa essere presente (cfr. BALLETTO, 1993).

Nel caso delle isole del Mediterraneo occidentale, la regressione (Fig. 1) mostra che certe isole, particolarmente vicine al continente (es. Capri, Vivara, Ischia, Elba), sono sovrassature, mentre altre, come la Sardegna (che ha tante specie quante l'Elba), la Corsica e la Sicilia, sono sottosature (cfr. DAPPORTO e DENNIS, 2009): per trovarsi sulla retta dovrebbero ospitare circa 157 specie ognuna. Altre isole ancora, con una sola specie, sono probabilmente sotto-campionate.

Abbiamo ottenuto risultati simili anche per le isole dell'Atlantico settentrionale (Fig. 2), che ospitano in totale circa 20 specie endemiche: un numero altissimo per i Lepidotteri. Valutate complessivamente (linea nera) generano $z = 0.285$ e $C = 0.464$. La retta (arancione) calcolata separatamente per le Azzorre ha però $z = 0.1$ (molto basso) e $C = 0.65$, mentre la regressione calcolata complessivamente per i gruppi di Madeira e delle Canarie (linea e parametri in verde) mostra valori più simili alla media ($z = 0.37$; $C = 0.38$). Almeno Graciosa (Azzorre), con 3 sole specie censite, risulta sotto-satura, ma se ciò sia a causa di estinzioni o di sotto-campionamento resta anche qui difficile da stabilire.

L'arcipelago delle Azzorre è molto lontano dal continente: dista dal Portogallo da 1100 a 1900 Km secondo le isole, e il forte appiattimento della retta potrebbe derivare almeno in parte da questo. Tuttavia, ULRICH e BUSZKO (2003) hanno mostrato che si possono attendere bassi valori di pendenza nel caso in cui un'elevata frammentazione dell'habitat conduca le specie stenotope rimanenti a colonizzare le poche nicchie vacanti, mentre le specie ubiquiste tendono a monopolizzare il resto del territorio. In tal modo anche la significatività statistica della regressione tendea diminuire fortemente ($R^2$=0.322, in questo caso), e i valori di C ad aumentare.

Risultati analoghi ($z = 0.21$, $C = 1.1$, $R^2 = 0.3$) sono stati ottenuti nel caso delle isole egee (Fig. 3), le cui speciesono caratterizzate da diversità e stenotopia decrescente procedendo verso il centro del Mar Egeo (DENNIS *et al.*, 2000). Le lontane e ventosissime Cicladi (in verde) sono tutte al disotto della linea. A parte alcuneisole che distano meno di 7 Km dal continente (Spetsai, Samos, Evvia, Thassos, Levos, ecc.) e che sono sovrassature, non si osservano differenze fra quelle prossime alla costa greca (in nero) e quelle più vicine alla Turchia (in azzurro). Tre di queste ultime, Astypalaia, Kasos e Psara, sono nettamente sottosature nonostante distino dal continente rispettivamente solo 43, 50 e 22 Km, che sono distanze medie, almeno per quell'area.

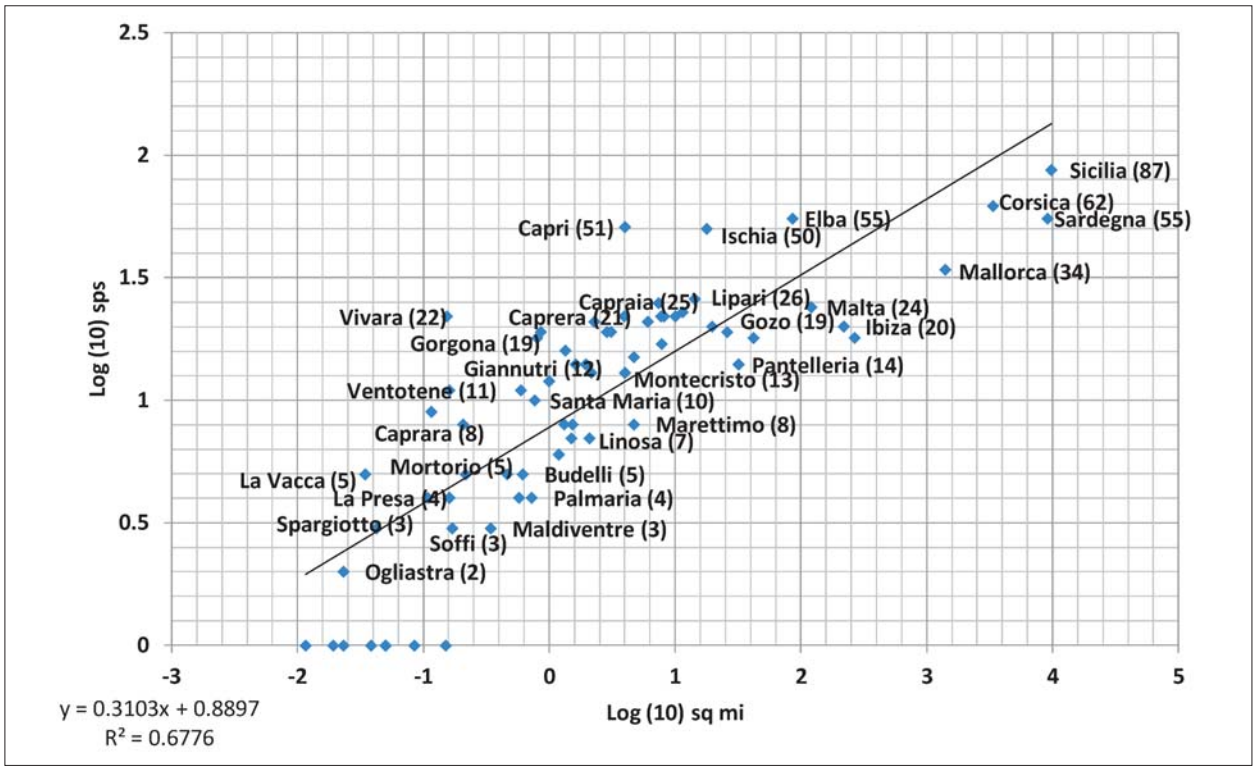



Fig. 1 – Relazione Specie-Area in 73 isole del Mediterraneo Occidentale. Per ognuna delle isole elencate (solo alcune a causa delle sovrapposizioni grafiche), il numero di specie censite è indicato in parentesi.

I risultati che abbiamo ottenuto su 24 isole ed arcipelaghi dell'Oceano Pacifico, globalmente contraddistinte da valori di pendenza piuttosto alti (0.42) e d'intercetta relativamente bassi (0.24), concordano invece meglio con la possibilità che, a causa dell'antropizzazione e delle distanze, si siano generalmente estinte soprattutto le specie a distribuzione ristretta e che le faune di queste isole siano maggiormente contraddistinte dalla presenza di specie ubiquiste (ULRICH e BUSZKO, 2003), probabilmente diffuse dall'azione dell'uomo (Fig. 4). Alcune isole (in viola) a causa della loro posizione geografica prossima ad altri arcipelaghi o ad altre

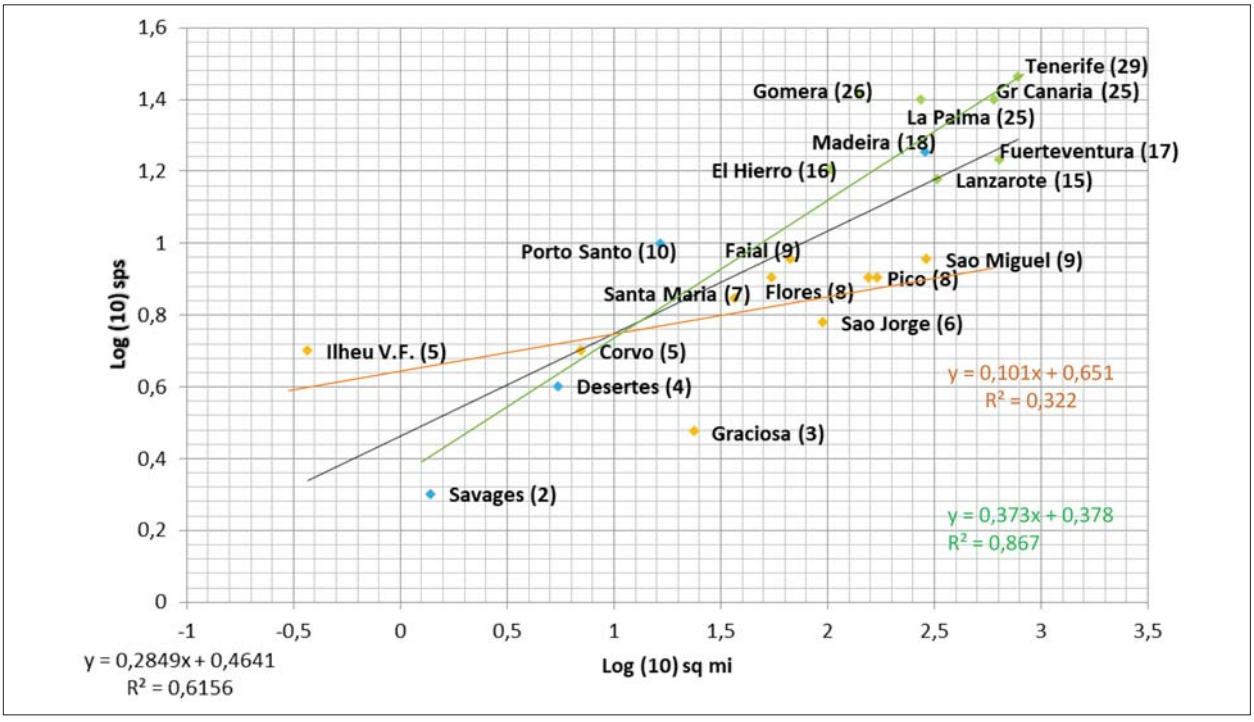



Fig. 2 – Relazione Specie-Area valutata per 21 isole del N. Atlantico (Macaronesia), facenti parte degli arcipelaghi delle Canarie (verde), di Madeira (azzurro), e delle Azzorre (arancio). Le rette di regressione e i parametri indicati in arancio e in blu sono state ottenuti rispettivamente solo in base ai dati relativi alle Azzorre, e a Madeira + Canarie. In nero sono indicati la regressione e i parametri facenti riferimento al totale delle isole.

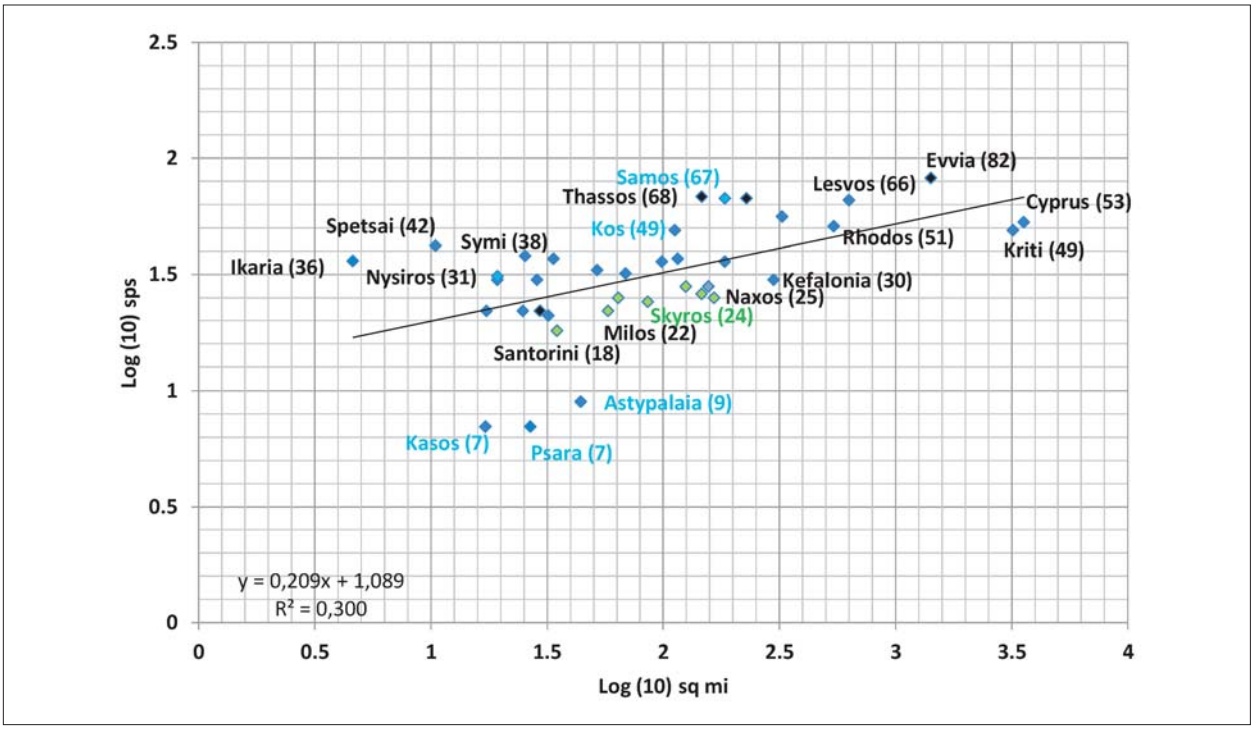



Fig. 3 – Relazioni Specie-Area in 41 isole dell'Egeo. Le Cicladi sono indicate in verde. Le isole più prossime alla costa turca sono in azzurro, le altre in nero.

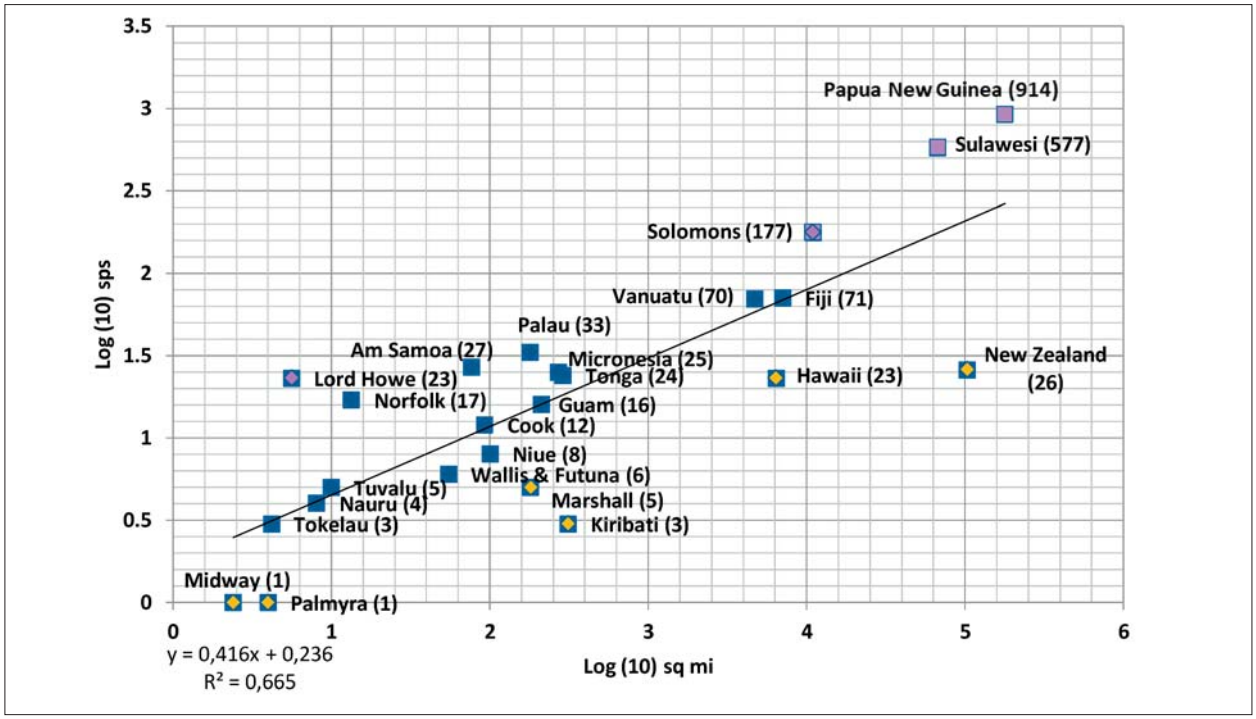



Fig. 4 – Relazioni Specie-Area in 24 isole ed arcipelaghi dell'Oceano Pacifico.

grandi isole (Nuova Guinea, Sulawesi, Salomone, Lord Howe) risultano sovrassature. Altre (in giallo), come Midway, Palmyra, Kiribati, Marshall e soprattutto la Nuova Zelanda e Hawaii, queste ultime ben note per aver subito estinzioni, sono nettamente sottosature.

## Le sovra e le sottosaturazioni

Non sempre appare ben chiaro il loro significato. Se consideriamo le isole dell'Oceano indiano meridionale (Fig. 5), dove i valori dei parametri z e C sono quelli classici, le faune delle Comore (Canale di Mozambico: in rosa) risultano leggermente sovrassature. Tuttavia, ben 30 specie di origine africana e presenti sia in Mozambico, sia in Madagascar, mancano da queste isole. Eppure, si potrebbe supporre che almeno buona parte di esse abbia raggiunto il Madagascar proprio attraverso le Comore (*stepping stones*), e non valicando tratti di mare di ancora maggiore ampiezza (Balletto *et al.*, 2015; Balletto *et al.*, in prep.), il che porterebbe ad ipotizzare che il 34% delle specie "a un certo momento" presenti alle Comore si siano estinte.

Il problema è che, da un lato, le relazioni specie/superficie sono molto sensibili al sotto-campionamento (He e Hubbell, 2011) e, dall'altro, che le isole poste fra 2 masse continentali possono rappresentare aree "di transito" (Dapporto e Dennis, 2008; Dapporto *et al.*, 2017), sia per le specie migratorie, sia per quelle più o meno involontariamente introdotte.

## Estinzioni in Europa

Come abbiamo visto, una sola farfalla diurna, *Pieris* (*brassicae*) *wollastoni* si è apparentemente estinta tra il 1977 e la metà degli anni '80. La causa della sua scomparsa potrebbe essere da imputare all'arrivo, forse spontaneo, di *Pieris rapae*, apparentemente portatrice di un ceppo di granulovirus in precedenza assente da Madeira, dov'era endemica (Gardiner, 2003).

## Estinzioni in Italia

Si tratterebbe, anche in questo caso, di una sola specie: *Lycaena helle*, la cui presenza sul nostro territorio è documentata da 2 esemplari, un ♂ e una ♀ (ex collezione Curò), conservati nel Museo 'Caffi' di Scienze Naturali di Bergamo. Entrambi sono etichettati "Bergamo, estate" (Fig. 6).

Le citazioni di questa specie rinvenibili in letteratura sono dovute a de Prunner (1798) come "in ditione Tortonesi rarissima"; a Hinterwaldner (1867), per "Brixen" (Bressanone), attribuita a Stentz; a Perlini (1912), come "giardino Curò"; a Marchi (1916), per Bleggio e Val di Cembra; e a Kitschelt (1925), per "Ritten" (Renon), attribuita a Wiedemayr (Fig. 7). La località di Longomoso (= Lengmoos), che Verity (1943: 49) attribuiva a quest'ultimo, non è indicata da Kitschelt (1925). Le altre citazioni sono ripetitive.

Purtroppo questi dati sono contrassegnati da margini

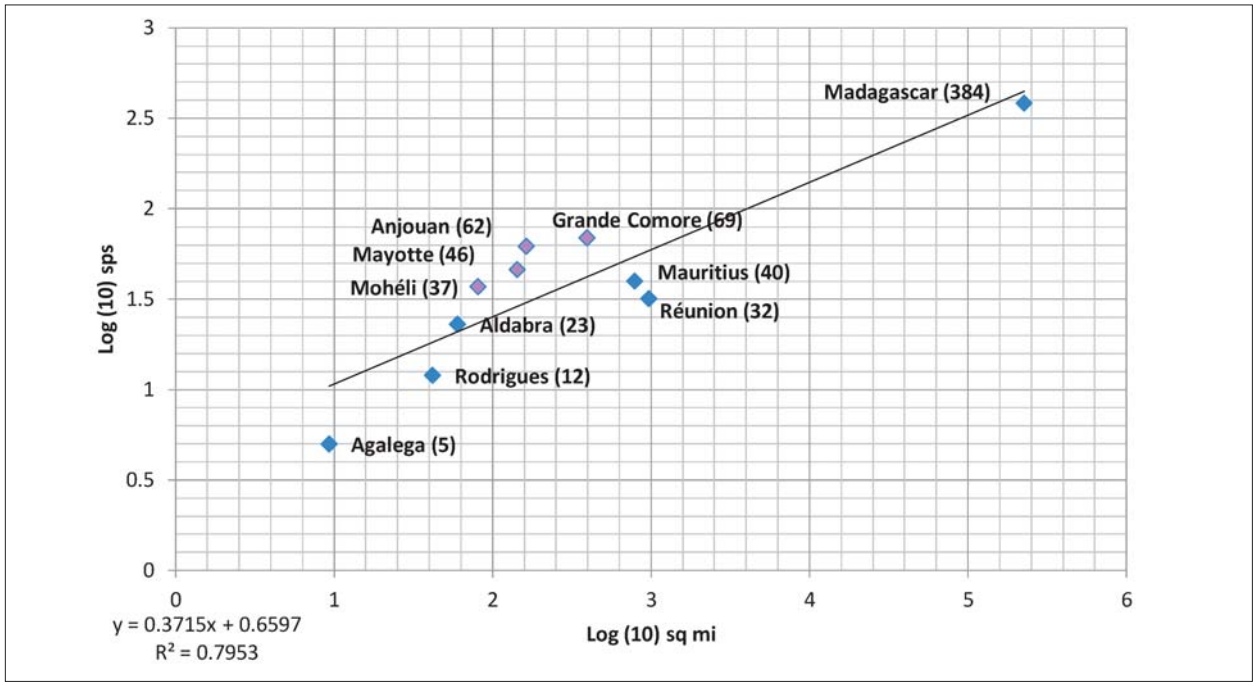



Fig. 5 – Relazioni Specie-Area in 10 isole dell'Oceano Indiano meridionale (nomi francesi). Le Comore sono rappresentate da un rombo rosa.

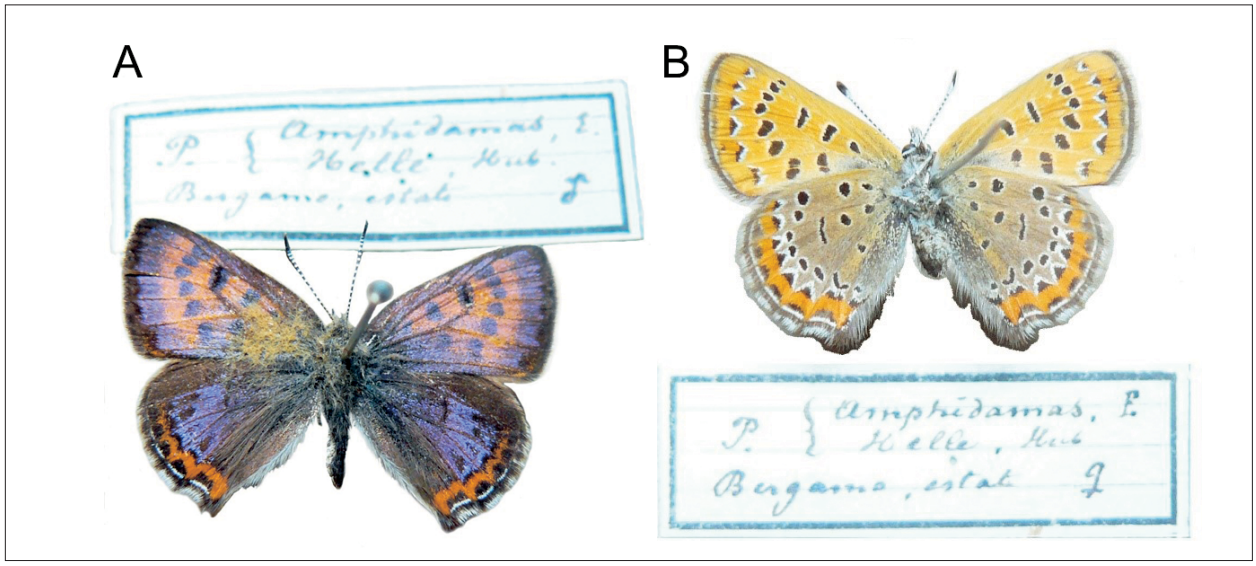



Fig. 6 – I due esemplari di *Lycaena helle* ex coll. Curò conservati nel Museo di Scienze Naturali di Bergamo e attestanti la presenza di questa specie in Italia. *Foto Rossana Pisoni*.

d'incertezza: la citazione di de Prunner potrebbe essere errata ("habitat in Rumice acetoso"*L. thersamon*?), anche perché nel Tortonese non esistono (più?) habitat idonei; quelle di Hinterwaldner e di Kitschelt, apparentemente affidabili, non sono supportate da materiali museali al "Tiroler Landesmuseen" (Innsbruck) (Peter Huemer *in litt.*), come non lo è quella di Marchi al MUSE di Trento:la collezione Marchi è apparentemente andata perduta (Valeria Lencioni *in litt.*).

Persino gli esemplari conservati al Museo di Bergamo possono far nascere dubbi. Cosa intendeva Perlini per "Giardino Curò"? Potrebbe forse trattarsi di esemplari d'allevamento?

## Estinzioni regionali e locali

Le specie estinte a livello regionale sono 20 e concentrate in N. Italia, soprattutto nel Nordest (Bonato *et al.*, 2014) (Fig. 8) (cfr. Huemer, 2004).

*A livello di popolazione e di comunità*.

In base ai nostri studi:

a) *Nell'arco di 70 anni* (1901-1970) si sono estinte in Italia almeno 727 "popolazioni" (ca. 3‰ del totale) di 142 specie (50.5%). La distruzione dell'habitat è in grado di spiegare il 65.6% delle perdite, mentre il 34.4% del totale sono dovute a "cause sconosciute", con una certa variabilità a livello

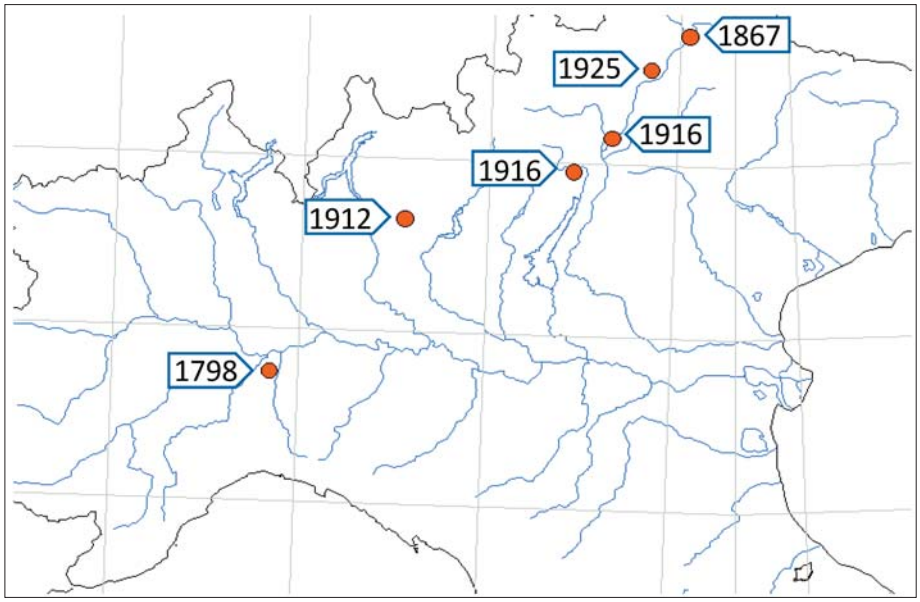



Fig. 7 – Localizzazione geografica e temporale delle località italiane per cui sono disponibili citazioni bibliografiche di *Lycaena helle*.

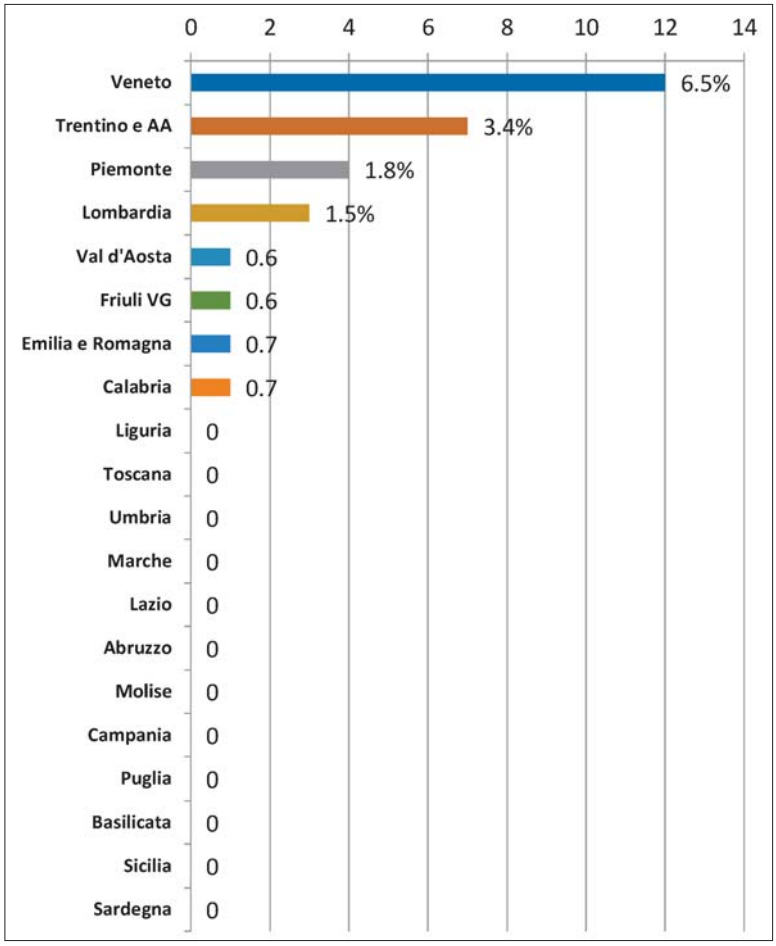



Fig. 8 – Distribuzione delle specie scomparse nelle regioni italiane. Le percentuali fanno riferimento al totale delle specie presenti in ogni regione.

geografico. Quelle scomparse per "cause ignote" appartengono a specie nemorali, altitudinalmente specializzate, igrofile, o erano localizzate al margine dell'areale della specie (BONELLI *et al.* 2011).

b) *Nell'arco di 30 anni*: *1978-2009*, nelle Alpi Marittime (PR di Valdieri), ripetendo lo studio di 7 comunità localizzate fra 1600 e 1900 m di altitudine (BALLETTO *et al.*, 1982; CERRATO, 2011).

i) abbiamo rinvenuto un totale di 69 specie (51 nel 1978 e 52 nel 2009, di cui solo 34 in comune fra gli anni).

ii) abbiamo osservato una forte diminuzione delle specie alpine e subalpine, che sono passate dal 42% (± 5.9) nel 1978 al 29% (± 3.8) nel 2009, e un parallelo aumento di quelle nemorali;

iii) le comunità di lepidotteri hanno mostrato impor-

tanti cambiamenti nella composizionein termini di diversità funzionale (Principal Coordinates Analysis: *F-value = 3.781, p = 0.017*), e una tendenza all'omogeneizzazione (Analysis of Dispersion in Community Composition, *F-value= 3.023, p= 0.146*).

c) *Nell'arco di 5 anni*: in 3 Parchi delle Alpi Occidentali (PR dell'Orsiera-Rocciavré, PN Gran Paradiso, PR Alpe Veglia-Devero) l'*occupancy* delle singole specie è globalmente aumentata nel tempo, ma in modo non uniforme (Tha, 2016; Cerrato *et al.*,in prep.):
   i) sono aumentate le specie polifaghe e oligofaghe, sono diminuite quelle monofaghe.
   ii) sono aumentate le specie altitudinalmente generaliste (6.15 ± 1.06), sono rimaste stabili quelle presenti in 2-3 orizzonti vegetazionali e sono diminuite quelle alpine (2.87 ± 1.95).

## Conclusioni

Almeno nelle farfalle diurne, ma probabilmente anche in molti altri insetti, il processo di estinzione è subdolo, e sembra procedere iniziando dai piccoli isolati "insulari" e dalle forme ecologicamente specializzate. Anche se il numero di specie note per essersi estinte è ancora esiguo, il numero di popolazioni scomparse è ormai importante e certamente sottostimato. Le modificazioni dell'ambiente in corso a livello mondiale stanno causando altrettanto profonde modificazioni della faunae, se continuerà il trend, anchele farfalle diverranno progressivamente sempre più rappresentate da entità ad ampia diffusione, spesso migratorie, ecologicamente generaliste e multivoltine.

## BIBLIOGRAFIA


Balletto E., 1996 – *Biogeografia insulare oggi: le isole del Mediterraneo*. - Biogeogr., 18 (1995): 147-183.

Balletto E., Barberis G., Toso G.G., 1982 – *Aspetti dell'ecologia dei lepidotteri ropaloceri nei consorzi erbacei delle Alpi italiane*. - Quaderni sulla "Struttura delle Zoocenosi Terrestri" CNR, Roma, 2 (II.2). Pubbl. AQ/1/193:11-95.

Balletto E., Barbero F., Casacci L., Chakira H., Dafiné A., Ouledi A., 2014 – *Les Papillons diurnes des Îles Comores*. 287 pp.,40 tav. Pensoft, Sofia.

Balletto E., Barbero F., Casacci L., Lees D., in prep. - *Les Papillons diurnes de Madagascar.*

Bonato L., Uliana M., Beretta S., 2014 - *Farfalle del Veneto. Atlante distributivo*. 392 pp. Fond. Musei civici Venezia.

Bonelli S., Cerrato C., Loglisci N., Balletto E., 2011 – *Population extinctions in the Italian diurnal lepidoptera:an analysis of possible causes*. - J Insect Consn, 15: 879-890.

Cerrato C., 2011 – *Butterflies, weather and vegetation - Local scale studies to understand future vulnerability*. 240 pp. Tesi di Dott., Univ. di Torino.

Dapporto L., Dennis R.L.H., 2008 – *Species richness, rarity and endemicity on Italian offshore islands: complementary signals from island-focused and species-focused analyses*. - J. Biogeogr., 35: 664-674.

Dapporto L., Dennis R.L.H., 2009 – *Conservation biogeography of large Mediterranean islands. Butterfly impoverishment, conservation priorities and inferences for an ecological "island paradigm"*. - Ecogr., 32: 169-179.

Dennis R.L.H., Shreeve T.G., Olivier A., Coutsis J.G., 2000 – *Contemporary geography dominates butterfly diversity gradients within the Aegean Archipelago (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea)*. - J. Biogeogr., 27: 1365-1383.

Dapporto L., Cini A., Menchetti M., Vodă R., Bonelli S., Casacci L.P., Dincă V., Scalercio S., Hinojosa J.C., Biermann H., Forbicioni L., Mazzantini U., Venturi L., Zanichelli F., Balletto E., Shreeve T.G., Dennis R.L.H., Vila E., 2017 – *Rise and fall of island butterfly diversity:Understanding genetic differentiation and extinction in a highly diverse archipelago*. - Divers., Distrib., 2017: 1-13.

de Prunner L., 1798 – *Lepidoptera Pedemontana Illustrata*. iii + 124 pp.Mathaeus Guaita, Augusta Taurinorum.

Gardiner B.O., 2003 – *The possible cause of extinction of* Pieris brassicae wollastoni *Butler* (*Lepidoptera: Pieridae*). - Ent. Gaz., 54: 267-268.

He F., Hubbell S.P., 2011 – *Species-area relationships always overestimate extinction rates from habitat loss*. - Nature, 473: 369-371.

Hinterwaldner J.M., 1867 – *Beitrag zur Lepidopterenfauna Tirols*. - Z. «Ferdinandeums», (3) 13: 211-254.

Huemer P., 2004 – *Die Tagfalter Südtirols*. 232 pp. Folio Verlag, Bozen.

IUCN, ultimo accesso:27-11-2018 - The IUCN Red List of Threatened species. https://www.iucnredlist.org/

Kitschelt R., 1922 – *Zusammenstellung der bisher in demehemaligen Gebiete von Südtirol beobachteten Grossschmetterlinge*. xvii + 421 pp. Verfassers, Wien.

Kueffer C., Drake D.R., Fernández-Palacios J.-M., 2014 – *Island biology:looking towards the future*. - Biol. Lett., 10: 20140719.

MacArthur R.H., Wilson E.O., 1967 – *The theory of island biogeography*. Monographs in popln Biol., 1. Princeton Univ. Press.

Marchi G., 1916 – *I Ropaloceri del Trentino*. 190 pp. Soc. Alp. Trident., Trento.

NatureServe Explorer, ultimo accesso 27-11-2018.- http://explorer.natureserve.org/servlet/NatureServe?init=Species

Perlini R., 1912 – *Lepidotteri della Lombardia. Parte I.* 87 pp, 2 tav. Ist. It. Arti Grafiche, Bergamo.

Tha C., 2016 – *Functional diversity along altitudinal gradients:a multi-taxa approach in the Western Alps*. Tesi di LM in Biol. Ambiente. Univ. di Torino.

Ulrich W., Buszko J., 2003 – *Species-area relationships of butterflies in Europe and species richness forecasting*. - Ecography, 26: 365-373.

Verity R., 1943 – *Le Farfalle diurne d'Italia*, *Vol. 2*, *Divisione Lycaenida*. xii+401 pp., tav. 5-19, iii-ix. Marzocco, Firenze.

Vodă R., Dapporto L., Dincă V., Shreeve T.G., Khaldi M., Barech G., Rebbas K., Sammut P., Scalercio S., Hebert P.D.N., Vila R., 2016 – *Historical and contemporary factors generate unique butterfly communities on islands*. - Sci. Repts, 6: 28828. DOI:10.1038/srep28828

Weidensaul S., 2003 – *The ghost with trembling wings - Science, wishful thinking and the search for lost species*. 352 pp. FSG/North Point Press.

158 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 159-168*

# ASPETTI GENETICI ED ECOLOGICI DEL DECLINO DI POPOLAZIONI DI FARFALLE E ALTRI INSETTI

VALERIO SBORDONI[a]

[a] *Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata;* e-mail: valerio.sbordoni@uniroma2.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018

*Genetic and ecological facets of the decline of populations in butterflies and other insects*

The theme of populations and species decline and extinction in the wild is day by day more alive and of dramatic topicality, and involves insects like all the others organisms living on our small planet. In this talk, I have tried to summarize some general aspects dealing with the extinction vortex paradigm, with some examples from captive breeding in aquaculture and wild populations of insects and other taxa taken from literature and my personal experience. Namely, I focused on a couple of study cases of Lepidopteran populations in nature: the day flying moth *Zygaena ephialtes* in the Fioio valley,within the Regional Natural Park of Monti Simbruini, and the Italian endemic butterfly *Hipparchia sbordonii* restricted to the Ponziane islands. In both these examples, the ecological determinants of population decline and the genetic signs supporting a reduction of heterozygosis are discussed. In both cases, yet at much higher extent in *H.sbordonii*, the landscape changes seem to be have affected the effective population size and the population fitness. Finally, I address to a novel approach attempting to explore the extinction/colonization dynamics of insect communities on Italian alpine islands, i.e. higher elevation areas with unique biological communities surrounded by an "ocean" of unsuitable lands. During the Holocene (the last 11,000 years), islands' boundaries experienced repeated altitudinal fluctuations due to changes in climate conditions. Consequently, islands' areas were subject to variations of different intensity and alterations in inter-island connectivity. As a function of both the original area and the elevational composition (i.e. highlands *vs*. mountain peaks), during the warmer phases some islands reduced strongly or disappeared, causing the partial or complete extinction of the local biota while the subsequent cooling allowed a new rise and expansion of these islands. Based on the analysis of a massive dataset including montane species of butterflies, orthoptera and three coleoptera families characterized by poor vs. high dispersal ability, and a millennial scaling of island size and interconnectivity, Silvio Marta et al. run two sets of generalized linear models (GLMs) considering the number of species as a function of present and past island geography. The results helped to understand to what extent the local extinctions and the subsequent immigration credit were responsible in shaping the current insect communities of Alpine and Apennine mountain islands.

KEY WORDS: Extinction vortex, *Zygaena ephialtes*, *Hipparchia sbordonii*, Climate change, Models of species dynamics in alpine islands.

## INTRODUZIONE

L'idea che l'estinzione delle specie sia in qualche modo correlata alla perdita della variazione genetica non è nuova ma, curiosamente, ha tardato non poco ad affermarsi nell'ambito della biologia della conservazione. Infatti mentre i presupposti teorici sono stati definiti da tempo, le prove empiriche a sostegno continuano ad essere carenti per le difficoltà di attuare e sostenere anche economicamente progetti di ricerca a lungo termine (FRANKHAM, 2005; HAUFFE & SBORDONI, 2009).

In generale, e soprattutto negli artropodi, non sono molti i dati sperimentali disponibili basati sul monitoraggio genetico di generazioni successive di stock allevati (SBORDONI *et al.,* 1986) (Fig. 1) o di popolazioni naturali (HERZOG & HADRYS, 2017). Un pool genico diversificato offre a una popolazione una maggiore probabilità nel breve termine di sopravvivere a un cambiamento avverso delle condizioni. Al contrario, la perdita di diversità genetica tende ad aumentare la probabilità di estinzione di una specie.

I vortici di estinzione sono una classe di modelli attraverso i quali biologi, genetisti ed ecologi della conservazione possono studiare le dinamiche e categorizzare le estinzioni nel contesto delle loro cause. Coniato per la prima volta da GILPIN & SOULÉ nel 1986, il vortice di estinzione è il termine usato per descrivere il processo che le popolazioni in declino subiscono quando si verifica un mutuo rafforzamento tra processi biotici e abiotici che spingono la popolazione verso l'estinzione (Fig. 2) GILPIN e SOULÈ identificavano 4 principali modelli di vortice di estinzione distinti in base al peso relativo di fattori come la dimensione effettiva della popolazione, la sua frammentazione indotta dall'habitat, e le conseguenze dell'inbreeding e dell'outbreeding.

La proposta teorica dei vortici di estinzione è stata

– Pubblicato marzo 2019

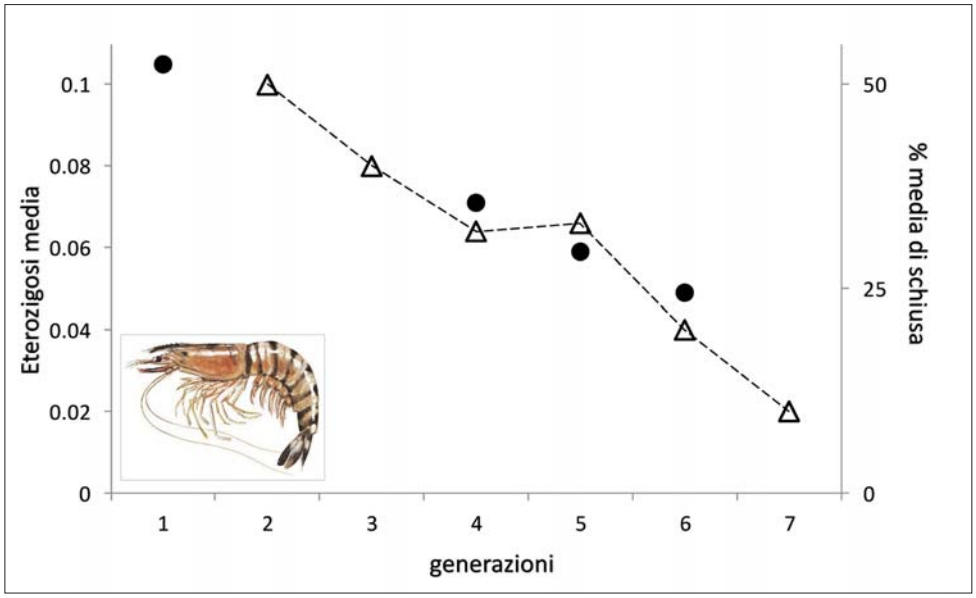



Figura 1 – Declino del tasso di eterozigosi e della fitness riproduttiva in sette generazioni da allevamento del Crostaceo Decapode *Penaeus japonicus* (da SBORDONI *et al.*, 1986).

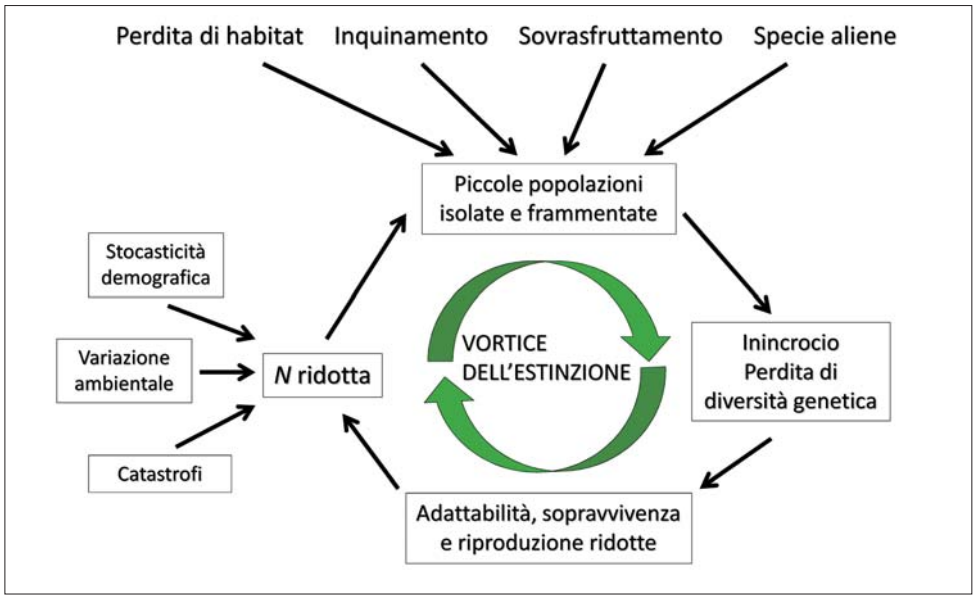



Figura 2 – Il vortice dell'estinzione (da GILPIN e SOULÉ, 1986, modificato).

semplificata da CAUGHLEY (1994) in due concetti: 'small population paradigm', dove l'effetto del declino e della estinzione fa riferimento alla stocasticità, identificata come comun denominatore, e 'declining population paradigm' che si occupa delle cause del declino e dei possibili rimedi. Il paradigma della piccola popolazione ha valenza teorica generale, ma non ha ancora contribuito in modo significativo alla conservazione delle specie in via di estinzione in natura. Il suo apporto principale è stato quello di contribuire alla definizione di buone pratiche per specie allevate. Il paradigma della popolazione in declino, d'altra parte, è rilevante nella applicazione per la maggior parte dei problemi di conservazione. Richiama la necessità di indagini per scoprire, nelle diverse situazioni, le cause 'ecologiche' del declino e prescriverne il rimedio.

FAGAN e HOLMES (2006) hanno provato ad esplorare il meccanismo del declino verso l'estinzione utilizzando dati di monitoraggio di popolazioni che si sono poi effettivamente estinte in natura. Il dataset studiato comprendeva serie temporali di almeno 12 anni di monitoraggio pre-estinzione per due specie di mammiferi, cinque specie di uccelli, due di cheloni e una di pesci. Dall'analisi di questi dati è emerso che il tempo di estinzione scala con il logaritmo della dimensione della popolazione. In altre parole, quando le popolazioni declinano, il tempo che precede l'estinzione si riduce esponenzialmente. Gli stessi autori hanno anche riscontrato tassi di declino più vicini al momento dell'estinzione rispetto alle generazioni precedenti nella storia delle popolazioni studiate, confermando la previsione che il deterioramento genetico contribuisca a una corrosione generale della fitness. Gli stessi autori hanno evidenziato un aumento della varianza nella dimensione di popolazione quando le popolazioni si avvicinavano all'estinzione, indipendentemente dai

valori di N, dimostrando indirettamente che le fluttuazioni casuali ambientali prendono il sopravvento nel determinare l'estinzione finale, indipendentemente dalle cause che avevano inizialmente determinato il declino della popolazione.

La biologia della conservazione ha fatto tesoro di questi principi cercando di mettere in pratica il concetto di 'minimum viable population' come obiettivo stabilito o desiderato per le specie oggetto di conservazione (NUNNEY & CAMPBELL, 1993).

## IL CASO DI *ZYGAENA EPHIALTES* NELLA VALLE DEL FIOIO

La forma efialtoide gialla della *Zygaena ephialtes* (Lepidoptera, Zygaenidae) è coinvolta in un complesso mimetico con specie del genere *Amata* (Erebidae, Arctiini, Ctenuchina) (Fig. 3) e per diversi anni è stata oggetto di studio da parte dei gruppi di ricerca di Luciano Bullini e del sottoscritto (BULLINI *et al.,*1969; SBORDONI e BULLINI, 1971).

Sebbene questo mimetismo fosse considerato mülleriano per la presenza di difese chimiche nelle Zigene, le stime di popolazione condotte tramite cattura, marcaggio, e ricattura (SBORDONI *et al.,* 1979) hanno condotto al concetto che il mimetismo di *Z.ephialtes* si sia evoluto secondo i canoni del mimetismo batesiano. Infatti le stime di popolazione effettuate nell'estate del 1974 nella Valle del Fioio, Lazio, nel Parco Naturale Regionale dei Monti Simbruini, hanno mostrato che le popolazioni di *Amata phegea* e *A.ragazzii* erano numericamente molto più abbondanti di *Z. ephialtes*, con un anticipo fenologico dello sfarfallamento di due -tre settimane. Nell'*Amata phegea* la popolazione totale stimata raggiungeva il suo valore massimo, circa 300.000 individui, durante i primi dieci giorni di luglio, mentre la popolazione stimata di *Z. ephialtes* non superava i 3.000 individui.

Figura 3 – *Zygaena ephialtes* (a sinistra) su fiore di Sambuco con 3 individui del co-mimo *Amata phegea*. Valle del Fioio, Camerata Nuova (RM), luglio1974 (Foto V.Sbordoni).

Venticinque anni dopo, nell'estate del 1999, abbiamo nuovamente monitorato le dimensioni della popolazione di queste specie nella Valle del Fioio, sulla base degli stessi criteri utilizzati nel precedente studio. In quell'occasione *A. phegea* raggiungeva un massimo di circa 400.000 individui stimati, più numerosi ma comparabili rispetto al 1974, considerando gli errori standard relativamente elevati di queste stime. Al contrario, la popolazione di *Z. ephialtes* mostrava una forte contrazione nel 1999, raggiungendo a malapena una stima di 200 esemplari (Fig. 4). La ragione di questo sorprendente declino non è stata accertata con sicurezza: potrebbe essere dovuta alle condizioni climatiche di una qualsiasi delle passate stagioni o, più verosimilmente, all'impatto antropico sull'habitat.

Nell'area la pianta alimentare di *Z. ephialtes* è rappresentata dalla *Coronilla varia* (Fabaceae) che nel tratto di fondo valle ove è presente la specie, cioè il biotopo oggetto delle indagini, cresce solo in una stretta fascia ecotonale esistente, su entrambi i versanti, tra il bosco e la strada bianca che costeggia il fosso Fioio (Fig. 5). Nel periodo intercorso tra i due monitoraggi la strada è stata oggetto di lavori di accomodamento che hanno verosimilmente inciso sulla comunità ecotonale, riducendo notevolmente la dimensione della popolazione della *Coronilla.* Dal momento che possiamo solo confrontare le stime fatte nel 1974 e nel 1999, non possiamo accertare quando, e quanto repentinamente si sia manifestato il calo della dimensione della popolazione.

Disponiamo tuttavia di un indizio interessante che suggerisce come il declino demografico della popolazione di *Z.ephialtes* sia stato correlato ad un collo di bottiglia occorso nel decennio successivo al primo monitoraggio. Stime del profilo genetico della popolazione ottenute dall'analisi dei polimorfismi enzimatici ci hanno permesso di confrontare la variabilità genetica della popolazione della valle del Fioio tra gli anni 1978 e 1987, e hanno rivelato un impressionante calo nei livelli di eterozigosi, pari a circa l'80% (Fig. 4), declino che si è ovviamente verificato durante quel decennio e verosimilmente causato dall'impatto antropico proprio in un'area naturale protetta, quella del Parco Naturale Regionale dei Monti Simbruini. Per varie ragioni questi dati non furono pubblicati compiutamente. La comunicazione di quella ricerca è comunque riferibile alla sua presentazione a Innsbruk, in uno dei congressi periodici dedicati alle Zigene (SBORDONI *et al.,* 2000).

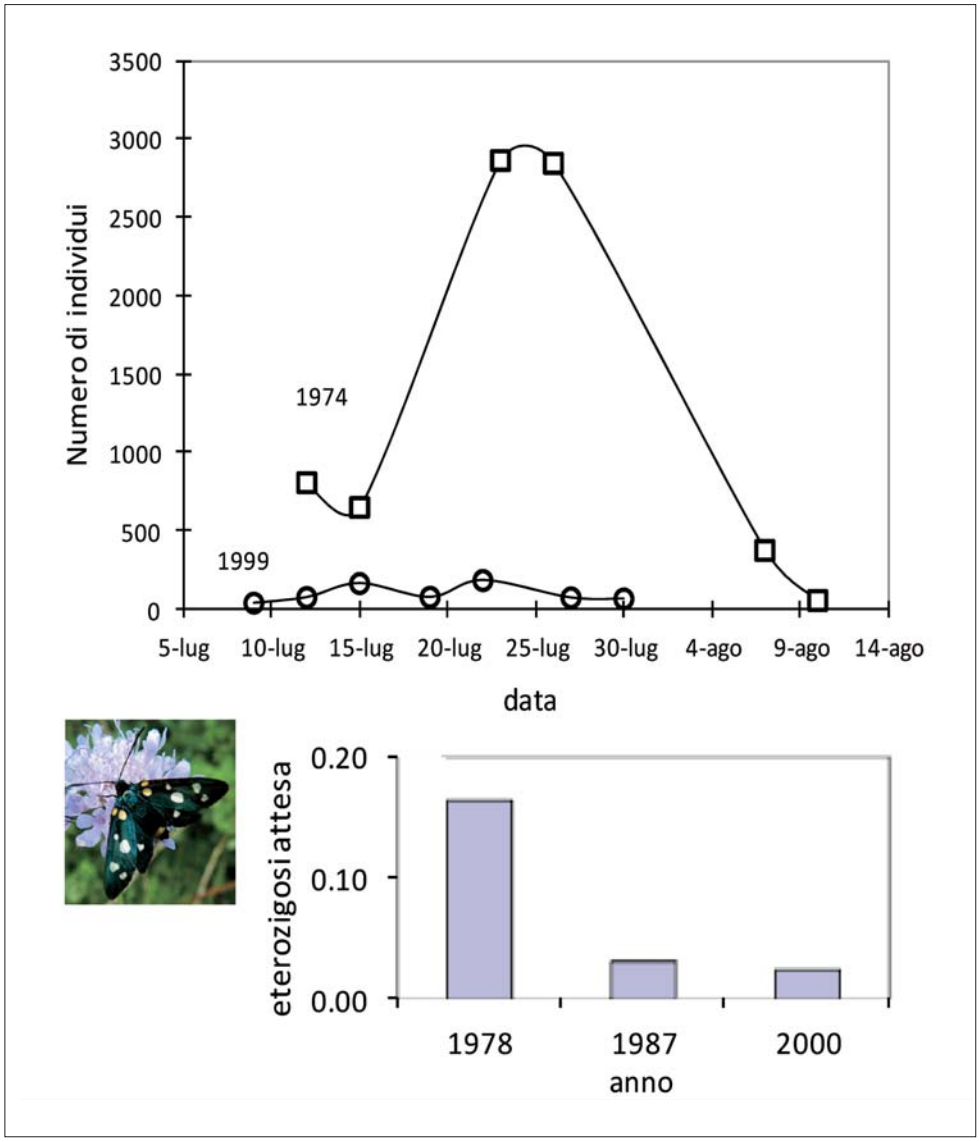



Figura 4 – Stime di popolazione di *Zygaena ephialtes* nella Valle del Fioio ottenute tramite marcaggio e ricattura in due occasioni, a distanza di 25 anni. (dati da SBORDONI *et al.*, 1979). In basso valori medi di eterozigosi attesa all'equilibrio di Hardy-Weinberg calcolati su 20 loci allozimici in campioni di *Z. ephialtes* della stessa popolazione (dati da SBORDONI *et al.*, 2000).

Figura 5 – Uno scorcio della Valle del Fioio nel luglio 1974 (Foto V. Sbordoni).

## Estinzioni insulari

È ampiamente documentato il fatto che le popolazioni insulari siano maggiormente soggette all'estinzione rispetto alle popolazioni continentali. La dimensione effettiva della popolazione relativamente piccola, la depressione da inincrocio e l'effetto Allee (in popolazioni molto piccole, i tassi di riproduzione e di crescita degli individui diminuiscono a basse densità di popolazione) sono state identificate tra le principali cause dell'accelerazione del vortice di estinzione.

Frankham (1998) in base all'analisi di un ampio dataset di popolazioni, geneticamente caratterizzate con l'utilizzo di polimorfismi enzimatici e/o loci microsatellite, ha stimato i coefficienti di consanguineità in 182 popolazioni insulari e continentali di vari taxa, soprattutto vertebrati, ma anche una decina di popolazioni di insetti (*Drosophila virilis*, *D.melanogaster* e *Tribolium castaneum*). Le popolazioni insulari hanno mostrato complessivamente alti valori di inincrocio, con coefficienti di consanguineità significativamente più alti nelle popolazioni endemiche rispetto a quelle non endemiche. I risultati suggerivano che le popolazioni insulari subiscono un aumento della consanguineità rispetto alle popolazioni della terraferma a causa dell'iniziale effetto del fondatore e delle sue ripercussioni nelle generazioni successive. La diminuzione del tasso di crescita della popolazione prevista dall'effetto Allee può essere determinata da diversi meccanismi tra cui la difficoltà nel trovare, a basse densità, partner riproduttivi.

Nel sistema sperimentale di metapopolazione studiato in Finlandia da Ilkka Hanski e collaboratori 42 popolazioni della farfalla *Melitaea cinxia* furono genotipizzate nel 1995 e nell'anno successivo fu verificato il grado di sopravvivenza delle diverse colonie insulari. Tra i diversi fattori considerati, il livello di consanguineità risultò essere il fattore predittivo più significativo del rischio di estinzione. Infatti il solo inincrocio spiegava il 26% della variazione del rischio di estinzione (Saccheri *et al.,* 1998). Anche in questa situazione fu chiamato in causa l'effetto Allee. È stato infatti osservato che la frazione delle femmine accoppiate di *Melitaea cinxia* diminuiva in relazione al decremento della densità locale, correlato a sua volta con l'aumento del tasso di emigrazione (Kuussaari *et al.,* 1998).

## Il caso di *Hipparchia sbordonii* nelle isole ponziane

*Hipparchia (Parahipparchia) sbordonii* Kudrna, 1984 (Nymphalidae, Satyrinae) è una specie endemica italiana confinata nelle isole dell'Arcipelago Pontino. Lo status sistematico di questa e delle altre specie di *Hipparchia* è stata oggetto di recente revisione (Sbordoni *et al.,* 2018).

È una farfalla di dimensioni medio-grandi caratterizzata da una bella colorazione marrone brillante sulla superficie dorsale delle ali e, come le altre specie dello stesso genere, da uno schema di disegno e colorazione estremamente criptico sulla superficie ventrale che facilmente la nasconde alla vista dei predatori quando è posata sul terreno roccioso o nella vegetazione arbustiva (Fig. 6). Il bruco si nutre di Poacee, con la specie *Brachypodium ramosus* particolarmente abbondante nel suo habitat naturale (Jutzeler *et al.,* 1997)

Anche se descritta molti anni dopo, la farfalla fu scoperta nel giugno 1966 dal team di giovani zoologi allora in forza presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Roma (C. Consiglio, R. Argano, P. Brignoli, V. Cottarelli, A. Vigna Taglianti, e il sottoscritto) nel corso delle indagini sul popolamento animale e vegetale delle piccole isole Italiane promosse dal Consiglio Nazionale delle Ricerche e coordinate dal Prof. Pasquale Pasquini.

Questa specie è oggi registrata come Endangered nella Lista Rossa della IUCN (van Sway *et al*., 2015) e nelle liste rosse italiane (Bonelli *et al.,* 2018) dove è stata valutata con la codifica EN B2ab (iii,v) sulla base della ridotta area occupata, e del suo declino osservato negli anni recenti.

Nel 1966 e negli anni immediatamente successivi la specie era largamente diffusa a Ponza su tutto il territorio dell'isola che, a quel tempo, era ancora accuratamente gestito con coltivazioni agricole su terrazzamenti e che occupavano gran parte del territorio. Infatti le località di raccolta degli esemplari nel 1966 e 1967 erano sparse in tutta l'isola dalla cima più alta, Monte Guardia, 283 m s.l.m., alla Piana dell'Incenso, un altopiano all'estremo nord dell'Isola di Ponza. Tra la fine di maggio e la prima decade di luglio le *Hipparchia* erano facilmente visibili, posate o in volo, sulle pendici collinari terrazzate e nelle poche aree incolte dominate dalla macchia mediterranea. Molti esemplari furono raccolti anche a Ponza paese, esposto a SE e presso l'altro centro abitato, Le Forna, esposto a NW. Nel periodo 1987-1990 le raccolte e occasionali osservazioni provarono la presenza nelle altre isole: Gavi, Palmarola, Ventotene, Santo Stefano e Zannone dove la osservai una sola volta. Campioni di almeno 25 individui furono raccolti per analisi genetiche a Ponza nel 1987 e 1989 e a Ventotene e Palmarola nel 1990, nei primi giorni di ottobre, e a Ponza nel luglio 1995 (Jutzeler *et al.,* 1997) documentando una presenza ancora significativa della specie. Impossibile dire da questi dati se il declino fosse iniziato fin da allora. Purtroppo c'è un intervallo significativo nelle segnalazioni disponibili che iniziano nuovamente nel 2009, quando pochi esemplari di *H. sbordonii* furono raccolti tra il 2009 e il 2013 da alcuni lepidotterologi

Figura 6 – *Hipparchia sbordonii* della popolazione di Ponza. a, b, c: maschi, d: una femmina con ali rotte da probabile attacco di *Podarcis sicula latastei* (Foto V. Sbordoni).

italiani e stranieri (L.Dapporto *in litt*.). Da allora ho potuto personalmente constatare attraverso ripetute visite a Ponza e Ventotene negli anni successivi la estrema rarefazione di *Hipparchia sbordonii* a Ponza nel giugno e luglio 2017 e nel giugno e ottobre 2018, a fronte di perlustrazioni accurate condotte in tutta l'isola. Anche nel corso delle visite fatte con Marina Cobolli a Zannone nel luglio 2014, e a Ventotene in giugno 2017 e in ottobre 2018, non fu osservato alcun individuo di *H. sbordonii*.

La presenza tardiva degli adulti, soprattutto femmine, reperibili fino a ottobre non è un fenomeno raro nelle popolazioni e specie insulari e continentali di *Hipparchia* adattate a climi semiaridi. La siccità estiva ha un effetto negativo sulla crescita delle graminacee da cui dipende l'alimentazione larvale. In un biotopo semiarido della provincia spagnola di Guadalajara Garcia Barros (1988) ha documentato l'esistenza di una maturazione gonadica ritardata nelle femmine adulte di *Hipparchia semele* che deponevano in media con un ritardo di 43 giorni dal momento della copula. Tuttavia femmine della stessa popolazione allevate in cattività erano in grado di ovideporre molto prima, suggerendo una variabilità delle date di deposizione, probabile espressione di una plasticità fenotipica riscontrata anche in *Maniola jurtina* e altri Satyrinae.

La sopravvivenza di *Hipparchia sbordonii* è intrinsecamente a rischio. Siamo di fronte ad un endemismo insulare, quasi un paradigma in biogeografia e nella biologia evoluzionistica. Piccole isole offrono poche risorse e le loro popolazioni animali sono necessariamente ridotte e soprattutto isolate, non potendo beneficiare del contributo demografico e genetico da altre popolazioni della stessa specie e la teoria ecologica dell'equilibrio insulare di Mac Arthur e Wilson ci ricorda che la probabilità di estinzione è inversamente proporzionale alla superficie insulare.

In assenza di ricerche specifiche non è semplice identificare le cause ecologiche del declino di *H. sbordonii*. I predatori non mancano: in primo luogo la numerosa popolazione di Pigliamosche (*Muscicapa*

Figura 7 – Un Pigliamosche, *Muscicapa striata,* predatore estivo assai comune a Ponza (Foto V. Sbordoni).

Figura 8 – La lucertola endemica di Ponza: *Podarcis sicula latastei* (Foto V. Sbordoni).

*striata*) (Fig. 7), un uccelletto onnipresente in estate in queste isole, e oggi non più oggetto di caccia accanita come avveniva in passato. Le popolazioni delle diverse razze insulari della lucertola *Podarcis sicula*, tutte endemiche dell'arcipelago Pontino, sono molto abbondanti e sicuramente potenziali predatori di *H. sbordonii*, come testimoniato dai segni lasciati sull'ala della farfalla. In realtà non sappiamo nulla sull'impatto effettivo della predazione su adulti e larve (Fig. 8).

Un aspetto ecologico indubbiamente rilevante è il sostanziale cambiamento del paesaggio, legato al progressivo abbandono delle pratiche agricole tradizionali, avvenuto sull'arcipelago nel corso della seconda metà del '900 e in particolare negli ultimi 30 anni. L'abbandono di queste pratiche ha rapidamente condotto alla decadenza dei terrazzamenti, un paesaggio faticosamente attrezzato e mantenuto nei secoli come presidio contro i dissesti e le frane, nonché come virtuoso sistema di risparmio idrico e irrigazione, in parte collegato con il sistema di cisterne costruite in epoca romana (Gallia, 2016). Oltre alla ritenzione idrica e all'efficace impedimento contro il dilavamento, funzione ecologicamente rilevante in un ambiente arido, i terrazzamenti agiscono egregiamente come custodi di biodiversità. Le pietre conservano il calore quando fa freddo e il fresco quando fa caldo e negli interstizi è ospitata una comunità animale e vegetale non irrilevante. Le stesse graminacee piante alimentari delle *Hipparchia* trovano nei terrazzi quelle condizioni di umidità che ne ritardano la disidratazione e il precoce rinsecchimento.

Il cambiamento del paesaggio è oggi particolarmente evidente, soprattutto nell'isola di Ponza, che per la sua morfologia acclive, è stata per millenni gestita dall'uomo con terrazzamenti che una volta diffusi capillarmente in tutta l'isola oggi sono in gran parte fatiscenti; basta confrontare le foto aeree odierne con quelle di qualche decennio addietro per cogliere la dimensione del cambiamento (Figg. 9-11). Alle coltivazioni su terrazze, un tempo oggetto di dedicata attenzione con pratiche di rotazione colturale, si sta sostituendo la macchia mediterranea di tipo garriga con formazioni prevalenti cespugliose di bassa statura più aride e meno adatte allo svolgimento del ciclo biologico della farfalla.

Dal punto di vista genetico è stato ora elaborato un progetto diretto a verificare se attraverso analisi genomiche su campioni antichi e moderni sia possibile individuare sintomi di deperimento genetico. Ad oggi possiamo contare solo su un indizio: un campione della popolazione di Ponza del 1987 fu studiato geneticamente tramite lo studio elettroforetico dei polimorfismi enzimatici (Cesaroni *et al.*, 1994). A quella data la popolazione mostrava livelli di eterozigosi comparabili con altre popolazioni e specie di *Hipparchia (Parahipparchia)*, ma comunque più bassi se confrontati con altre popolazioni insulari di specie congeneri, come *H. aristaeus* dell'isola del Giglio, *H. senthes neapolitana* di Ischia e *H. semele leighebi* delle isole Eolie (Tabella 1).

Figure 9, 10, 11 – Foto aeree della penisola di Punta nera, Le Forna, Ponza che documentano la perdita dei terrazzamenti negli anni: rispettivamente anni ’50, 2007, 2018.

*Tabella 1* – Stime di variabilità genetica in specie e popolazioni di *Hipparchia* ottenute dallo studio elettroforetico di polimorfismi enzimatici (da Cesaroni *et al.*, 1994). LIM: Sardegna Monte Limbara; GIG: Isola del Giglio; ISC: Isola d’Ischia; FIO: valle del Fioio; EOL1: Lipari Isole Eolie; PNZ: Isola di Ponza; XKR: Isola di Creta Arkadi.

| Specie | Sigla | n. medio individui per locus | n. medio alleli per locus | % loci polimorfici | eterozigosi osservata (Ho) | eterozigosi attesa (Ha) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *H.aristaeus* | LIM | 18.1 | 2 | 68 | 0.197 (0.045) | 0.212 (0.043) |
| *H.aristaeus* | GIG | 19 | 2.4 | 84 | 0.245 (0.042) | 0.264 (0.042) |
| *H.s.neapolitana* | ISC | 15.2 | 2.2 | 84 | 0.310 (0.051) | 0.296 (0.046) |
| *H.semele* | FIO | 18.8 | 2 | 60 | 0.145 (0.043) | 0.160 (0.041) |
| *H.s.leighebi* | EOL1 | 19.2 | 2.1 | 68 | 0.191 (0.043) | 0.190 (0.041) |
| ***H.sbordonii*** | PNZ | **22.5** | **1.6** | **48** | **0.127** (0.036) | **0.127** (0.036) |
| *H.cretica* | XKR | 19.2 | 2.1 | 72 | 0.176 (0.041) | 0.191 (0.045) |

## Modellizzando l'estinzione: isole montane e cambiamento climatico

Da un punto di vista ecologico il riferimento teorico al tema dell'estinzione nelle isole è quello del celebre modello di biogeografia insulare di Mac Arthur e Wilson (1967).

L'idea di considerare le cime delle montagne come isole con proprie comunità biotiche uniche e circondate da un "oceano" di terre inadatte non è nuova in biogeografia (Vuilleumier, 1970; Brown,1971). Oggi, una valutazione quantitativa degli effetti delle passate fluttuazioni climatiche sulla dimensione delle isole è critica in vista del riscaldamento climatico. Durante l'Olocene (gli ultimi 11.000 anni), i limiti delle isole montane hanno subito ripetute fluttuazioni altitudinali dovute a cambiamenti delle condizioni climatiche. Di conseguenza, le aree delle isole sono state soggette a variazioni di diversa intensità e alterazioni nella connettività tra le isole. In funzione sia dell'area originaria, sia della loro configurazione altimetrica (cioè altopiani e cime montuose), durante le fasi più calde alcune isole si sono ridotte fortemente o sono scomparse, provocando la parziale o completa estinzione del biota locale. Il successivo raffreddamento ha permesso un nuovo innalzamento ed espansione di queste isole, ma, a seconda della distanza dalla più vicina 'source' o riserva stabile di biodiversità e delle capacità di dispersione della specie, l'insuccesso nella capacità di ricolonizzazione di alcune specie ha determinato un credito all'immigrazione.

In un recente studio Marta *et al.* (2019) hanno indagato gli effetti combinati dei fattori paesaggistici e storici nella formazione delle comunità attuali delle 'isole montane' alpino-appenniniche. L'obiettivo era quello di identificare l'effetto di eventi forzanti multipli, temporalmente vicini (cioè, frammentazioni / omogeneizzazioni di habitat indotti dal clima) nel modellare i pattern di biodiversità nelle aree alpine.

L'area di studio comprende le catene montuose della penisola italiana e dell'Italia settentrionale (ovvero, rispettivamente, l'Appennino e le Alpi, per una estensione di circa 12.000 km$^2$. Le dinamiche delle isole alpine sono state ricostruite, su scala millenaria, per gli ultimi 11.000 anni nell'intera area di studio utilizzando un modello discreto di evoluzione delle isole montane, basato sui cambiamenti di quota del limite della vegetazione arborea (Marta *et al.,* 2013). L'analisi è stata limitata all'Olocene perché l'evento di frammentazione più recente e cospicuo è avvenuto poco dopo il Younger Dryas (11.7 kyr BP). Il dataset analizzato comprende un totale di 1.077 specie della checklist e distribuzione della fauna italiana - Ckmap 5.3.8 (Stoch, 2000). per un totale di 128.093 record georiferiti di Coleotteri Carabidi, Crisomelidi, Elateridi, Ortotteri e Lepidotteri Ropaloceri. Una classificazione basata sui loro tratti funzionali ha permesso di identificare, all'interno di ogni taxon, gruppi di insetti ad elevata o bassa vagilità e capacità dispersiva. Un modello dinamico discreto di evoluzione degli ecosistemi ha fornito il contesto spazio-temporale in cui sottoporre a test due dinamiche alternative: equilibrio transitorio vs. non-equilibrio. Nell' equilibrio transitorio si ipotizza che le specie siano in grado di rispondere all'evoluzione delle isole grazie a eventi di dispersione e colonizzazione di successo, mentre nelle dinamiche di non-equilibrio l'inefficacia dei processi di migrazione e colonizzazione limiterebbe l'attuale ricchezza della specie a quella generata dalla massima contrazione subita dall'isola montana nel corso delle sue variazioni spazio-temporali.

Risultati: I buoni 'dispersori' selezionati nell'ambito dei Crisomelidi e Ropaloceri, hanno risposto ai cambiamenti ambientali stabilendo una serie di equilibri transitori. Al contrario, in linea con le attese, la dinamica del non equilibrio ha descritto meglio i pattern di ricchezza delle specie a bassa capacità dispersiva selezionati nei Carabidi e Ortotteri, indicando che per questa componente le isole montane oggi mostrano un credito di colonizzazione. L'approccio proposto pone le basi per lo sviluppo di modelli spazialmente e temporalmente espliciti di evoluzione dell'isola e si è rivelato un prezioso strumento per quantificare la sensibilità dei singoli taxa ai cambiamenti climatici guidati dal clima. Ciò, a sua volta, consentirà di compiere un ulteriore passo avanti verso la previsione delle future risposte ai cambiamenti climatici e l'istituzione di strategie di conservazione che contrastino meglio gli effetti dannosi del riscaldamento globale sulla diversità biologica.

## Ringraziamenti

A conclusione di questa breve panoramica su principi teorici e casi di studio di estinzioni desidero ringraziare i promotori di questo stimolante Simposio presso l'Accademia con la convinzione, purtroppo, che il tema del declino e dell'estinzione di popolazioni e specie diventerà sempre più attuale e pressante nel prossimo futuro e richiederà particolare attenzione e impegno di ricerca e conservazione anche in ambito entomologico. Ringrazio inoltre Marina Cobolli per la lettura critica del testo e Dino Della Bruna per l'aiuto in una ricerca bibliografica. Sono grato a Donatella Cesaroni, con la quale ho condiviso alcune delle ricerche citate, per la revisione del testo, e per il suo insostituibile contributo nella rielaborazione delle figure. Ringrazio infine Silvio Marta che con capacità e intelligenza è riuscito a sviluppare il modello dinamico di evoluzione del popolamento delle isole montane di cui ho riassunto i contenuti.

## BIBLIOGRAFIA


Bonelli S., Casacci L.P., Barbero F., Cerrato C., Dapporto L., Sbordoni V., Scalercio S., Zilli A., Battistoni A., Teofili C., Rondinini C., 2018 – *The first red list of Italian butterflies.* - Insect Conservation and Diversity, 11: 506-521.

Brown J.H., 1971 – *Mammals on mountaintops: nonequilibrium insular biogeography.* - The American Naturalist, 105(945): 467-478.

Bullini L., Sbordoni V., Ragazzini P., 1969 – *Mimetismo mulleriano in popolazioni italiane di* Zygaena ephialtes *(L.) (Lep. Zygaenid.).* - Archivio Zoologico Italiano, 54: 181-214

Caughley G., 1994 – *Directions in conservation biology.* - Journal of animal ecology, 63: 215-244.

Cesaroni D., Lucarelli M., Allori P., Russo F., Sbordoni V., 1994 – *Patterns of evolution and multidimensional systematics in graylings (Lepidoptera:* Hipparchia*).* - Biological Journal of the Linnean Society, 52(2): 101-119.

Fagan W.F., Holmes E.E., 2006 – *Quantifying the extinction vortex.* - Ecology letters, 9(1): 51-60.

Frankham R., 1998 – *Inbreeding and extinction: island populations.* - Conservation biology, 12(3): 665-675.

Frankham R., 2005 – *Genetics and extinction.* - Biological conservation, 126(2): 131-140.

Gallia A., 2016 – *Organizzazione dello spazio insulare: processi di territorializzazione, sedimentazione e persistenza dei saperi idrici nell'isola di Ponza dall'età romana a oggi*. - Bollettino della Società Geografica Italiana, Serie XIII, 9, 269-280.

García-Barros E., 1988 – *Delayed ovarian maturation in the butterfly* Hipparchia semele *as a possible response to summer drought*. - Ecological Entomology, 13(4): 391-398.

Gilpin M.E., Soulé M.E., 1986 – *Minimum viable populations: processes of extinction*. In: Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity (ed. Soulé, M.E.). Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 19-34.

Hauffe H.C., Sbordoni V., 2009 – *Introduction,* pp.1-21. In: Bertorelle G., Bruford M.W., Hauffe, H.C., Rizzoli A., Vernesi C. (Eds.), Population genetics for animal conservation. Cambridge University Press.

Herzog R., Hadrys H., 2017 – *Long-term genetic monitoring of a riverine dragonfly,* Orthetrum coerulescens *(Odonata: Libellulidae]: Direct anthropogenic impact versus climate change effects.* - PLoS ONE, 12(5): e0178014.

Jutzeler D., Biermann H., Hesselbarth G., Russo L., Sala G., Bros de E., 1997 – *Etudes sur la biologie, la morphologie et l'ethologie de* Hipparchia sbordonii *Kudrna, 1984 de l'Isola di Ponza (Latium, Italie) et* Hipparchia neapolitana *(Stauder, 1921) du Monte Faito (Campanie, Italie) et complements sur la biologie de* Hipparchia leighebi *(Kudrna, 1976).* - Linneana Belgica, 16:105-132.

Kuussaari M., Saccheri I., Camara M., Hanski I., 1998 – *Allee effect and population dynamics in the* Glanville fritillary *butterfly.* - Oikos, 82: 384-392.

MacArthur R.H., Wilson E.0., 1967 – *The theory of island biogeography*. - Monographs in population biology, 1.

Marta S., Mattoccia M., Sbordoni V., 2013 – *Modelling landscape dynamics in a glacial refugium–or the spatial and temporal fluctuations of tree line altitudes*. - Journal of Biogeography, 40(9): 1767-1779.

Marta S., Lacasella F., Cesaroni D., Sbordoni V., 2019 – *Effects of Holocene climate changes on alpine ecosystems: nonequilibrium dynamics drive insect species richness on alpine islands*. - (submitted to Journal of Biogeography)

Nunney L., Campbell K.A., 1993 – *Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics.* - Trends in Ecology & Evolution, 8 (7): 234-239.

Saccheri I., Kuussaari M., Kankare M., Vikman P., Fortelius W., Hanski I., 1998 – *Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation*. – Nature, 392: 491-494.

Sbordoni V., Bullini L., 1971 – *Further observations on Mimicry in* Zygaena ephialtes *(Lep. Zygaenidae).* - Fragm. Entomol., 8: 49-56.

Sbordoni V., Bullini L., Scarpelli G., Forestiero S., Rampini M., 1979 – *Mimicry in the burnet moth* Zygaena ephialtes: *population studies and evidence of a Batesian-Müllerian situation*. - Ecological Entomology, 4 (1): 83-93.

Sbordoni V., De Matthaeis E., Sbordoni M.C., La Rosa G., Mattoccia M., 1986 – *Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of* Penaeus japonicus *(Crustacea Decapoda)*. - Aquaculture, 57 (1-4): 239-251.

Sbordoni V., Carosi E., Ercolino C., Tassini A., Vicario S., 2000 – *Conservation biology of* Zygaena ephialtes *(Linnaeus, 1767): monitoring population size and genetic structure in the Fioio Valley, Italy (Lepidoptera:Zygaenidae, Zygaeninae)*. - Abstr. VII Int. Symp. Zygaenidae, Innsbruck, 4-8 September 2000.

Sbordoni V., Allegrucci G., Cesaroni D., 2005 – *Insetti cavernicoli e farfalle: casi di studio sulla filogenesi molecolare e la microevoluzione*. - Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia. Rendiconti, anno LII (2004): 133-150.

Sbordoni V., Cesaroni D., Coutsis J., Bozano G., 2018 – *Guide to the Butterflies of the Palearctic Region. Satyrinae part V. (Tribe Satyrini. Genera* Satyrus, Minois, Hipparchia*).* Omnes Artes sas di M. Scala Minardi & C.

Stoch F., 2000 – *CKmap 5.3.8.* Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Direzione Protezione della Natura.

van Swaay C., Wynhoff I., Wiemers M., *et al*., 2015 – Hipparchia sbordonii. The IUCN Red List of Threatened Species 2015:e.T173231A64640021.

Vuilleumier F., 1970 - *Insular biogeography in continental regions. I. The northern Andes of South America.* - The American Naturalist, 104 (938): 373-388.

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 169-175*

# INSETTI, CAMBIAMENTI CLIMATICI ED ESTINZIONI: IL CONTRIBUTO DELLA MODELLISTICA NELLA PREVISIONE DI SCENARI FUTURI

MAURIZIO BIONDI [a]

[a] *Dipartimento di Medicina clinica, Salute pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente, Sezione di Scienze Ambientali, Università degli Studi dell'Aquila, Via Vetoio snc, 67100 L'Aquila, Italy*; e-mail: maurizio.biondi@univaq.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018.

*Insects, global climate change and extinctions: the contribution of the Species Distribution Modeling in the prevision of future scenarios*

In this presentation, the possible usefulness of "species distribution models" (SDMs) using "Maximum Entropy Modeling" (MaxEnt) software to investigate the effects of climate change, under both current and projected conditions, is discussed. The distribution of 10 endemic Italian insect species (Coleoptera and Orthoptera) associated with high altitude areas in the Central Apennines were analyzed. Twenty-two environmental variables are used as potential predictors of species habitat suitability. Climatic conditions exert strong control over the geographic distribution of species and MaxEnt highlights that the most influential factors mainly are fluctuation in temperature and variation in weather events typically associated with high altitude environments. Although the most optimistic future scenario (RCP2.6) is used, the results obtained show a serious decline in suitable habitat for vulnerable and sensitive species: in particular, the suitable habitats will be heavily reduced of some species (e.g. *Italohippus monticola*, *Italopodisma fiscellana*, and *Luperus fiorii*), whereas a total loss (100%) of suitable habitat will be experienced, among the species analyzed, by *Trechus hummleri*. In addition, some species show a slight "virtual" gain and a "southeastern shift" of their suitable habitat. Species distribution models can be extremely helpful to identify and analyze the cause of the fragmentation and contraction distribution. From the conservation point of view, the endemic taxa generally represent very vulnerable elements, so correct and farsighted actions are indispensable for the protection of particularly sensitive habitats harbouring them, such as Central Apennines that represent one of the most important hotspots of biodiversity for high altitude species, especially for insects, in Europe. Finally, some general considerations about other future scenarios predicted by SDMs for some endemic leaf beetle species with alpine, apennine or insular distributions in Italy, were made.

KEY WORDS: species distribution modeling, global warming, maximum entropy, MaxEnt, Central Apennines.

L'impianto concettuale della modellistica previsionale in ecologia è basato principalmente sui fattori regolativi nella distribuzione delle specie. Infatti, ogni specie mostra un intervallo più o meno ampio di valori ottimali nei quali gli individui esprimono la massima capacità di sopravvivenza e di riproduzione. Tale intervallo digrada, nei valori più bassi e in quelli più elevati, in zone di stress fisiologico dove le popolazioni a livello locale mostrano segni di sofferenza con una diminuzione nella frequenza degli individui, prima di entrare in una zona altamente critica il cui mancato adattamento potrebbe portare a possibili fenomeni di estinzione locale, oppure globale se dovessero essere interessate specie a distribuzione molto limitata.

I fattori ambientali più utilizzati nel prevedere eventuali scenari futuri, nel medio e lungo termine, sono senza dubbio quelli climatici. Gli insetti, gruppo oggetto di questo contributo, mostrano, come risposta alle variazioni climatiche, diversi comportamenti, come ad esempio (MENÉNDEZ, 2007):

– modificazioni nella fenologia, con variazioni stagionali, multi-voltinismo, variazioni temporali del periodo di volo;
– modificazioni nelle interazioni interspecifiche, con cambiamenti nei rapporti di competizione o nelle relazioni insetto-pianta o ospite-parassita;
– cambiamenti nella distribuzione, con estensioni, spostamenti o contrazioni dell'areale, o possibili fenomeni di estinzione.

Partendo dai concetti di "nicchia fondamentale", ovvero lo spettro totale teorico dei fattori ambientali che possono essere potenzialmente utilizzati da un dato organismo, e di "nicchia realizzata", ovvero il sottoinsieme reale della nicchia fondamentale effettivamente utilizzato da un dato organismo, limitato da fattori storici (es.: limitazioni nella dispersione), fattori biotici (es.: competizione o predazione) e fattori ambientali (es.: condizioni climatiche), il modello stima la distribuzione potenziale e l'*habitat suitability* di una data specie in una data area geografica, generalmente attraverso una correlazione tra i dati di presenza e un set di variabili ambientali.

La procedura di analisi utilizzata, che va sotto il nome di *Species distribution modeling* (SDM), risponde alla seguente semplice domanda: "Qual'è la probabilità di trovare una data specie in una deter-

– Pubblicato marzo 2019

minata area?". Questo approccio metodologico trova applicazione in molti ambiti, quali quelli:
– della gestione delle aree protette e conservazione ambientale, come strumento per l'individuazione delle aree idonee alla salvaguardia e tutela di specie minacciate, per la valutazione di possibili minacce in contesti ecologicamente sensibili e/o per la progettazione di aree protette;
– della valutazione del rischio di espansione di potenziali specie invasive, basata sulla stima delle percentuali di compatibilità ambientale nelle aree di nuova introduzione;
– delle indicazioni utili per la progettazione di interventi di ripristino ambientale;
– della previsione degli effetti futuri sulla distribuzione di una data specie al cambiamento climatico.

I metodi di SDM presentano, per la loro applicazione, una prima importante dicotomia riferita alle due tipologie del dataset iniziale: la prima riguarda i dati di "presenza/assenza", la seconda quelli di "sola presenza". Va chiarito che in questo contesto, l'assenza non è genericamente riferibile ad una "non presenza" ma piuttosto deve essere circonstanziata, individuando i fattori limitanti che la determinano per una data specie in una data area. Quindi, i dataset più frequentemente utilizzate sono quelli che richiedono le sole presenze, rappresentate da informazioni che posso derivare da database online come da collezioni museali.

Le due tipologie di dati si differenziano inoltre per gli strumenti di analisi utilizzati, rappresentati dalla *logistic regression*, *generalized addittive models* e *multivariate adaptive regression splines*, per i dati di presenza/assenza; mentre per quelli di sola presenza, vengono generalmente utilizzate la *maximum entropy* e la *maximum likelihood*.

Riassumendo, quindi, sono quattro le fasi necessarie per lo sviluppo di un modello previsionale attraverso SDM:
1. individuazione del dataset di presenza con risoluzione GPS (Global Positioning System);
2. individuazione di un set di variabili ambientali;
3. calcolo della nicchia ecologica attuale;
4. previsione della nicchia ecologica futura, sulla base di parametri selezionati e settati dall'operatore.

Nel presente contributo vengono principalmente discussi i risultati ottenuti da un'analisi condotta con un approccio di "massima entropia" su dati di sola presenza, prendendo come soggetto un set di specie endemiche di Insetti dell'Appennino centrale.

## Variabili Ambientali

Le variabili ambientali utilizzate in questo tipo di analisi sono generalmente le variabili climatiche che sono disponibili dal sito della WorldClim (www.worldclim.org). Nella versione 1.4, è possibile ottenere anche le variabili bioclimatiche per proiezioni future (2050 e 2070) o per ricostruzioni al passato (Medio Olocene, Ultimo Massimo Glaciale, Ultimo Interglaciale), mentre nella più recente versione 2.0, è possibile per ora la costruzione dei modelli solo se riferiti alla situazione attuale.

Le variabili bioclimatiche, di seguito elencate, disponibili da WordClim sono 19, con BIO1-BIO11 termometriche e BIO12-BIO19 pluviometriche (Hijmans *et al.*, 2005):
– [BIO1] temperatura annuale media
– [BIO2] media del range della temperatura mensile
– [BIO3] isotermalità
– [BIO4] temperatura stagionale
– [BIO5] temperatura massima del mese più caldo
– [BIO6] temperatura minima del mese più freddo
– [BIO7] range di temperatura annuale
– [BIO8] temperatura media del trimestre più umido
– [BIO9] temperatura media del trimestre più secco
– [BIO10] temperatura media del trimestre più caldo
– [BIO11] temperatura media del trimestre più freddo
– [BIO12] precipitazione annuale
– [BIO13] precipitazione del mese più umido
– [BIO14] precipitazione del mese più secco
– [BIO15] precipitazione stagionale
– [BIO16] precipitazione del trimestre più umido
– [BIO17] precipitazione del trimestre più secco
– [BIO18] precipitazione del trimestre più caldo
– [BIO19] precipitazione del trimestre più freddo

La variabile topografica relativa all'altitudine (ALT), sempre ottenibile dal sito della WordClim, permette anche di generare le altre due variabili topografiche di esposizione (ASPECT) e di pendenza (SLOPE), attraverso l'utilizzo di un software GIS (Geographic Information System), come ad esempio ArcGis o Qgis. Le variabili sono disponibili con diverse risoluzioni, delle quali la più definita è quella a 30 arc-second (~1 km).

Nei modelli che prevedono analisi previsionali basate sulle future variazioni climatiche, è necessario stabilire alcuni parametri di riferimento che riguardano: l'anno, 2050 e/o 2070 con le variabili WorldClim, e la cosiddetta soglia RCP (Representative Concentration Pathways), riferita alla concentrazione dei gas-serra. Le soglie RCP sono state stabilite nel recente Fifth Assessment Report dell'Organizzazione delle Nazioni Unite di Parigi (2014), dall'Intergovernmental Panel sui Cambiamenti Climatici (IPCC), che ha individuato le seguenti 4 soglie:
– RCP2.6, che prevede un picco intorno al 2020 e quindi un graduale decremento delle concentrazioni;
– RCP4.5, che prevede un aumento delle concentrazioni fino a circa il 2040, quindi un decremento seguito poi da stabilizzazione;

– RCP6, che prevede un aumento delle concentrazioni fino a circa il 2080, quindi un decremento seguito poi da stabilizzazione;
– RCP8.5 (*no action*), che prevede un aumento continuo delle concentrazioni.

## Il Software Maxent

Il software più frequentemente utilizzato per la costruzione di modelli basati sul principio di massima entropia è il MaxEnt, un software *open-source* prodotto dal Biodiversity and Conservation Centre dell'American Museum of Natural History di New York (Phillips *et al.*, 2006).

MaxEnt utilizza algoritmi di *machine learning* per il calcolo dell'*habitat suitability* potenziale di una data specie in una data area. A seguito di un'analisi iterativa, il programma restituisce una distribuzione potenziale a diversi livelli percentuali di compatibilità ambientale, a seguito di un processo di correlazione tra i punti di presenza e le variabili climatiche utilizzate come covariate (Elith *et al.*, 2011).

MaxEnt, infatti, utilizza un approccio multivariato per stimare l'area di compatibilità per la presenza di una specie attraverso la distribuzione probabilistica dell'entropia massima, la quale è soggetta ai vincoli rappresentati dalle informazioni fornite inerenti alla distribuzione della specie (Phillips *et al*., 2006).

MaxEnt offre alcuni strumenti utili all'interpretazione dei risultati e alla stima della loro significatività. A questo riguardo restituisce una serie di informazioni sulle variabili più contributive alla costruzione del modello e sul supporto dei dati di presenza utilizzati. Una parte dei dati inizialmente inseriti (generalmente il 20%), viene utilizzata come *testing data*, mentre la restante come *training data*. Sul loro confronto vengono restituiti un grafico dell'*Area under curve* (AUC) del *Receiver Operating Curve* (ROC), utile per stabilire la significatività dei risultati forniti nella previsione degli habitat potenziali alla presenza della specie, e un grafico con le soglie cumulative dei tassi di omissione (predetto, da *testing data*, da *training data*), per valutare la rappresentatività statistica dei dati inseriti (Urbani *et al.*, 2015).

Un'ulteriore importante fonte di informazione è anche rappresentata dalle *response curves*, che riportano per ciascuna specie l'andamento di ciascuna variabile, permettendo così di individuare i valori e gli intervalli ottimali alla presenza della specie, come anche le condizioni di incompatibilità ambientale attraverso i valori di *zero suitability*.

## Un caso di studio

Come esempio applicativo, di seguito sono riportati i risultati ottenuti con MaxEnt nell'analisi di 10 specie di insetti (3 Ortotteri e 7 Coleotteri), endemiche dell'Appennino centrale e con una distribuzione altimetrica superiore ai 1400 m s.l.m. (Urbani *et al.*, 2017): ordine Orthoptera: 3 Acrididae [*Italohippus monticola* (Ebner) (IUCN, 2016: Endangered), *Italopodisma costae* (Targioni-Tozzetti) (IUCN, 2016: Least Concern), e *Italopodisma fiscellana* (La Greca) (IUCN, 2016: Endangered)]; ordine Coleoptera: 4 Chrysomelidae [*Longitarsus springeri* Leonardi, *Luperus fiorii* Weise, *Oreina sibylla* (Binaghi), *Psylliodes biondii* Leonardi], 2 Carabidae [*Trechus hummleri* Jeannel, *Trechus cerrutii* Focarile], 1 Curculionidae [*Otiorhynchus sirentensis* s.str. D'Amore-Fracassi]. A differenza degli Ortotteri, nessuna delle specie di Coleotteri analizzate è inclusa nella lista rossa IUCN o in analoghe liste nazionali.

Ventidue variabili (19 bioclimatiche e 3 topografiche) sono state considerate per parametrizzare i modelli attuali di distribuzione. Le variabili bioclimatiche devono preventivamente essere "ritagliate" spazialmente con riferimento all'area di studio, attraverso l'utilizzo di uno specifico strumento in ambiente GIS. Nell'esempio qui presentato, tutte le variabili ambientali sono state riportate con una risoluzione spaziale di 30 arc-second (~ 1 km).

I parametri settati in MaxEnt per la costruzione dei modelli attuali e previsionali sono i seguenti: *convergence threshold* (0.00001), *replicates* (5), *replicate run type* (cross-validate), *regularization multiplier* (1), *maximum number of iterations* (500), *random test percentage* (25); altri parametri sono stati mantenuti con i loro valori di default. La *background area* di riferimento è stata creata utilizzando 10,000 punti randomizzati, generati automaticamente da MaxEnt (Urbani *et al.*, 2017).

Per le proiezioni future al 2050 sono state utilizzate le variabili bioclimatiche, disponibili sempre sul sito WorldClim, riferite al modello CNRM-CM5. Tali variabili previsionali sono state generate dal Centre National de Recherches Météorologiques (Francia), considerando i quattro scenari stabiliti sulla base dei diversi valori di Representative Concentration Pathways (RCP): RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0 e RCP8.5, dove i numeri sono riferiti alla forza radiante, calcolata in watt per metro-quadro ($W/m^2$). Nell'esempio qui riportato è stato scelto il valore di RCP2.6, in quanto questo scenario rappresenta il percorso più conservativo ed ambizioso per il contenimento dell'emissioni dei gas-serra, anche se il trend attuale sembra ormai averlo largamente disatteso.

Sinteticamente, i risultati ottenuti da questi modelli forniscono informazioni utili per ciò che riguarda le variabili maggiormente informative nella distribuzione attuale delle specie considerate (Tab. 1). Si può infatti osservare come per 9 delle 10 specie considerate, un ruolo importante viene

Tabella 1 – Le prime tre variabili contributive ottenute da Maxent per le 10 specie analizzate, per le quali sono riportati i seguenti valori: unità di misura; percentuale di contribuzione; intervallo ottimale di compatibilità ambientale; percentuale media della probabilità di presenza della specie; valori limite di compatibilità con la presenza della specie (modificato da URBANI *et al.*, 2017).

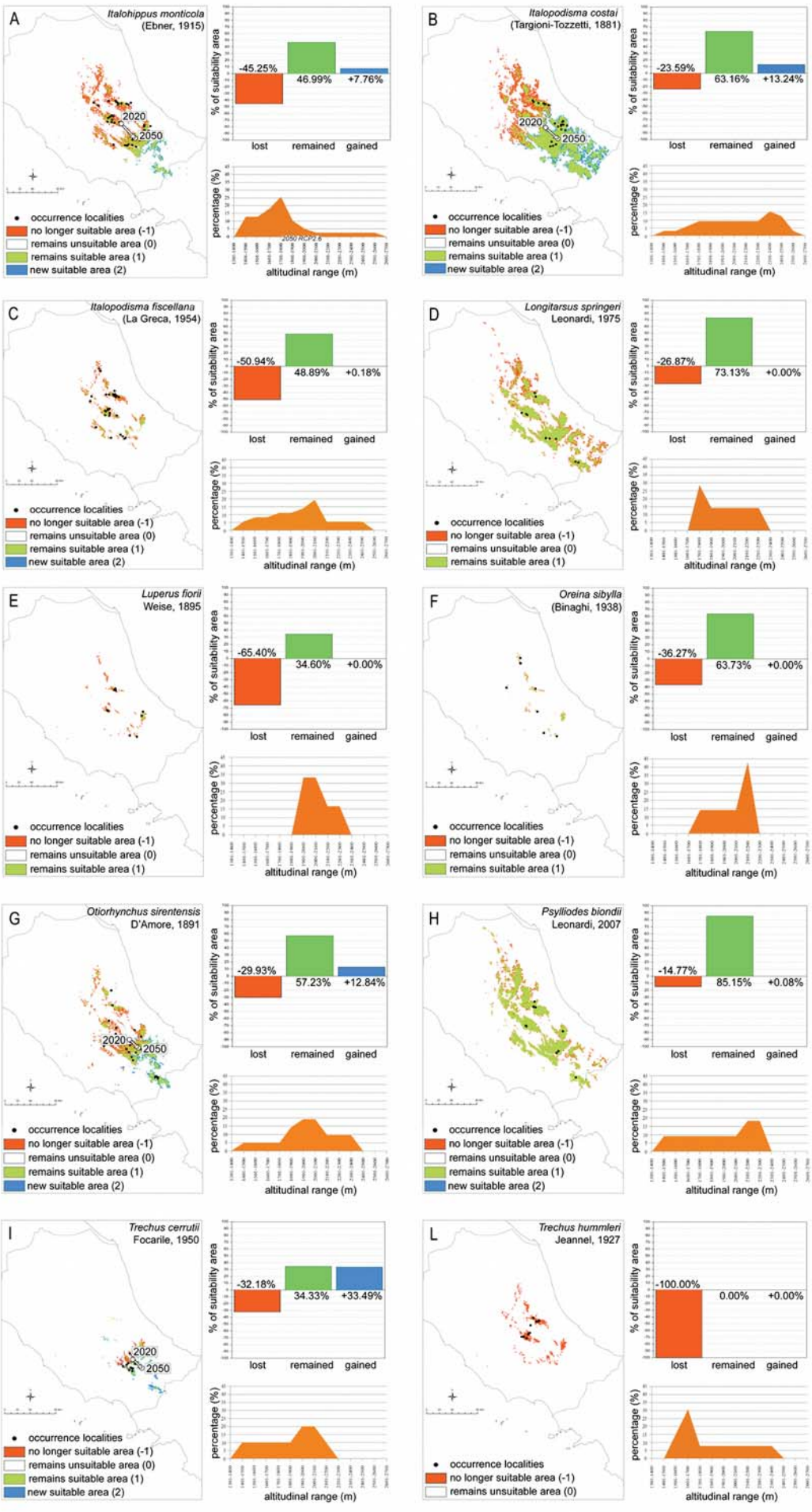
| Specie | Valori | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Variabili | Unità di misura | % contribuzione | Intervallo ottimale | Probabilità di presenza (media) % | "Zero" compatibilità |
| *Italohippus monticola* | BIO3 | / | 33,9 | 18-20 | 98 | > 34 |
| | ALT | m | 20,0 | 2000 | 68 | < 500 |
| | BIO18 | mm | 19,6 | 200 | 70 | < 60 or > 330 |
| *Italopodisma costai* | BIO3 | / | 47,4 | 18-20 | 98 | > 36 |
| | BIO18 | mm | 15,4 | 200 | 68 | < 40 or > 400 |
| | ALT | m | 12,4 | > 1800 | 68 | 0 |
| *Italopodisma fiscellana* | BIO3 | / | 42,9 | 18-20 | 96 | > 30 |
| | ALT | m | 20,1 | 1900 | 70 | < 500 |
| | BIO18 | mm | 16,2 | 200 | 71 | < 100 or > 350 |
| *Longitarsus springeri* | BIO3 | / | 33,0 | 18-20 | 98 | > 34 |
| | ALT | m | 20,1 | > 2500 | > 73 | 0 |
| | BIO12 | mm | 9,2 | 0-300 | 67 | > 2500 |
| *Luperus fiorii* | BIO3 | / | 74,5 | 17-19 | 96 | > 28 |
| | BIO9 | °C | 13,2 | -14/-10 | 83 | > 20 |
| | BIO18 | mm | 6,3 | 0-40 | 51 | > 600 |
| *Oreina sibylla* | BIO3 | / | 68,4 | 17-19 | 97 | > 28 |
| | BIO19 | mm | 13,6 | 0-80 | 75 | > 600 |
| | BIO2 | °C | 9,9 | 3,0-3,8 | 95 | > 7 |
| *Otiorhynchus sirentensis* | BIO3 | / | 46,3 | 18-20,5 | 95 | > 32 |
| | ALT | m | 21,5 | 2000 | 70 | 0 |
| | BIO18 | mm | 12,7 | 180 | 65 | < 50 or > 400 |
| *Psylliodes biondii* | BIO3 | / | 69,4 | 18-20 | 97 | > 32 |
| | BIO19 | mm | 8,3 | 20-80 | 71 | > 750 |
| | ALT | m | 7,0 | > 2500 | > 73 | 0 |
| *Trechus cerrutii* | BIO8 | °C | 43,6 | 1 | 69 | < -10 or > 10 |
| | BIO3 | / | 24,0 | 18-20 | 97 | > 32 |
| | BIO19 | mm | 12,0 | 170 | 55 | > 400 |
| *Trechus hummleri* | BIO18 | mm | 23,4 | 220 | 63 | < 40 or > 400 |
| | BIO9 | °C | 22,3 | -2,5 | 58 | < -10 or > 20 |
| | BIO8 | °C | 17,0 | 3,5 | 71 | < -10 or > 15 |

giocato dalla variabile BIO3 (isotermalità), che misura l'instabilità termometrica come rapporto tra le variazioni di temperatura giorno-notte e quelle estate-inverno, a cui la presenza delle specie risulta essere inversamente proporzionale. Una seconda variabile, molto contributiva in 6 delle specie considerate, è BIO18 (precipitazione del mese più caldo), con valori ottimali generalmente intorno ai 200 mm. Tra le variabili topografiche, va evidenziata l'importanza dell'altitudine che rappresenta un fattore significativo per 6 delle specie considerate, con quote ottimali superiori ai 2000 m.

Riguardo alle proiezioni future (2050), si possono evidenziare i seguenti risultati (Fig. 1 A-L):

– tutte le 10 specie subiscono una significativa riduzione delle aree compatibili alla loro presenza, in misura più o meno severa (14,77% di *Psylliodes biondii* al 100% di *Trechus hummleri*):
– in quattro casi (*Italohippus monticola*, *Italopodisma costai*, *Otiorhynchus sirentensis*, *Trechus cerrutii*), i modelli prevedono una virtuale acquisizione di nuove aree di compatibilità, la cui estensione si realizzerebbe con uno *shifting* in direzione sud-est. Queste supposte nuove aree

Figura 1 – Modelli di distribuzione attuale e prevista (2050 RCP2.6). Le frecce bianche indicano possibili spostamenti della compatibilità ambientale in nuove aree. Negli istogrammi: in rosso, è riportata la percentuale di aree che in futuro non saranno più compatibili con la presenza della specie; in verde, quella delle aree che si manterranno compatibili; in blu, quella delle nuove aree di compatibilità. A: *Italohippus monticola*; B: *Italopodisma costai*; C: *Italopodisma fiscellana*; D: *Longitarsus springeri*; E: *Luperus fiorii*; F: *Oreina sibylla*; G: *Otiorhynchus sirentensis*; H: *Psylliodes biondii*; I: *Trechus cerrutii*; L: *Trechus hummleri* (da URBANI *et al.*, 2017).


A
Italohippus monticola
(Ebner, 1915)
2020
2050
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
new suitable area (2)
% of suitability area
-45.25%
46.99%
+7.76%
lost
remained
gained
percentage (%)
2050 RCP2.6
altitudinal range (m)
B
Italopodisma costai
(Targioni-Tozzetti, 1881)
2020
2050
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
new suitable area (2)
% of suitability area
-23.59%
63.16%
+13.24%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
C
Italopodisma fiscellana
(La Greca, 1954)
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
new suitable area (2)
% of suitability area
-50.94%
48.89%
+0.18%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
D
Longitarsus springeri
Leonardi, 1975
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
% of suitability area
-26.87%
73.13%
+0.00%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
E
Luperus fiorii
Weise, 1895
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
% of suitability area
-65.40%
34.60%
+0.00%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
F
Oreina sibylla
(Binaghi, 1938)
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
% of suitability area
-36.27%
63.73%
+0.00%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
G
Otiorhynchus sirentensis
D'Amore, 1891
2020
2050
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
new suitable area (2)
% of suitability area
-29.93%
57.23%
+12.84%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
H
Psylliodes biondii
Leonardi, 2007
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
new suitable area (2)
% of suitability area
-14.77%
85.15%
+0.08%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
I
Trechus cerrutii
Focarile, 1950
2020
2050
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
remains suitable area (1)
new suitable area (2)
% of suitability area
-32.18%
34.33%
+33.49%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)
L
Trechus hummleri
Jeannel, 1927
occurrence localities
no longer suitable area (-1)
remains unsuitable area (0)
% of suitability area
-100.00%
0.00%
+0.00%
lost
remained
gained
percentage (%)
altitudinal range (m)

pur rivestendo una valenza soprattutto teorica, in quanto i modelli non tengono conto delle reali capacità di colonizzazione della specie o della presenza di eventuali barriere geografiche, forniscono tuttavia informazioni interessanti, qualora ci sia la possibilità di favorire l'uso di queste aree attraverso azioni mirate.

Sulla base di questa analisi, la variabile climatica che sembra maggiormente influenzare nel prossimo futuro le distribuzioni delle specie di alta quota endemiche dell'Appennino centrale in modo più significativo, è rappresentata dall'isotermalità (BIO3), evidenziando in questo modo l'elevata sensibilità di queste specie alle forti ed ampie fluttuazioni termiche e, quindi, alla severità degli eventi climatici estremi. Variazioni nell'intensità e nella frequenza delle precipitazioni, in particolare l'aumento degli eventi pluviometrici nei mesi più caldi e più umidi e il decremento invece nei mesi più secchi, risultano essere anch'essi fattori importanti che influenzeranno pesantemente la distribuzione futura dell'entomofauna associata alle alte quote, con una sensibile riduzione delle aree ad elevata compatibilità ambientale.

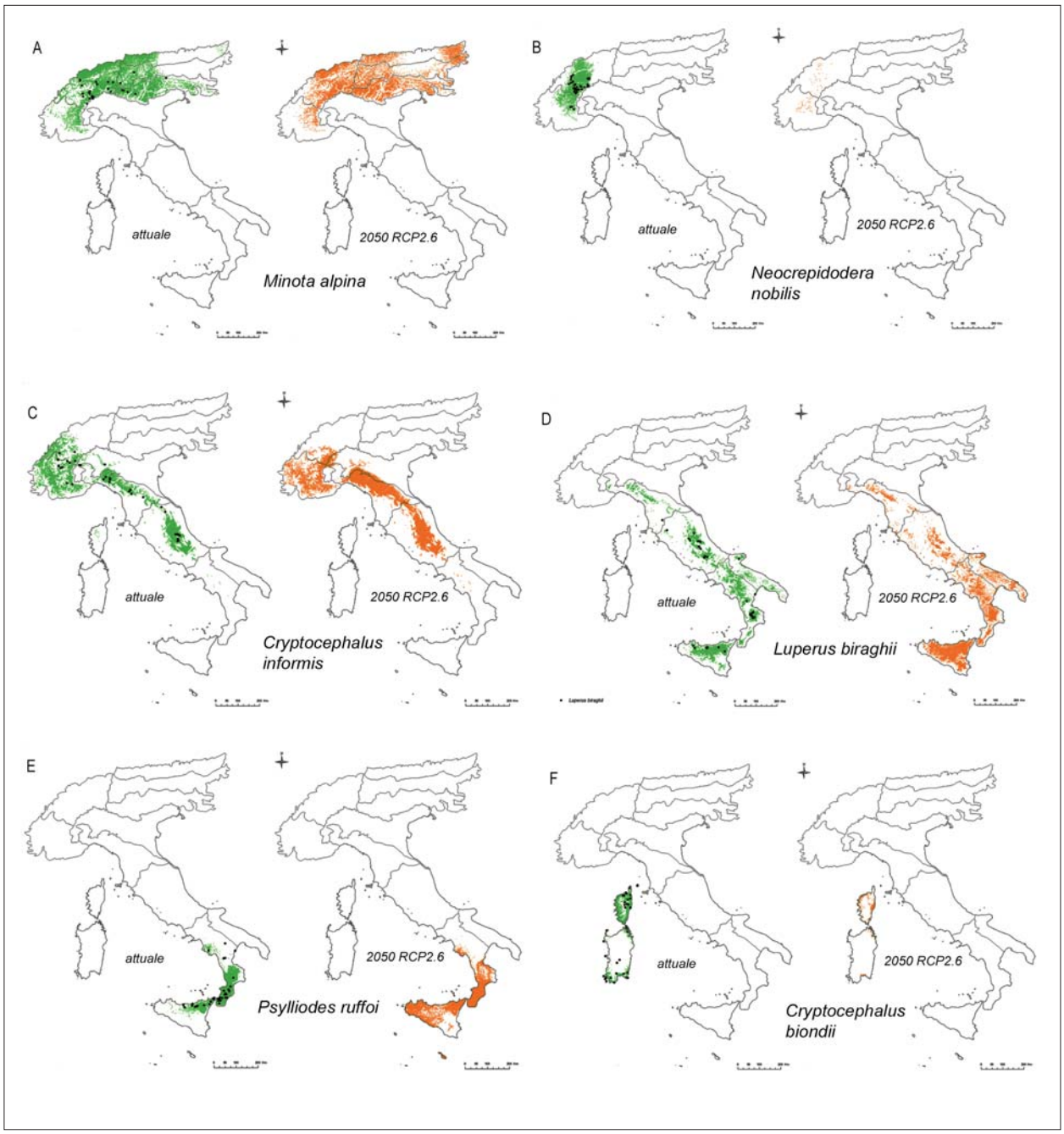



Figura 2 – Modelli di distribuzione attuale e prevista (2050 RCP2.6). A: *Minota alpina*; B: *Neocrepidodera nobilis*; C: *Cryptocephalus informis*; D: *Luperus biraghii*; E: *Psylliodes ruffoi*; F: *Cryptocephalus biondii* (dati inediti).

## Conclusioni

Considerando anche altre tipologie di distribuzione di elementi endemici della fauna italiana, come ad esempio quella alpina, alpina meridionale, alpina occidentale, alpina sud-occidentale, alpino-appenninica, appenninica, appenninico-sicula, sicula, tirrenica e sardo-corsa, la previsione degli scenari futuri risulta alquanto differenziata. Le specie nemorali di ambienti di media e medio-alta quota non sembrano subire, in base ai modelli previsionali, sensibili contrazioni del loro areale attuale, al contrario mantengono gran parte delle aree occupate e in alcuni casi è prevista un'estensione degli habitat compatibili. Questo è il caso dei Coleoptera Chrysomelidae (dati inediti) come *Minota alpina* Biondi (Fig. 2A) oppure *Orestia electra* Gredler, tra gli elementi alpini, come pure di *Oreina elongata* (Suffrian), *Luperus leonardii* Fogato, *Cryptocephalis informis* Suffrian (Fig. 2C) ed altri, con distribuzioni estese anche all'Appennino. Diversa situazione viene invece prevista dai modelli per le specie del piano alpino e subalpino, come ad esempio *Neocrepidodera nobilis* (J. Daniel) (Fig. 2B) e *N. ligurica* (J. Daniel), che andranno incontro ad una forte contrazione delle aree compatibili. Interessante è anche osservare il previsto comportamento degli elementi più meridionali o di quelli a distribuzione insulare. Anche in questo caso, specie legate agli ambienti forestali, come *Psylliodes ruffoi* Leonardi (Fig. 2E) oppure *Luperus biraghii* Ragusa (Fig. 2D), mostrano una sensibile estensione degli ambienti ad elevata compatibilità, mentre specie più prettamente mediterranee, quali *Timarcha sardea* (Villa), *Coptocephala raffrayi* (Desbrochers des Loges) o *Cryptocephalus biondii* Sassi & Regalin (Fig. 2F), presentano allarmanti riduzioni del loro habitat ottimale.

In conclusione, possiamo senz'altro affermare come i modelli previsionali applicati in particolare a specie con distribuzioni limitate ed esigenze ecologiche ristrette, e quindi potenzialmente vulnerabili, rappresentino uno strumento utile per valutare situazioni attuali o per prevedere possibili scenari futuri relativi alla loro distribuzione.

## BIBLIOGRAFIA


Elith J., Phillips S.J., Hastie T., Dudík M., Chee Y.E., Yates C.J., 2011 – *A statistical explanation of MaxEnt for ecologists.* - Diversity and Distributions, 17: 43-57.

Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A., 2005 – *Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas.* - International Journal of Climatology, 25: 1965-1978.

IUCN, 2016 – *The IUCN red list of threatened species. Version 2016-3.* [online] URL: http://www.iucnredlist.org

Menéndez R., 2007 - *How are insects responding to global warming?* – Tijdschrift voor Entomologie, 150: 355-365

Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E., 2006 – *Maximum entropy modeling of species geographic distributions*. - Ecological Modelling, 190: 231-259.

Urbani F., D'Alessandro P., Biondi M., 2017 – *Using Maximum Entropy Modeling (MaxEnt) to predict future trends in the distribution of high altitude endemic insects in response to climate change*. - Bulletin of Insectology, 70: 189-200.

Urbani F., D'Alessandro P., Frasca R., Biondi M., 2015 – *Maximum entropy modeling of geographic distributions of the flea beetle species endemic in Italy (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini).* - Zoologischer Anzeiger, 258: 99-109.

176 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 177-181*

# POSSIBLE EXTINCTION, POPULATION REDUCTION AND REDISCOVERY OF ITALIAN BLISTER BEETLES (COLEOPTERA, MELOIDAE)

MARCO A. BOLOGNA[a]

[a] *Dipartimento di Scienze, Università Roma Tre, Viale G. Marconi, 446, 00146 Roma, Italy;* email: marcoalberto.bologna@uniroma3.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018.

*Possible extinction, population reduction and rediscovery of Italian blister beetles (Coleoptera, Meloidae)*

In this contribution the first analysis of the conservation status of the Italian Meloidae is carried out. Cases of possible extinction or population reduction, as well as the rediscovery of new populations after long time, are examined and briefly discussed through 21 examples in different genera of subfamilies Meloinae and Nemognathinae. In particular, the following cases are examined: (i) possible complete extinction in species previously recorded, especially from the alpine area and the main Tyrrhenian islands, no more collected after about one century; (ii) cases in which was supposed the extinction of species recently rediscovered; (iii) possible local extinctions; (iv) large reduction of populations. Causes of these phenomena are discussed and strategies of conservation are proposed.

KEY WORDS: Populations trend, habitat transformations, conservation strategies.

## INTRODUCTION

The species extinction and faunal turnover are evolutionary processes occurred regularly along the eras with impressive repeated peaks of species disappearance. The recent phenomenon of extinction due to the human environmental transformation in the so called Anthropocene is dramatically distinct from the previous ones, especially in the last century (e.g. VIGNIERI, 2014). In this framework, the conservationists interest was mainly addressed to local and global threats or extinctions of vertebrates, while the public attention was scarcely focused on invertebrates. A clear example of this unbalanced concern is pointed out by the European Habitat Directive**,** in which a number of invertebrates representing less than 50% of that of vertebrates are listed.

Yet, the World species diversity is represented especially by terrestrial and freshwater hexapods, a Metazoan lineage for which the existence of millions of species has been proposed, a number enormously bigger than the ca. 900.000 species described until now (STORKA *et al*., 2015). The increasing destruction of terrestrial ecosystems, especially tropical forests, temperate prairies and wetlands, could produce the extinction of thousands insect species, most of which before their description.

The process of insect disappearance or reduction was never faced in detail but only generically discussed as concerns the Italian fauna (see BOLOGNA, 2002; LA POSTA *et al*., 2002), which includes at least 35.000 species (MINELLI *et al.,* 1995), but probably a few thousands more (unpublished data from the Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia).

Aim of the present contribution is to develop a preliminary analysis of the reduction and extinction in an Italian insect family (Coleoptera, Meloidae), studied by the Author since several years and on which thousands of chrono-geonemic records were included in a specific database (for a synthesis: BOLOGNA, 1991; BOLOGNA, unpublished). This beetle family represents a good model for such analysis being its complex life history (hypermetabolic development) and its obliged relation with hosts (Aculeata and Acridoidea primarily) extremely sensitive to environmental transformations. Moreover, these beetles, well known in the literature also for their contents of cantharidin, are showy, easily to sample and to monitoring. Meloidae includes ca. 3000 species, distributed in 130 genera and three subfamilies; mostly are diurnal, heliophilic and thermophilic, all phytophagous and strictly related to open ecosystems (steppe, prairies, savannas) (BOLOGNA & PINTO, 2001; BOLOGNA *et al.*, 2008; BOLOGNA & DI GIULIO, 2011).

The information on cases of reduction and extinction of blister beetles in extra-European countries is scarce, and in only two of them are partially docu-

– Pubblicato marzo 2019

mented. Four species of *Lytta* Fabricius, 1775, endemic to well explored and monitored zones of California, some of which previously regularly collected, were never more sampled since several years: (i) *Lytta hoppingi* Wellman, 1912, abundant until 1940 in the San Joaquin Valley (south Central Valley), and afterwards collected few times, the last single record on 1993; (ii) *L. moesta* (Horn, 1885), from Central Valley, the last record of which occurred on 1930; (iii) *L. morrisoni* (Horn, 1891), from the same region, always uncommon, with a single record on 2003 after several decades without samples; (iv) *L. insperata* (Horn, 1874) from the San Diego County (Mojave Desert, Ventura), the unique records of which occurred more than 100 years ago (see SELANDER, 1960; *explorer.natureserve.org*).

The second case concerns the Paleaotropical nocturnal genus *Zonitoschema* Péringuey, 1909, represented in the Oriental Region by some 50 species, several of which still undescribed (BOLOGNA and PAN, unpublished). Four species from small islands of Indonesia were never more sampled after one century: *Zonitoschema amboinensis* (Pic, 1916) from Ambon Island, *Z. celebensis* (Pic, 1911) from N Sulawesi, *Z. mitshkei* (Pic, 1911), from Nias Island, near Sumatra, and *Z. oceanica* (Pic, 1915) from Simbawa Island. Actually, entomological samplings in this southeastern Asian region are scarce and the lacking of records of some species of this genus could be due to the reduced exploratory effort, but the great destruction of open natural habitats in this country and its transformation into rice or oil palm cultivations, could represent the real cause of the disappearance of these *Zonitoschema*.

As for the European fauna, cases of local species extinction or population reduction were discussed as concerns for example Germany (LÜCKMANN & NIEHUIS, 2009), Switzerland (CHITTARO & SANCHEZ, 2016) and Poland (STEBNICKA, 1987).

## THE CONSERVATION STATUS OF ITALIAN MELOIDAE

Sixty-one species of blister beetles have been recorded with certainty in Italy and for 14 of them (23%) no records are documented since at least 50 years. Additional 23 species were recorded, but these data could be due to doubtful samplings or to label errors (BOLOGNA, 1991, 2005; RUIZ *et al.*, 2010). In general, according to the reduction of records, the disappearing of several populations of all Italian species seems an obvious phenomenon in our country. I personally documented this process in some areas regularly monitored in the last 40 years (e.g. in Latium: Tarquinia, Tolfa Mts., Maccarese-Castel di Guido).

All examples discussed in the followings paragraphs are based on museum specimens or literature citations personally examined, especially for the preparation of the "Fauna d'Italia" (BOLOGNA, 1991), but also in the last 20 years. The last Italian known localities and the date of records are indicated for each species.

The case histories of Italian species disappearance is greatly diversified. Some examples are discussed below, by dividing them in distinct typologies.

(I) *Possible definitive extinction in Italy*

(a) *Alosimus tyrrhenicus* Bologna, 1989 (Meloinae, Lyttini): Described from Latium (Monte Cavo: 1910) and Tuscany (Pisa: 1930), but never more collected despite repeated researches (Bologna, 1989). It is a Tyrrhenian endemism, belonging to a group of species with Maghrebian species and another isolated and never more collected relict species from Somalia.

(b) *Alosimus syriacus* (Linnaeus, 1758) (Meloinae, Lyttini): This polytypic species, distributed from central Europe to Iran, was recorded from localities of the southern alpine and subalpine valleys (Ticino, Sempione: 1871; Alto Adige: 1866; Vicenza: 1870), but no more Italian records are known since more than one century. Also in the neighbouring countries the scarce data refer to the XX century (HORION, 1956; CHITTARO & SANCHEZ, 2016).

(c) *Oenas crassicornis* (Illiger, 1800) (Meloinae, Lyttini): It is another species distributed from central Europe to Iran, and recorded from the eastern Italian Alps (Alto Adige: 1866; Friuli, Ampezzo: 1904), where it was never confirmed, such as in the adjacent countries.

(d) *Actenodia billbergi* (Gyllenhal, 1817) (Meloinae, Mylabrini): This Iberian-Provençal species was recorded from Liguria (1900) but never more collected. Possibly, these data refer to the Nice province, previously included in the late Kingdom of Sardinia, or to western Liguria, where other West Mediterranean elements reach their eastern range limits. A similar case, not well documented, concerns another mylabrine species, *Hycleus brevicollis* (Baudi, 1878), a Maghrebian element found also in the Valencian coast, one type of which is labelled "Albenga", in western Liguria. The local extinction of *Mylabris quadripunctata* (Linnaeus, 1767) in the same area is discussed below.

(e) *Meloe (Micromeloe) uralensis* Pallas, 1773 (Meloinae, Meloini) (Fig. 1. 1): Central Asiatic element distributed in eastern and central Europe; recorded from Alto Adige, Merano (1866), but never more collected.

(f) *Meloe (Micromeloe) decorus* Brandt & Erichson, 1832 (Meloinae, Meloini): Species with the same

distribution of the previous one, recorded from few localities from northern Italy, the last one in Piedmont (Astigiano: ca. 1970).

(g) *Meloe (Meloegonius) rufiventris* Germar, 1832 (Meloinae, Meloini): The third *Meloe* with a central Asiatic-European distribution, recorded only from Lombardy (1870?) and extinct also from several areas of central Europe.

(h) *Meloe (Taphromeloe) foveolatus* Guérin-Méneville, 1842 (Meloinae, Meloini): This species has a fragmented and relict distribution in the Mediterranean Basin. Few localities are known on the coastal Spain and Maghreb, until Libya, with an isolated record, never confirmed, from Apulia, Brindisi (ca. 1900).

(i) *Euzonitis fulvipennis* (Fabricius, 1792) (Nemognathinae, Nemognathini): Pontic species, with an apparently trans-Jonian distribution, uncommon in Balkans, with an isolated and never confirmed record from Calabria (Catanzaro marina: 1884).

(j) *Leptopalpus rostratus* (Fabricus, 1792) (Nemognathinae, Nemognathini): Western Mediterranean element, with an early Spring phenology, sampled in both Sardinia (ca. 1900) and Sicily (ca. 1880), but never recorded since more than one century.

(k) *Nemognatha chrysomelina* (Fabricius, 1775) (Nemognathinae, Nemognathini): As the previous species, also this one, widely distributed from the Turanian depression to Mediterranean, was recorded from Sardinia (1870) and Sicily (1900), but no more sampled.

(l) *Trichomeloe sericellus* (Reiche, 1857) (Meloinae, Lyttini): This species represents a biogeographic enigma, being distributed in the Syrian-Palestinian area, but with isolated and never confirmed old records from Crimea and Sicily (Palermo and generically from Sicily: ca. 1900).

(II) *Apparent extinction and recent recurrence*

(a) *Epicauta rufidorsum* (Goeze, 1777) (Meloinae, Epicautini): This western European species was considered as a crop pest in Italy until the II World War, but its populations had a quick reduction after that period and apparently disappeared in some regions (e.g. Latium, Tuscany). In the last two decades, demographic explosions of this hidden species have been signalized in Emilia-Romagna and in Venezia-Giulia.

(b) *Stenoria analis* Schaum, 1859 (Nemognathinae, Nemognathini): This European-Mediterranean species, apparently localized in the whole range, was cited for the first time from Italy by Bologna (1991), who examined one old specimen from Liguria and single samples from Istria and Sicily. In the last ten years this species, strictly parasite of bees of the genus *Colletes* Latreille, 1802 (Hymenoptera, Colletidae) shows a huge and apparently rapid increasing of records on *Colletes hederae* Schmidt & Westricht, 1993 in central Europe (France, Belgium, the Netherlands, Germany) (Vereecken *et al.*, 2010). This expansion occurred also in Italy, and some new records from several regions have been signalized recently (Bologna, 2005; unpublished).

(III) *Local populations extinction or decline*

(a) *Mylabris flexuosa* A.G. Olivier, 1811 (Meloinae, Mylabrini) (Fig. 1. 2): It represents a glacial relict

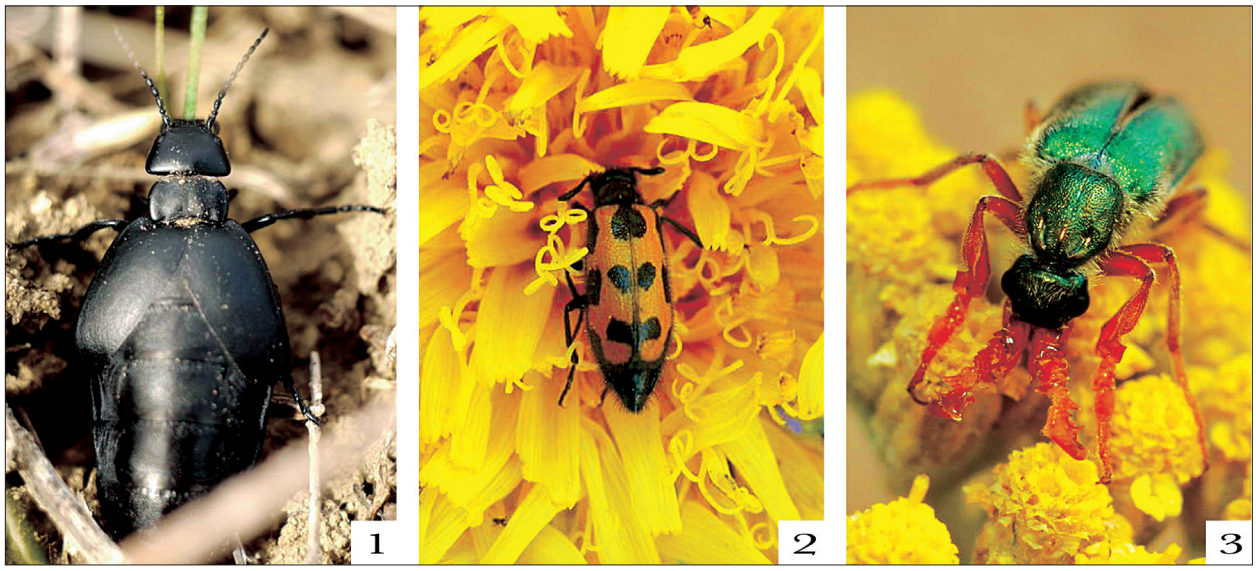



Fig. 1 – (1) *Meloe* (*Micromeloe*) *uralensis* Pallas (Ukraine, photo Efariis); (2) *Mylabris* (*Micrabris*) *flexuosa* Olivier (Italy, Valle d'Aosta, photo M. Bologna); (3) *Cerocoma (Cerocoma) schaefferi* (Linnaeus) (Spain, photo J. Lückmann).

with a fragmented range in Pyrenees, western Alps, central Apennines and possibly isolated populations in the Central Massif, eastern Alps and northern Apennines. The Sicilian populations recorded from the Peloritani Mts. in the 1860 (see BOLOGNA, 1991) are extinct. Those from the Pollino Massif in southern Apennines decreased after 1980 and are now very localized and reduced numerically. The populations from northern Apennines and Trentino were never more collected after 1970. A possibly cause of this decline, especially for the Pollino and Peloritani populations, is imputable to the climate change, which reduced the extension of the primary alpine pastures caused by the expansion of mesic forests.

(b) *Mylabris quadripunctata* (Linnaeus, 1767) (Meloinae, Mylabrini): Species widely distributed from Portugal to western China, with the western Mediterranean populations isolated (Iberian Peninsula and southern France; southern Italy). The western Ligurian population, extreme extension of the Iberian -Provençal sub-range, is extinct after 1920 and never collected despite repeated researches.

(c) *Cerocoma schaefferi* (Linnaeus, 1758) (Meloinae, Cerocomini) (Fig. 1. 3): This European-Anatolian species suffered a strong reduction in central Europe (HORION, 1956; LÜCKMANN & NIEHUIS, 2009; CHITTARO & SANCHEZ, 2016) and probably is extinct in Alto Adige (a single record in 1866), while is still relatively common in the disjoined southern Italian population (Basilicata, Calabria).

(IV) *Rarefaction and localization*

(a) *Mylabris impressa* Chevrolat, 1840 (Meloinae, Mylabrini)*:* The Sicilian populations of this Sicilian-Maghrebian element, have been described as distinct species (*M. stillata* Baudi, 1878) and molecular studies are need to define their taxonomic status. At present, only two populations from xeric localities of Trapani province have been confirmed, while the remaining few localities previously recorded, were never confirmed.

(b) *Meloe variegatus* Donovan, 1793 (Meloinae, Meloini): A progressive rarefaction and local extinction of this European-Asiatic species was pointed out in western and central Europe (LÜCKMANN & NIEHUIS, 2009). The last Italian specimen was collected in 1980 in Piedmont, while regular surveys on some previously known populations from central Italy (Grosseto and Viterbo provinces) failed.

(c) *Meloe saharensis* Chobaut, 1898 (Meloinae, Meloini): Saharan species, with single localities in the coastal Spain and in the Italian Island of Lampedusa (Agrigento province).

(d) *Zonitis fernancastroi* Pardo Alcaide, 1950 (Nemognathinae, Nemognathni): This western Mediterranean species was recently discovered in a single population in Vendicari (Sicily).

## POSSIBLE CAUSES OF THE REDUCTION AND CONSERVATION STRATEGIES

The reasons of the recent reduction or extinction of blister beetle populations in Italy, and more generically in Europe or in other World countries, were never studied in detail, but according with the Author's experience, at least some causes can be singled out. First of all: the reduction of suitable habitats, such as natural pastures and steppe, due to the agriculture, which greatly reduced the domestic livestock grazing; the urbanization that consumed further open habitats; the recent spread of woodlands due to the grazing abandonment; the chemical pollution due to industrial and agricultural activities.

All these causes affect directly the blister beetle populations and synergically affect their larval hosts, Aculeata and Acridoidea. The pollution seems affect especially wild bees, while the pastures transformation and the deeper ploughings affect more directly grasshoppers. The major damage of pollution seems hit especially wild Apoidea, hosts of several specialized genera of Meloidae.

In addition, the disappearance of some blister beetle species in Italy is probably due to the localization of their populations because of biogeographical origins. Most of the discussed examples concern species which in our country had their limits of range, such as western Mediterranean or Central Asiatic-European. The marginalization, fragmentation or disjunction of their ranges, with numerically reduced populations should have contributed to their disappearance after land transformation and pollution.

In general, for the species with a larval more specialized biology, the need of hosts produced a metapopulation structure, connected to a scarcely suitable environmental matrix. This condition could be partially get over in some phoretic species, but the rarity of hosts obstruct the colonization process and the maintenance of large populations.

To define conservation strategies is a recent target for the entomologists. Monitoring rules for some saproxylic beetles were tested recently in our country (CARPANETO *et al*., 2017). As regards Meloidae some suggestions are proposed below, most of which have a general interest for other groups of insects. (a) Developing regional, national and European policies, over the Habitat Directive, in

which specifically strategies for the protection of numerous insect species, not only a few flag-species are defined. The protection strategies must consider the safeguard of quite large areas suitable to maintain viable populations. (b) Defining priority conservation lists of species (or populations), based on biogegraphic-ecological methods (e.g.: relict, endemic, niche specialization, life history, reproductive strategies). To develop Red Lists, based on the IUCN methods, as those published by the Italian Ministry of Environment or by the Tuscany regional government (BOLOGNA, 2005a). (c) Supporting faunistic researches aimed at locating relict populations of endangered species and to test the possible extinction of species or populations. (d) Utilizing chronogeonemic data resulted from faunistic researches to define conservation projects for species or habitats, especially for very threatened ecosystems such as natural pastures and steppe. (e) Promoting the natural restoration of areas abandoned by agricultural activities and maintaining wide glades in woodlands. (f) Defragging the metapopulations discontinuity by the maintenance of ecological corridors, that can have a multispecific role. (g) Defining, testing and developing methods of monitoring the most threatened species, in agreement with the guidelines of the European LIFE projects.

## REFERENCES


BOLOGNA M.A., 1989 – *Un nuovo* Alosimus *del litorale tirrenico e note tassonomiche su altre specie congeneriche nord africane (Coleoptera, Meloidae)*. - Fragmenta Entomologica, 21: 191-204.

BOLOGNA M.A., 1991 – *Coleoptera Meloidae*. Fauna d'Italia. XXVIII. Calderini, Bologna, XIV+541 pp.

BOLOGNA M. A., 2002 – *Rarefazione ed estinzione di specie*. In: La Fauna, Minelli S., Chemini C., Argano R., Ruffo S. Ed., Touring Club Italiano, Ministero dell'Ambiente, pp. 390-419.

BOLOGNA M.A., 2005 – Zonitis fernancastroi, *a new species for the Italian fauna, and additional records of Meloidae and Oedemeridae (Coleoptera)*. - Boll. Soc. entomol. ital., 137: 107-114.

BOLOGNA M. A., 2005a – *Criteri per la redazione di una prima Lista Rossa di specie di interesse nazionale e regionale*. In: Checklist e distribuzione della fauna italiana, Ruffo S. & Stoch F. Ed. - Mem. Museo Civ. St. Nat. Verona, (2) Sez. Scienze della Vita, 16, pp. 63-66.

BOLOGNA M.A., PINTO J.D., 2001 – *Phylogenetic studies of the Meloidae (Coleoptera), with emphasis on the evolution of phoresy*. - System. Entomol., 26: 33-72.

BOLOGNA M. A., DI GIULIO A., 2011 – *Biological and morphological adaptations in the pre-imaginal phases of the beetle family Meloidae*. - Atti Accad. Naz. Ital. Entomol., 59: 141-152.

BOLOGNA M.A., OLIVERIO M., PITZALIS M., MARIOTTINI P., 2008 – *Phylogeny and evolutionary history of the blister beetles (Coleoptera, Meloidae)*. - Mol. Phylog. Evol., 48: 679-693.

CARPANETO G.M., CAMPANARO A., HARDERSEN S., AUDISIO P., BOLOGNA M. A., MASON F., 2017 – *The LIFE Project "Monitoring of insects with public participation" (MIPP): aims, methods and conclusions*. - Nature Conservation, 20: 1-35.

CHITTARO Y., SANCHEZ A., 2016 –*Liste commentée des Tenebrionoidea (Coleoptera) de Suisse. Partie 1: Aderidae, Anthicidae, (Boridae), Melandryidae, Meloidae, Mycetophagidae, Mycteridae, Prostomidae, Pyrochroidae, Pythidae, Ripiphoridae, Salpingidae, Tenebrionidae, Tetratomidae, Zopheridae*. - Mitteil. Schweiz. Entomol. Gesell., 89: 183-235.

HORION A., 1956 – *Faunistik der Mitteleuropaischen Käfer: Band 5: Heteromera*. – Entomol. Arb. Mus. G. Frey Tutzing München: 1-336.

LA POSTA S., ANGELICI F. M., SARROCCO S., BOLOGNA M., 2002 – *La conservazione della fauna*. In: La Fauna, Minelli S., Chemini C., Argano R., Ruffo S. Ed. Touring Club Italiano, Ministero dell'Ambiente, pp. 420-428.

LÜCKMANN J., NIEHUIS M., 2009 – *Die Ölkäfer in Rheinland-Pfalz und im Saarland. Verbreitung, Phänologie, Ökologie, Situation und Schutz., Gesellschaft für Naturschutz und Ornithologie Rheinland* - Pfalkza e V., Mainz, 479 pp.

MINELLI A., RUFFO S., La POSTA S. (Eds.), 1995 – *Checklist delle specie della fauna italiana*, vols. 1-110. Calderini, Bologna.

RUFFO S., STOCH F. (Eds.), 2005 – *Checklist e distribuzione della fauna italiana*. - Mem. Museo Civ. St. Nat. Verona, (2), Sez. Scienze della vita, 16: 1-307.

RUIZ J.L., BOLOGNA M.A., GARCÍA-PARÍS M., 2010 – *Taxonomia y distribución de* Meloe (Eurymeloe) saharensis *Chobaut, 1898 (Coleoptera, Meloidae), con nuevas synonymias y primeros registros para Europa y Macaronesia*. - Graellsia, 66: 85-96.

SELANDER R. B. 1960 – *Bionomics, systematics, and phylogeny of* Lytta*, a genus of blister beetles (Coleoptera, Meloidae)*. - Illinois Biol. Monogr., 28: i-vi, 1-295.

STEBNICKA Z., 1987 – Klucze do oznaczania owadów Polski. XIX. Coleoptera. 84. Meloidae. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, pp. 1-34.

STORKA N.E., MCBROOMA J., GELYB C., HAMILTONC A.J., 2015 – *New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods*. - PNAS, 112: 7519-7523.

VEREECKEN N.J., DUFRÊNE P., LÜCKMANN J., DEVALEZ J., RAEMAKERS I., BOLOGNA M.A., 2010 – *Synthèse des observations récentes de* Stenoria analis *(Schaum) (Coleoptera, Meloidae) en France et dans les régions voisines*. - Osmia, 4: 1-4.

VIGNIERI S., SUGDEN A.M., PENNISI E. (Eds.) 2014 – *Vanishing Fauna*. Special Issue. Science, 345 (6195).

182 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 183-189*

# ESTINZIONI A LIVELLO DI HABITAT ED A MESO-SCALA DI SPECIE E COMUNITÀ DI COLEOTTERI CARABIDI: ESPERIENZE IN ITALIA

PIETRO BRANDMAYR[a] - GIORGIO COLOMBETTA[b] - ROBERTO PIZZOLOTTO[a]

[a] *Dipartimento DIBEST - Biologia, Ecologia e Scienze della Terra dell'Università della Calabria*
[b] *via Elia, 2 - 34100 Trieste*
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018.

*Extinctions of Carabid beetle species and communities at habitat level and at mesoscale: experiences in Italy*

The extinction of carabid species and communities at local and mesoscale have poorly studied in Italy, nevertheless there are some evidence that habitat alteration, harvesting, pollution and climate change are synergic threatening the communities of forest habitats and the high mountain biotopes around the tree-line. At lower altitude extinctions are particularly frequent in forests, catastrophic events like clear cutting act synergic with other factors and overwhelm the ecosystem resilience, in a way that not even restoration processes are able to reconstruct the original species assemblage. In the Farneto suburban forest near Trieste the clear cut has been the key event that triggered the feedbacks leading over the MVP treshold for many forest specialists and water bound species. In this single forest extinction affected 50% of the ancient community and more.

Climate change is acting more covertly, sneaky and underhand in the more resilient montane forests, but the effects are strong in open lands, pastures and shrublands.

Local population extinctions due to climate change in mountains started probably at least one century ago, as demonstrated for *Leistus punctatissimus*, but extinctions increased highly in the last three decades, after 1980, as suggested by the comparison with the reports of older alpine entomologists, like Holdhaus, Franz and several others.

At mesoscale (provinces of Trieste and Gorizia) the extinctions are less frequent and involve smaller fractions of the resident fauna, but more accurate assessments can be obtained only by thorough investigations in a wider frame of habitats, that should involve the Natura 2000 SAC sites.

KEY WORDS: habitat alteration, harvesting, pollution, climate change, uphill shift, Dolomites

## INTRODUZIONE

Il processo di estinzione di una specie animale comporta in generale un declino, spesso sincrono, di una frazione rilevante o anche di tutte le sue popolazioni e dipende da molti fattori concomitanti, che sinergicamente contribuiscono a raggiungere il livello di "minimum viable population" (MVP), al disotto del quale la dinamica di estinzione diviene irreversibile. In queste poche pagine si cerca di dare un'idea di alcuni casi già accertati di estinzione locale di specie di Coleotteri Carabidi, loro comunità o parte di esse in seguito agli impatti che oggi più comunemente si abbattono sulla biodiversità animale di singoli habitat o a livello regionale, quindi di micro- o meso-scala nel nostro paese. Secondo BROOKS *et al.* (2007, Fig. 1) le cause più importanti nella perdita di biodiversità sono la perdita di habitat, il prelievo di biomassa, l'invasione di specie aliene, come ad esempio un predatore rilasciato su di una piccola isola, la frammentazione dell'habitat, l'inquinamento e, non ultimo, il cambiamento climatico. Va sottolineato che le estinzioni locali delle popolazioni di insetti non sono un fatto infrequente, esse fanno parte di quello che si può definire un naturale ricambio che in certi habitat è addirittura la regola, almeno per una parte delle specie della comunità, come apprendiamo ad esempio da studi di dinamica di popolazioni in paesaggi antropizzati ad opera di DEN BOER, (1977). Questo autore distingue nell'ambito dei Carabidi specie con elevato turn over delle popolazioni e specie a basso turn over, queste ultime tipiche di ambienti più stabili come ad esempio le foreste. L'obiettivo di questa breve rassegna è di dare qualche esempio in territorio italiano di estinzione locale di comunità ben documentato e di esaminarne le cause, nel tentativo di ricostruire le sinergie che poi si sono innescate. Vedremo poi di fare il punto su estinzioni attribuibili al cambiamento climatico, che iniziano a presentarsi con sempre maggior evidenza soprattutto negli ambienti di montagna, per terminare con un bilancio di estinzione di specie a meso-scala, e precisamente la quantificazione del numero di specie estinte nel territorio delle provincie di Trieste e Gorizia, per le quali abbiamo raccolto negli ultimi decenni dati esaustivi ed attendibili, grazie anche alla consultazione delle collezioni pubbliche (Museo Civico di Storia Naturale di Trieste) e private disponibili.

– Pubblicato marzo 2019

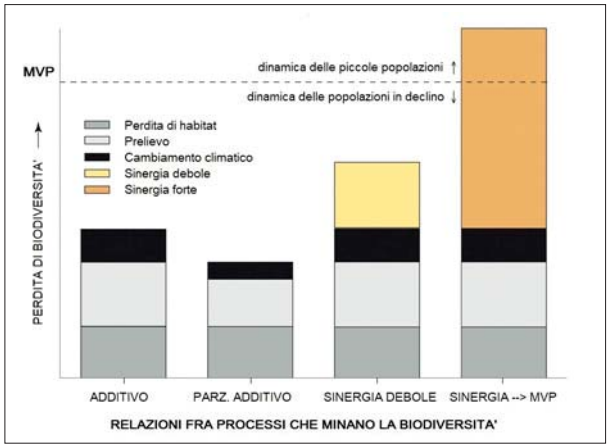



Fig. 1 – Relazioni fra processi che portano a diminuzione della biodiversità e loro relazioni. Prima colonna: modello interamente additivo che presume che all'effetto finale ciascun processo contribuisca in modo separato, mentre nel modello parzialmente additivo l'effetto di un processo può comprendere anche quello di un altro. Nella terza colonna si presume che a causa della sinergia fra processi l'effetto finale sia maggiore della somma dei singoli processi (per esempio l'effetto combinato di distruzione della foresta e del cambiamento climatico sorpassa il limite superiore di tolleranza termica di molte specie in una comunità). Nella quarta colonna il feedback positivo fra processi è talmente forte che le popolazioni possono arrivare al limite della minima densità o dimensione totale (MVP), in tal caso subentra la dinamica delle piccole popolazioni, per le quali la sopravvivenza o la possibilità di estinzione si basa su eventi prevalentemente stocastici. Da Brooks *et al*., 2007, modificato.

## Il Bosco Farneto di Trieste: da foresta secolare a bosco secondario. Cosa rimane della biodiversità originaria?

Il Bosco Farneto di Trieste costituisce un esempio eclatante del destino che hanno subito nel corso del secolo precedente tanti boschi suburbani nel nostro paese. Situato praticamente ai confini del centro storico della città, la divide quasi in due parti riagganciandosi al suo estremo orientale con le pinete del ciglione carsico che sovrasta Trieste. Attualmente di circa 240 ettari di estensione (Fig. 2), il Farneto costituiva da tempo immemorabile, probabilmente dal Medio Evo, la riserva della guarnigione della città, che poi venne ad essere il porto più importante dell'Impero Austroungarico. Il soprassuolo era dato da querce secolari di notevoli dimensioni, tanto che sono numerosi i reperti di *Osmoderma eremita* conservati soprattutto presso il Museo triestino, insieme ad altre specie della Direttiva 92/43 CEE "Habitat", come *Lucanus cervus* e *Cerambyx cerdo*. Il bosco forniva non solo legna da costruzione o da ardere, un moderato pascolo, ma anche foglie di sommacco per la concia delle pelli ed era rigorosamente tutelato contro gli eccessi di prelievo. Nel 1772 l'Intendenza del Litorale vieta "l'uso di tabarri o cappotti fatti di corteccia di rovere", e più volte i triestini si oppongono allo smembramento della proprietà imperiale, finché nel 1844 Ferdinando I d'Asburgo ne fa dono al Comune, come proprietà inalienabile, ponendo come condizione il suo perpetuo mantenimento a bosco. A parte qualche problema di prelievo nel 1916, durante la prima guerra, il bosco persiste nella sua integrità sino al 1944, quando subisce per motivi più che immaginabili un taglio totale. Nell'immediato dopoguerra, sotto la direzione del Governo Militare Alleato, la situazione viene aggravata dalla improvvida estirpazione delle residue ceppaie, seguita poi dai primi tentativi di ripristino della foresta sia con essenze locali che con il pino nero, tentativi che vedono però anche l'espandersi a macchia d'olio della tenace Robinia, che in un primo tempo rallenta fortemente la crescita delle altre latifoglie.

Nel 1983, anno d'inizio del nostro studio sul Bosco Farneto (Brandmayr *et al.,* 2009), la foresta si presenta in gran parte ricostituita, con una prevalenza di querce di almeno 30/35 anni su buona parte della superficie, la robinia in declino e circa il 15% della superficie coperta da pino nero, insieme ad alcuni residui tratti ancora caratterizzati

Fig. 2 – Il Bosco Farneto intorno agli anni 2000. Il punto più vicino al centro della città si trova a circa 40 m di altitudine, l'estremo nordorientale arriva ai 240 metri sul livello del mare, con esposizione prevalente NE.

da pascolo in fase di incespugliamento. Vengono posti in opera 13 gruppi di tre trappole a caduta a copertura dell'intero bosco, dal centro città sino alla periferia NE, dove sopravvive il pascolo più esteso. I risultati di un anno di campionamento vengono poi confrontati con i reperti elencati nell'ormai storico Catalogo Topografico di Giuseppe MÜLLER (1926), che ha il vantaggio di attribuire ad ogni specie elencata anche il preciso rione di Trieste nel quale era stata rinvenuta. La somma dei dati di Müller e di singoli reperti posteriori rinvenuti in altre collezioni entomologiche private ci consente di considerare presente sino al 1944 una comunità forestale di almeno 61 specie (Fig. 3), 15 delle quali strettamente forestali, 24 legate a pascolo o radure, 22 invece dipendenti da acque correnti o stagnanti o comunque da elevata umidità del suolo. Nel 1983/84 nelle pitfalls vengono raccolte 27 specie, più quattro in raccolta diretta specialmente lungo i ruscelli ed in ambienti più umidi della foresta. Questa nuova comunità presenta ben 19 specie di ambiente forestale, delle quali 14 si possono definire silvicoli specializzati, primeggiano per abbondanza *Carabus catenulatus*, *C. caelatus* e *C. coriaceus*, la dieta del primo è soprattutto a base di lombrichi, i secondi sono prevalentemente elicofagi, specialmente allo stato larvale. Ben cinque specie silvicole risultano endemiche dell'Europa sudorientale, fra queste ricordiamo *Trechus subnotatus*, sopravvissuto lungo un ruscello che scorre ancora nei pressi dell'Orto Botanico. Fra le specie rinvenute negli anni '80 vi sono anche alcune non registrate in precedenza, come *Abax parallelepipedus* (= *ater* auctt.), probabilmente sfuggito agli entomologi del primo Novecento, ed altre 8 delle quali 5 legate alle radure.

Il bilancio complessivo delle "perdite di biodiversità" risulta pesante: 39 specie mancano all'appello (Fig. 3), di queste ben 17 sono legate al pascolo, ed altre 17 igrofile o ripicole. Il comparto forestale è quello che subisce meno perdite, non più di 5 delle 19 specie originariamente presenti, se includiamo alcune tipicamente forestali rinvenute solo nel 1983 ma certamente presenti anche prima. Scompaiono però specie ecologicamente molto esigenti, come *Procerus gigas*, estintosi del tutto probabilmente intorno agli anni '70/80, il carabide dendrofilo *Laemostenus venustus*, legato alle querce secolari, *Laemostenus elongatus*, il bembidiino endogeo *Anillus florentinus*. Anche tenendo conto degli eventuali errori e delle differenze metodologiche fra i due campionamenti, uno protrattosi per molti anni e manualmente negli anni fra il 1890 ed il 1940, il secondo con trappole a caduta nei soli anni 1983/84, si registra comunque almeno un dimezzamento (39/70 = 55,7%) del numero di specie di Carabidi. La scomparsa di un discreto numero di specie di habitat erbacei si spiega probabilmente con la cessazione del pascolo ovino, avvenuta nei primi anni '50, mentre l'ecatombe di specie ripicole o igrofile si spiega con l'inquinamento dei ruscelli e del Torrente Grande, fortemente colpiti dai reflui di acque bianche fino almeno agli anni '80. Fra i ripicoli scomparsi annoveriamo *Chlaenius velutinus, Thalassophilus longicornis, Pseudolimnaeum inustum*.

Sintetizzando brevemente quanto osservato nell'ultimo secolo di vita del Bosco Farneto, dobbiamo sottolineare che la comunità attuale deriva da almeno tre processi concomitanti ed interagenti fra loro: la perdita di habitat, intesa se non altro come profonda alterazione del microclima forestale dell'area boscata, che certamente ha portato ad un prosciugamento del suolo e dei rivi minori, con perdita di specie ripicole

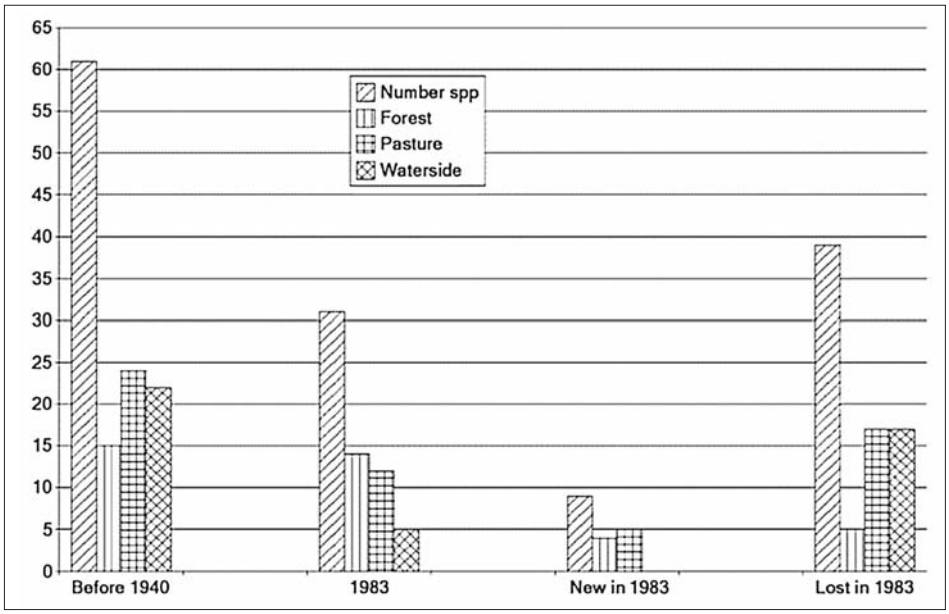



Fig. 3 – Da sinistra a destra: specie di Coleotteri Carabidi rinvenute nel Bosco Farneto prima del 1940, suddivise in forestali, di pascolo e igrofilo-ripicole, poi ritrovate o comunque raccolte nel 1983/84, nuove nelle raccolte 83/84, infine risultanti estinte nell'83/84. Da BRANDMAYR *et al.*, 2009.

e forestali. Queste in particolare hanno risentito anche dell'ablazione di tutto il soprassuolo ed in particolare delle querce più vetuste, con la conseguente scomparsa di elementi dendrofili. L'inquinamento delle acque ha poi provocato un'ulteriore scomparsa di specie ripicole, oggi numerose fra quelle estinte, ma anche la cessazione del pascolo si è fatta sentire dopo che la foresta ha ripreso il sopravvento su gran parte della superficie. Sembra infine che anche il cambiamento climatico, che nell'area del Triestino si rileva soprattutto come diminuzione delle precipitazioni annue, ma anche come forte innalzamento delle minime invernali, stia per dare il suo contributo negativo. Sono infatti oltre quindici anni che non si osserva un esemplare di *Carabus catenulatus* attivo dopo la pioggia, e non sono poche le specie di carabidi che risultano assenti malgrado i tentativi di raccolta diretta. Queste osservazioni sporadiche, ripetute annualmente ma ancora non confermate dall'uso di pitfalls, fanno pensare ad un futuro rischio di "sclerofillizzazione", cioè di impoverimento della comunità forestale, che si avvierebbe all'assetto tipico delle comunità del bioma delle sclerofille, che in tutto il Mediterraneo ed in particolare nell'alto Adriatico sono costituite da quattro o cinque specie al massimo (Brandmayr *et al.,* 1983). È quindi auspicabile che il Bosco Farneto, oggi designato come Sito di Importanza Nazionale (SIN IT3342014) nell'ambito del Programma Bioitaly promosso dal Ministero dell'Ambiente per la Rete Natura 2000, venga monitorato adeguatamente in futuro e gestito in modo da limitarne al massimo ulteriori perdite di biodiversità. Il Boschetto dei Triestini rappresenta un'occasione unica per seguire nel tempo le trasformazioni storiche della fauna ad opera dell'uomo in un bosco suburbano, che nel suo piccolo non è meno meritevole, anche per la sua valenza sociale, della Foresta di Fontainebleau per Parigi, o del Wienerwald per i Viennesi. Esso rappresenta anche uno dei punti storicamente più visitati da entomologi centro-europei, ad esempio nel 1818 i naturalisti Hoppe e Hornschuch vi raccolsero una nuova sottospecie di Carabide Lebiino, *Lamprias fulvicollis thoracica*.

## Estinzioni locali e cambiamento climatico

La disponibilità di numerosi censimenti annuali di comunità di Carabidi in habitat ben definiti dal punto di vista ecologico e fitosociologico (year samples) ci ha permesso negli ultimi 15 anni di ricampionare con accuratezza gli stessi siti nel tentativo di verificare l'entità e la natura dei cambiamenti verificatisi a distanza, mediamente, di trent'anni (Pizzolotto *et al*., 2010; Pizzolotto *et al*., 2014; Brandmayr e Pizzolotto, 2016). Le prime esperienze riguardano il Massiccio del Pollino, campionato nel 1977 in due faggete ed un pascolo mesofilo al Piano di Ruggio, siti poi ricampionati nel 2004. Il confronto fra le stesse comunità nella data più recente indicava un impatto diversificato a seconda della biomassa dell'ecosistema e della sua natura arborea o erbacea: l'alto fusto maturo di faggio (Asyneumati-Fagetum) mostrava solamente una lieve penetrazione di elementi termofili non rilevati nel 1977, ma manteneva nel tempo la medesima struttura di dominanza, testimone che le condizioni microclimatiche di fondo della foresta non erano cambiate. Fortissimo invece l'impatto del mutamento climatico nel pascolo a *Meum athamanticum* di Piano Ruggio, che vedeva la scomparsa di almeno quattro elementi mesofili o forestali, *Carabus violaceus picenus*, *Haptoderus apenninus, Percus bilineatus, Trichotichnus nitens* e la comparsa di specie provenienti dagli orizzonti bioclimatici inferiori, come alcune *Cymindis* e *Calathus fuscipes*. Per i pascoli si è potuto calcolare uno slittamento verso l'alto ("uphill shift") dell'ordine di 350-400 m, certamente condizionato dall'aumento delle temperature ma anche dal diminuire delle precipitazioni, andamento che abbiamo riportato in Scalercio *et al*. (2014). L'esperienza dell'Appennino Meridionale, per quanto basata su pochi siti, ci dice che gli ecosistemi forestali sembrano essere più resistenti al global warming, mentre quelli erbacei risentono più fortemente mostrando estinzione locale ed "uphill shift". Nel sottobosco della foresta però si osservano intrusioni di specie termofile, che sottendono un cambiamento "strisciante", denunciato con anticipo dagli insetti grazie alla loro maggiore mobilità e frequenza di generazioni.

È però nel settore delle Dolomiti di Fiemme che si sono ottenuti i dati più completi sugli effetti del cambiamento climatico, grazie anche all'appoggio dell'Amministrazione del Parco Regionale di Paneveggio e delle Pale di S. Martino. In quest'area, che gravita attorno all'importante limite biogeografico di Passo Rolle, le ricerche sul campo sono iniziate nel 1979/80, sempre nell'ambito del Progetto Finalizzato CNR "Promozione della Qualità dell'Ambiente". Vennero allora campionate, da oltre 20 zoologi, le comunità di Coleotteri Idroadefagi, Carabidi, Stafilinidi, Scarabeoidei coprofagi, Cerambicidi, Crisomelidi, Nitidulidi, Curculionidi, i Lepidotteri Ropaloceri, i Chilopodi ed i Nematodi dalle foreste montane sino alla prateria alpina, su un'estensione altitudinale di oltre 1300 metri (Brandmayr *ed.*, 1988). Le stazioni sono state riprese nel 2008/09 per i Coleotteri Carabidi, in un rigoroso approccio "time x time", evitando il compromesso più usuale, quello "space x time" solitamente preferito da chi campiona

comunità in relazione al cambiamento climatico. Anche se buona parte dei dati sono ancora in elaborazione, focalizzando sugli habitat sopra e sotto la linea degli alberi nei dintorni di Passo Rolle, soglia climatica critica, si osservano i cambiamenti che seguono (PIZZOLOTTO *et al.,* 2014). Le praterie alpine, situate presso Baita Segantini sotto il Cimon della Pala (2200-2250 m) mostrano estinzione di specie microterme (*Nebria germari*, declino di *Trechus dolomitanus*) ed aumento di predatori generici (*Carabus creutzeri* e *bertolinii*, *Nebria diaphana*, *Oreophilus morio*), scomparsa di specie igrofile. I pascoli tipici del Passo, i nardeti, derivanti dal disboscamento dei lariceti o delle distese di rododendro e pino mugo, sembrano aver sofferto soprattutto per il calo delle precipitazioni e denunciano con l'estinzione locale di molte specie igrofile un cambiamento che nella vegetazione ancora non si vede. Infine i siti forestali campionati, e specialmente quelli della Foresta di Paneveggio (Piceetum subalpinum) mostrano effetti ancora più sorprendenti del calo delle piogge, che si sono espressi in un cambiamento pedologico profondo, il passaggio da un suolo idromorfo ricco di sfagni ad uno più umifero e arieggiato, con un aumento vertiginoso della biomassa delle specie forestali, in particolare di *Oreophilus jurinei*. Limitandoci rigorosamente agli habitat già elaborati, a fronte delle 32 specie raccolte nel 1979/80, nel 2008/9 ne sono comparse solo 27, e ben 9 del passato non sono ricomparse, a fronte di 4 nuovi arrivi, fra i quali *Carabus auronitens*, certamente risalito dagli orizzonti inferiori. Mancano all'appello, oltre a *Nebria germari*, molte specie igrofile dei pascoli e specie microterme al loro limite meridionale di areale, come *Patrobus septemtrionis*.

Fra le specie di Passo Rolle mancanti all'appello già nel 1979 spicca una di particolare importanza, *Leistus punctatissimus* Breit 1914. Scoperto nel 1902 da Anton Otto, venne descritto sulla base di un esemplare femmina, descrizione poi completata da ASSMANN e HEINE (1993) grazie ad un esemplare maschio trovato nel Deutsches Entomologisches Institut di Eberswalde. La specie era ritenuta estinta o forse di grande specializzazione ecologica, ma l'estinzione locale di *Nebria germari*, documentata nel 2008/9 per le praterie alpine sotto il Cimon della Pala ci ha suggerito una terza ipotesi, cioè che *L. punctatissimus* fosse ancora rappresentato da popolazioni vitali sull'altipiano delle Pale di S. Martino, un vastissimo altipiano carsico situato fra i 2500-2700 fra quelle montagne. Una ricognizione in sei stazioni a diverse altitudini ci ha permesso la cattura di tre esemplari del comunque rarissimo endemite, sfatando in questo caso l'idea di una possibile estinzione totale. La Fig. 4 rappresenta una possibile distribuzione geografica di *L. punctatissimus* durante l'ultimo acme glaciale, come "survi-

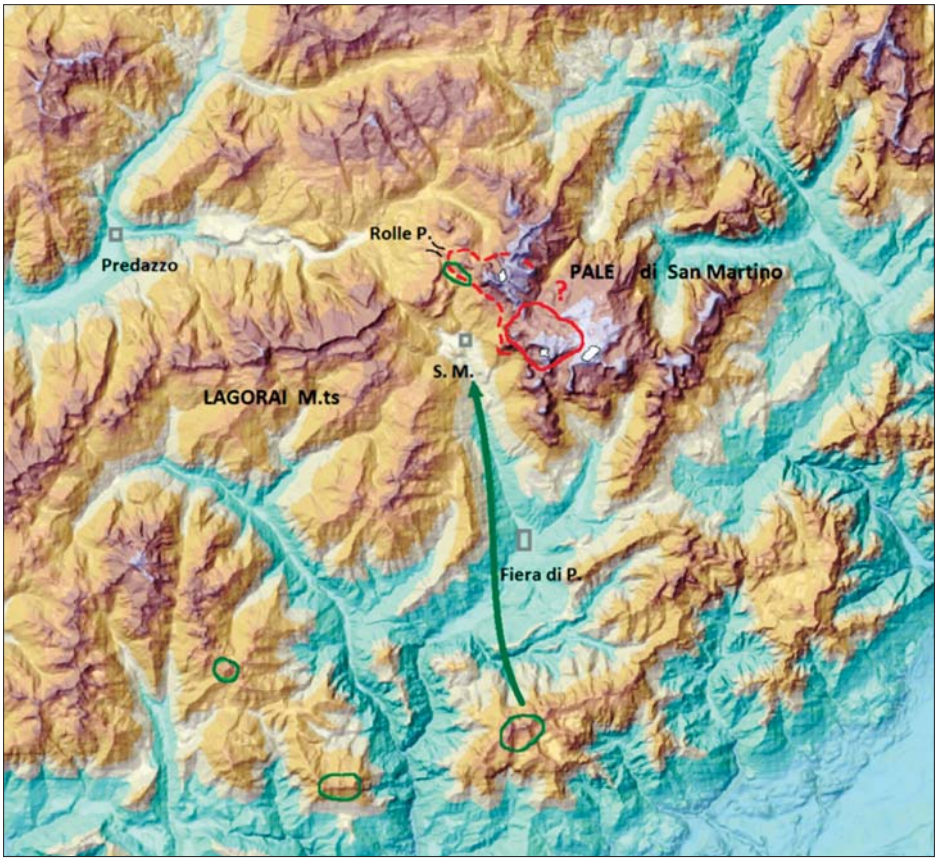



Fig. 4 – Topografia delle Dolomiti Bellunesi e del Trentino sudorientale con indicazione dei ghiacciai residui. Linea rossa continua: possibile areale attuale di *Leistus punctatissimus*, endemite sopravvissuto sul nunataq rappresentato dalle Pale di S. Martino. Linea rossa discontinua: presenza del *Leistus* nei dintorni di P.sso Rolle ai primi del 1900. Viene rappresentato, per confronto, l'areale attuale di *Duvalius breiti*, un reimmigrante a "breve distanza" (sensu Holdhaus), e la sua possibile via di reimmigrazione fino al P.sso Rolle (freccia verde). S. M.: San Martino di Castrozza. Da PIZZOLOTTO e BRANDMAYR (2018).

vor" legato al più esteso nunataq dell'area cadorino-trentino orientale, quello del gruppo delle Pale.

Le Dolomiti del Parco di Paneveggio e Pale di S. Martino rappresentano oggi un esempio ben documentato di quanto sia attivo il fenomeno dell'estinzione locale di popolazioni in seguito al global warming, e di come esso sia iniziato già agli albori del secolo scorso, come documenta appunto la scomparsa di *L. punctatissimus* a livello di P.sso Rolle, che è posto a 1980 m di altitudine.

## Le estinzioni a meso-scala

Si tratta di un fenomeno poco documentato a livello nazionale, mentre non mancano altrove studi accurati sul declino di popolazioni, anche a livello di intere nazioni europee, come ad esempio i Paesi Bassi (Desender e Turin, 1989). Le estinzioni a meso-scala sono certamente legate al progressivo accumularsi di quelle a micro-scala, come ci ricorda Lövei (2001): "stepping stones of global extinctions are local extinctions". Il fattore che funge da moltiplicatore sinergico è rappresentato dalla frammentazione dell'habitat, come sostenuto dalla maggioranza degli autori, ma nell'era industriale non è trascurabile l'apporto dell'inquinamento, ad esempio quello atmosferico causato da una centrale termoelettrica, che può interessare aree di centinaia di kmq. Qui presentiamo il risultato di oltre 50 anni di osservazioni e raccolte relative al complesso delle due Provincie di Trieste e Gorizia, la cui superficie in totale copre circa 680 kmq. Si tratta di un territorio molto variegato dal punto di vista ambientale, con un'ampia gamma di biotopi costieri, lagune, zone umide, fiumi, foreste e boscaglie carsiche, cavità sotterranee, il tutto concentrato in un piccolo spazio. Un accurato esame della letteratura "grigia", del Catalogo di Müller, di collezioni pubbliche o private e di vari lavori più recenti che non è qui possibile enumerare, assegnerebbe a questo territorio almeno 308 specie di Coleotteri Carabidi, Cicindelinae inclusi. Risultano estinte, al momento attuale, le specie elencate in Tab. 1.

Le 11 specie risultate estinte costituiscono il 3,6% della fauna complessiva delle due piccole provincie, un dato non trascurabile, anche se inferiore a quello di un'estinzione locale circoscritta ad un habitat, e dimostra che oggi si possono documentare estinzioni anche a meso-scala. È infine interessante notare come alcune delle specie estinte siano già incluse nella lista del Bosco Farneto, e che per la maggior parte si tratti di elementi legati a zone umide, certamente quelle oggi più impattate da una ormai dilagante alterazione. Molte delle specie estinte trovavano il loro habitat esclusivamente nelle paludi della Valle delle Noghere, situate fra le città di Trieste e Muggia, percorsa dal fiume Ospo, studiate da Schatzmayr (1912), fino agli anni 20-30 del secolo scorso un vero serbatoio di biodiversità di coleotteri igrofili ed alofili o alobionti, oggi quasi tutta ritombata e sede di una piccola zona industriale. Sono invece ancora in buone condizioni le paludi costiere del Monfalconese e dell'Isontino Goriziano, sede fra l'altro della Riserva Naturale della Foce dell'Isonzo (Brandmayr e Colombetta, 2014).

## Conclusioni

La estinzioni locali di popolazioni di coleotteri carabidi o di importanti frazioni delle loro comunità riguardano probabilmente gran parte del territorio italiano, ed interessano in varia misura zone umide e foreste planiziali e collinari, specialmente suburbane. Esse sono provocate essenzialmente da alterazione dell'habitat, eccesso di prelievo, dal cambiamento climatico e dall'inquinamento.

Alle altitudini minori le estinzioni interessano particolarmente le foreste, dove eventi catastrofici come il taglio raso possono agire sinergicamente con altri fattori e superare la capacità di resilienza a tal punto che anche la ricostruzione della foresta non riporta alla biodiversità originaria, ma solamente ad una parte di essa. Le perdite di biodiversità possono superare il 50% della fauna preesistente, se si considera la foresta come unità paesaggistica (caso del Bosco Farneto di Trieste).

Il cambiamento climatico agisce in modo subdolo, quasi impercettibile, nel caso di foreste ad alto fusto dotate di buona resistenza e grande biomassa (faggete appenniniche), il suo impatto è però molto maggiore nei pascoli ed in altre formazioni aperte (pascoli del Pollino).

In alta montagna (Dolomiti) le estinzioni locali risalgono probabilmente già ai primi decenni del secolo scorso, come dimostrato dal caso di *Leistus punctatissimus*, ma esse si sono accelerate moltissimo negli ultimi trent'anni, dopo il 1980, come dimostra la comparazione con le vecchie raccolte effettuate sulle Alpi nel primo novecento da vari AA., quali Holdhaus, Franz e molti altri.

A meso-scala le estinzioni ben documentate interessano una frazione minore della fauna nota, ma un bilancio più accurato si può ottenere solamente con studi e monitoraggi più rigorosi in una più vasta gamma di habitat, ad esempio concentrando le ricerche nei Siti di Importanza Comunitaria della Direttiva 92/43 Habitat, le attuali Zone Speciali di Conservazione (ZSC) ed in alcuni dei SIN più importanti.

Tab. 1 – Specie note delle Provincie di Trieste e Gorizia ma non più segnalate da almeno due decenni. Le popolazioni di quelle asteriscate sono state seguite da due degli AA. (PB e GC) sino alla loro estinzione, il dato è quindi particolarmente attendibile.

| SPECIE | Habitat | Data presunta di estinzione | Cause di estinzione |
|---|---|---|---|
| *Carabus nodulosus* Creutzer * | Ruscelli forestali | 1980 | Overcollecting |
| *Procerus gigas* Creutzer * | Foreste coll. e montane | <1990? | Declino precipitazioni |
| *Nebria psammodes* (P. Rossi)* | Ripicolo | 1980 | Alterazione habitat |
| *Chlaenius velutinus* (Duftschmid) * | Ripicolo | <2005 | Alterazione habitat |
| *Chlaenius festivus* (Panzer) | Ripicolo | <1970 | Alterazione habitat |
| *Chlaeniellus olivieri* (Crotch) | Ripicolo, a. lentiche | 1970 | Alterazione habitat |
| *Acinopus megacephalus* (P. Rossi) * | Suoli argill.-salsi | 1980 | Alterazione habitat |
| *Harpalus rumelicus* Apfelbeck | Suoli argill.-salsi | <1960 | Alterazione habitat |
| *Laemostenus venustus* (Dejean) | Querceti secolari | 1950 | Alterazione habitat |
| *Agonum sordidum* Dejean | Suoli argill.-umidi | 1950 | Alterazione habitat |
| *Zuphium olens* (P. Rossi) * | Suoli argill.-umidi | 1980 | Alterazione habitat |

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano quanti hanno contribuito ai dati sui quali si basano i calcoli presentati in questo lavoro ed il Parco Regionale di Paneveggio e delle Pale di S. Martino per il permesso di raccolta sull'altipiano delle Pale. Parte delle ricerche è stata finanziata dal M.I.U.R., Ministero per l'Università e la Ricerca Scientifica, PRIN 2009 - prot. 200947YRB9.

BIBLIOGRAFIA

ASSMANN T., HEINE S., 1993 – *Die* Leistus-*Arten der* Oreobius-*Gruppe: Systematik, Taxonomie und Verbreitung (Coleoptera, Carabidae: Nebriinae).* - Mitt. Ent. Ges. Basel, 43: 42-68.

BOER, P.J., DEN, 1977 – *Dispersal power and survival. Carabids in a cultivated countryside*. - Miscell. Pap. Landbouwhogesch. Wageningen, 14:1-90.

BRANDMAYR P., (*ed.*), 1988 – *Zoocenosi e paesaggio I. Le Dolomiti - Val di Fiemme e Pale di S. Martino*. Studi trent. Sci. nat. 64, Acta biol. suppl., pp. 482. Edito in occasione dell'Anno Europeo per l'Ambiente, Trento, Tipolitografia Temi.

BRANDMAYR P., COLOMBETTA G., 2014 – *Coleotteri Carabidi nella Riserva Naturale Foce Isonzo. Un dettagliato studio entomologico presso la Riserva. Co.Na.* Associazione per la Conservazione della Natura. http://www.associazionecona.it/articoli/105-coleotteri-carabidi-nella-rn-foce-isonzo.html

BRANDMAYR P., PIZZOLOTTO R., COLOMBETTA G., ZETTO T., 2009 – *In situ extinction of carabid beetles and community changes in a protected suburban forest during the past century: the ''Bosco Farneto'' near Trieste (Italy)*. - J. Insect Conserv., 13(2): 231-243. doi: 10.1007/s10841-008-9161-6.

BRANDMAYR P., PIZZOLOTTO R., 2016 – *Climate change and its impact on epigean and hypogean carabid beetles.* – Period. biol. 118 (3): 147-162. doi: 10.18054/pb.2016.118.3.4062.

BROOK B. W., SODHI N. S., BRADSHAW C. J. A., 2008 - *Synergies among extinction drivers under global change*. - Trends Ecol. Evolut., 23(8):453-460. doi:10.1016/j.tree.2008.03.011.

DESENDER K., TURIN H., 1989 - *Loss of habitats and changes in the composition of the ground- and tiger beetle fauna in four West-European countries since 1950 (Coleoptera: Carabidae, Cicindelidae).* - Biol. Conserv., 48(4): 277-294. http://dx.doi.org/10.1016/0006-3207(89)90103-1

HOLDHAUS K., 1954 – *Die Spuren der Eiszeit in der Tierwelt Europas*. Abh. zool.-bot. Ges. Wien, 18, pp. 493.

HOPPE D.H., HORNSCHUCH C.F., 1818 – *Tagebuch einer Botanischen Reise nach den Küsten des Adriatischen Meeres und den Gebirgen von Kärnten, Tirol und Salzburg*. Regensburg.

LÖVEI G., 2001 – *Extinctions, modern examples of*. In: Encyclopedia of Biodiversity, 2. Academic Press.

MÜLLER G., 1926 – *I Coleotteri della Venezia Giulia. Catalogo ragionato. - Parte I: Adephaga*. Tipografia Fratelli Mosettig, Trieste, pp. 304.

PIZZOLOTTO R., SAPIA M., ROTONDARO F., SCALERCIO S., BRANDMAYR P., 2010 – *A Georeferenced Biodiversity Databank for Evaluating the Impact of Climate Change in Southern Italy Mountains*. In: Körner Ch., Spehn E. M. eds. – Data mining for global trends in mountain biodiversity, pp. 137-147. CRC Press, Taylor & Francis, ISBN 978-1-4200-8369-9.

PIZZOLOTTO R., GOBBI M., BRANDMAYR P., 2014 – *Changes in ground beetle assemblages above and below the treeline of the Dolomites after almost thirty years (1980/2009)*. - Ecology and Evolution, 4(8): 1284-1294, doi: 10.1002/ece3.927.

SCALERCIO S., BONACCI T., MAZZEI A., PIZZOLOTTO R., BRANDMAYR P., 2014 – *Better up, worse down: bidirectional consequences of three decades of changes on a relict population of* Erebia cassioides. - J. Insect Conserv., 18(4): 643-650. doi: 10.1007/s10841-014-9669-x.

SCHATZMAYR A., 1912 – *Studi sulla fauna coleotterologica della Valle d'Ospo*. - Boll. soc. adr. sci. nat., 26(2): 145-158.

190 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 191-195*

# ESTINZIONI VERE O PRESUNTE IN AMBITO ENTOMOLOGICO IN CORSI D'ACQUA MONTANI E IN ALTRI AMBIENTI VULNERABILI

PAOLO AUDISIO[a]

[a] *Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "C. Darwin", Sapienza Università di Roma, via A. Borelli 50, I-00161 Roma, Italy.* e-mail: paolo.audisio@uniroma1.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018.

*Actual or presumed insects extinctions in mountain streams and other vulnerable habitats*

A short review of the uncommon phenomenon of insect extinctions, mainly focused on European species, is presented. Taxa more threatened by documented or possible extinction mainly include strictly endemic species associated with: middle altitude running waters, or with springs in small islands; low altitude relict wet habitats; low altitude large rivers; sandy habitats along seashores; hollow trees in relict primeval forests.

KEY WORDS: insect extinctions, vulnerable habitats, European fauna.

## INTRODUZIONE

Il fenomeno dell'estinzione in campo zoologico è tradizionalmente associato a più o meno carismatiche specie di Vertebrati con popolazioni di piccole dimensioni e di norma elevata taglia corporea, caratterizzate da basso tasso riproduttivo e lunghi tempi intergenerazionali, con elevata specializzazione trofica e legate ad habitat particolarmente vulnerabili, soggetti a minacce estreme perlopiù per cause antropiche. Molte di queste condizioni sono tipicamente antitetiche rispetto alla caratteristiche della maggior parte degli invertebrati e degli insetti in particolare, che sono in larghissima parte caratterizzati invece da popolazioni di grandi o comunque significative dimensioni, modestissima taglia corporea, elevato tasso riproduttivo e tempi intergenerazionali in media molto più brevi.

Malgrado queste considerazioni, l'estinzione di alcune specie in campo entomologico non è comunque un fenomeno sconosciuto, sebbene la possibilità di "certificare" queste estinzioni sia di norma alquanto remota. A causa di molteplici fattori intercorrelati quale l'elevata elusività, difficoltà di campionamento e osservazione, mancanza di informazioni complete sulla loro autoecologia e sul loro effettivo areale di dettaglio, le dimensioni effettive delle popolazioni e la distribuzione geografica misurabile su una scala ristretta sono in effetti difficilissime da definire per specie di insetti. Non è infatti un caso che nell'insieme delle liste rosse a scala regionale o globale la quasi totalità delle specie di insetti sia stata sinora valutata in termini di categorie di rischio IUCN utilizzando solo parametri di stima indiretta quali in particolare EOO (Extent Of Occurrence), AOO (Area of Occupancy), e numero di siti di raccolta recentemente censiti e confermati (NIETO e ALEXANDER, 2010; IUCN 2012a, 2012b; CARPANETO *et al.*, 2015).

Nel passato sono state quindi numerose le segnalazioni di possibili estinzioni di taxa in campo entomologico, anche su scala europea e italiana, non suffragate da prove certe e documentate, che sono poi state clamorosamente smentite da nuovi dati desunti da analisi e monitoraggi più estesi e più approfonditi. Solo per citare qualche caso ben noto tra alcuni insetti particolarmente vistosi ed emblematici, la presunta estinzione dopo la metà del secolo scorso dei due grandi coleotteri carabidi *Carabus cavernosus variolatus* nell'Appennino centrale e quella *di C. olympiae* nelle Prealpi Biellesi, smentite da dati di anni successivi (CASALE *et al*., 1982; NEGRO *et al.,* 2008; TRIZZINO *et al.,* 2013a), che ne hanno invece dimostrato la continuità di presenza sia nelle località storiche, sia in nuovi siti precedentemente poco esplorati o inattesi. Discorso analogo vale anche per numerosi elementi cavernicoli troglobi e iperspecializzati, in precedenza ritenuti endemici di singole e molto limitate cavità carsiche, in realtà dimostratisi in seguito spesso ben più ampiamente diffusi nel MSS (Milieu Souterrain Superficiel) e nelle fratture profonde del suolo di contigue aree carsiche, molto più difficilmente accessibili alle attività dirette di ricerca da parte degli entomologi. Anche la mancanza di informazioni sull'autoecologia di dettaglio o sulla fenologia di taxa molto specializzati come fitofagi, microfagi acquatici o insetti del suolo ha spesso con-

– Pubblicato marzo 2019

tribuito ad alimentare e supportare valutazioni di presunte estinzioni, smentite in seguito dalla scoperta, spesso occasionale, delle precise esigenze trofiche e di microhabitat di alcune di esse.

Si veda su questo tema, ad esempio, la recente riscoperta del misterioso coleottero Nitidulide *Brassicogethes salvan* nelle Alpi Marittime italiane dopo più di un secolo (Liu *et al.,* 2019), dopo che ne era stata ipotizzata la probabile estinzione (Fontaine *et al*., 2007). Anche la mancanza di reperti successivi della ormai mitica *Crowsoniella relicta*, l'unico coleottero Arcostemato autoctono europeo (Pace, 1975; Carpaneto *et al.*, 2015), è probabile che possa essere legata solo all'assenza di conoscenze di base di questo stesso tipo.

Altri fattori che possono indurre sospetti di possibili estinzioni in molti invertebrati sono anche gli andamenti ciclici della crescita o decrescita delle popolazioni di alcune specie rare e dall'ecologia particolarmente delicata, spesso in funzione dell'andamento di alcuni parametri climatici ed ecosistemici solo in parte studiati e conosciuti. Caso emblematico è ad esempio la a lungo sospettata estinzione su scala italiana del raro coleottero saproxilico predatore *Cucujus cinnaberinus* (oltre tutto specie in DH), ritrovato recentemente con popolazioni relativamente abbondanti nelle stesse aree dell'Italia meridionale dove era stato in precedenza segnalato, a seguito sia dell'aumento delle locali precipitazioni medie, sia di monitoraggi specializzati (Mazzei *et al.,* 2011; Carpaneto *et al.*, 2015). Per ultimo, alcune specie verosimilmente molto rare e con areali potenzialmente puntiformi, non più ritrovate dopo la descrizione, possono anche essere state coinvolte in errori nell'identificazione o nel posizionamento della località-tipo che ne precludono il ritrovamento.

Alcune specie o sottospecie di insetti sembrano peraltro effettivamente essersi estinte, anche a scala europea ed italiana; in questo breve articolo di sintesi fornirò quindi qualche esempio, tentando di focalizzare l'attenzione soprattutto sui tratti (eto-ecologici, trofici, dimensionali, zoogeografici, ecc.) che sembrano comuni tra le poche specie di cui sembrerebbe effettivamente documentata l'estinzione.

## Discussione

Su base teorica, alle specie di insetti che più facilmente potrebbero essere soggette ad estinzioni locali o globali si potrebbero associare cumulativamente queste caratteristiche generali: estrema specializzazione ed irripetibilità degli habitat da cui dipendano (es. associate a singole e isolate sorgenti reocreniche, a piccole sorgenti termali sulfuree, a legno spiaggiato in aree costiere sabbiose relitte, ad aree cacuminali di montagne isolate, ecc.); elevata specializzazione trofica (es. fitofagi associati a singole e rare specie di piante ospiti, che le abbiano condotte in potenziali *culs de sac* evolutivi); sensibilità elevata alle perturbazioni antropiche (quindi con alto livello di bioindicazione; es. specie molto sensibili alla presenza di fitochimici ambientali, di sostanze inquinanti nelle acque, ecc.); endemizzazione estrema (es., specie note esclusivamente su singole piccole isole, gruppi montuosi isolati, ecc.); elevata frammentazione dell'habitat esclusivo, con scarsa o nulla interconnettività; evidente predisposizione dell'habitat di elezione al disturbo antropico (es. sorgenti e ruscelli in aree con scarsità di acque potabili e quindi facilmente soggette a captazioni idriche; zone umide relitte di pianura facilmente soggette a bonifiche o interramenti; tratti di potamon di grandi fiumi di pianura ormai inquinati; alberi vetusti in zone ad elevata frequentazione antropica, facilmente esposti ad abbattimenti per motivi di sicurezza); naturale rarità per cause ignote (specie con piccolissime e frammentate popolazioni conosciute); insularità (effettiva e/o ecologica) delle popolazioni note; particolarmente esposte a predazione e/o competizione da parte di specie aliene invasive; particolarmente esposte ai fenomeni di *Climate Change* (ad esempio specie di pascoli montani di alta quota, o specie dulciacquicole associate a piccoli ruscelli con acque fredde ed ossigenate di medie quote); che manifestano atterismo e microtterismo, o scarsa vagilità; predisposte al prelievo antropico per cause contingenti (es., specie vistose e di facile individuazione ai fini collezionistici, o di interesse commerciale). Fatali combinazioni di due o più delle condizioni sopra riportate sono ovviamente in grado di amplificare di molto i rischi e le minacce che interessano ciascuna specie.

Nell'ambito delle circa 90.000 specie di insetti note nella sola fauna europea in senso lato (Fontaine *et al.,* 2012), e di fronte ad una media di poco meno di 600 nuove specie che vengono descritte ogni anno in Europa, si possono d'altra parte elencare meno di una decina di specie la cui estinzione globale sia da considerare sufficientemente documentata (Fontaine *et al.,* 2007), alcune delle quali in realtà ritrovate in anni successivi. Su scala mondiale la IUCN ne certifica d'altra parte al 2016 appena una sessantina, in grande maggioranza endemite di complessi insulari, con una certa prevalenza di Lepidotteri a volo notturno, di Ortotteroidei e di insetti acquatici. Non vi è quindi dubbio che gli eventi di estinzioni globali di insetti siano in generale da considerare abbastanza eccezionali. Molto più frequenti sono ovviamente le segnalazioni di estinzioni (peraltro quasi sempre solo presunte) su scala locale di taxa più ampiamente distribuiti altrove. Vediamo alcuni casi di estinzioni globali di specie europee, tra quelli meglio esplorati e più attendibili:

*Hydraena* ("*Haenydra*") *sappho* (Coleoptera, Hydraenidae):
Isola di Lefkas, Grecia occidentale.

Descritta sulla base di un singolo maschio raccolto negli anni '60 del secolo scorso in un modesto ruscello montano alimentato da una singola sorgente presente in un piccolo *enclave* litologico cristallino, in un contesto insulare quasi esclusivamente carbonatico (Janssen, 1965), questo taxon è scomparso a seguito della successiva totale captazione della sorgente stessa per finalità di usi civili. La specie, che rappresentava oltre tutto un elemento relittuale di grande interesse filogenetico e zoogeografico (Trizzino *et al.*, 2013b), non è in effetti mai più stata ritrovata dopo la descrizione né a Lefkas, né in innumerevoli altre località della Grecia occidentale dove è stata invano ricercata più volte da molti ricercatori diversi (Fontaine *et al.,* 2007).

*Hydraena* ("*Haenydra*") sp. cfr. *gracilis* (Coleoptera, Hydraenidae):
Fosso di Arcidosso, Monte Amiata, Italia centrale.

Citata sulla base di due femmine raccolte negli anni '50 del secolo scorso (Chiesa, 1959), in un modesto ruscello montano alimentato da una singola sorgente in un *enclave* litologico carbonatico presente in un contesto prevalentemente vulcanico. Come nel caso precedente, il ruscello è stato in seguito completamente captato per alimentare l'acquedotto di Siena, e la specie, probabilmente elemento endemico con possibili affinità con altri paleoendemiti dell'Italia centrale (*H. samnitica* dell'Appennino abruzzese; *H. pangei* della Grecia settentrionale), non è mai più stata ritrovata né nell'area, né altrove (Trizzino *et al.*, 2013b; Audisio et Scapigliati, dati inediti).

*Alosimus tyrrhenicus* (Coleoptera, Meloidae).

Descritta di una località del Lazio sui colli Albani e di una subcostiera nei dintorni di Pisa in Toscana, sulla base di una piccolissima serie di individui raccolti agli inizi del '900 (Bologna, 1989). Questa misteriosa e vistosa specie relitta, membro di un piccolo gruppo di specie a gravitazione maghrebina, di probabile differenziamento nel tardo Miocene, non è mai stata ritrovata, ed è ormai considerata estinta (Bologna *et al.*, 2008). Biologia del tutto sconosciuta, ma verosimilmente con stadi larvali parassiti di nidi di piccoli Apoidei.

*Carabus clatratus antonellii* (Coleoptera, Carabidae): Italia peninsulare.

Sottospecie endemica italiana di taxon ad ampia distribuzione dall'Europa occidentale alla Siberia (Casale *et al*., 1982). Associata a stagni, paludi e laghi di pianura in contesti di buona qualità ambientale; predatrice di invertebrati e piccoli vertebrati acquatici. Virtualmente scomparsa in Italia ormai da circa un decennio, dopo un forte recente declino delle poche popolazioni sopravvissute tra Toscana e Lombardia, a causa in particolare dell'arrivo in Italia del Decapode alieno invasivo *Procambarus clarkii* (Gambero rosso della Luisiana), predatore soprattutto degli stadi larvali della specie.

Una mezza dozzina di specie di Plecotteri europei, tra cui anche diverse entità endemiche di aree montane e submontane dell'Italia meridionale (Fochetti e Tierno De Figueroa, 2008), non risultano inoltre essere state più ritrovate da molti decenni, e potrebbero effettivamente risultare estinte. Trattandosi peraltro di entità scarsamente monitorate e ricercate in tempi recenti con tecniche specializzate e finalizzate all'identificazione tassonomica, il loro effettivo stato di conservazione è da considerare in quasi tutti i casi a livello di DD (Data Deficient). Anche questi taxa contribuiscono peraltro alla netta percezione che le comunità reofile montane di insetti siano globalmente tra quelle maggiormente minacciate, soprattutto in molti paesi dell'Europa meridionale.

Sulla base di queste evidenze, risulta piuttosto chiaro come gli ambienti dei piccoli corsi d'acqua montani (Trizzino *et al.,* 2015) e quelli delle zone umide, delle sorgenti e dei tratti di *potamon* dei grandi fiumi di pianura sono quelli che hanno la maggiore probabilità di essere distrutti insieme con le loro eventuali specie endemiche.

Molte altre sono peraltro le specie esposte ad effettive estinzioni. Ad esempio, tra le circa 2050 specie di Coleotteri saproxilici italiani elencati recentemente da Carpaneto *et al.* (2015), almeno 85 (4.5 %) sono in categoria CR (Critically Endangered), e 2 (*Pediacus fuscus* e *Derodontus macularis*) sono in categoria PE (Probabilmente Estinte in Italia). Tra quelle più fortemente minacciate vogliamo ricordare almeno *Osmoderma cristinae* e *Gnorimus decempunctatus,* entrambe endemiche della Sicilia settentrionale, associate ad alberi vetusti di latifoglie, in aree boschive di elevata qualità ambientale e saproxilofaghe all'interno di cavità arboree. Sono infatti entrambe a forte rischio di estinzione totale, a causa dell'areale ristretto, della continua riduzione, frammentazione e scomparsa degli habitat idonei, della predazione da parte di uccelli recentemente invasivi e del disturbo antropico e prelievo illegale di individui per fini collezionistici. Anche l'entomofauna saproxilica endemica legata agli alberi vetusti e alle foreste vetuste è infatti una di quelle maggiormente minacciate su scala europea.

Molte altre tra le specie più vulnerabili sono invece associate ad habitat sabbiosi litoranei, analogamente minacciati da distruzione per cambiamento di uso del suolo, frammentazione o disturbo antropico più generale; pensiamo, solo tra le specie italiane, ad

entità quali altri due coleotteri Scarabeoidei coprofagi, come *Ceratophius rossii* ed *Heptaulacus rasettii*, entrambe endemiche di una ristretta fascia della costa toscana, e svariati Ortotteroidei sabulicoli costieri dell'Italia meridionale e della Sicilia.

Non poche le specie fortemente minacciate anche tra quelle legate ad ambienti umidi (stagni, paludi, torbiere) di pianura, in sempre più forte e apparentemente incontrollabile riduzione, tra cui soprattutto molti coleotteri, lepidotteri e ortotteri fitofagi, odonati e rappresentanti di diversi altri ordini, per i quali tutti sarebbe urgente ed opportuna, almeno su scala italiana, la redazione di apposite liste rosse (tra i gruppi citati al momento è disponibile solo quella per gli Odonati).

## Conclusioni

L'estinzione documentata totale di una specie o sottospecie di insetti è per il momento un evento fortunatamente ancora raro e interessa soprattutto, in ordine decrescente di probabilità, i taxa endemici di aree ristrette con queste caratteristiche:

– associati a piccoli corsi d'acqua montani alimentati da modeste sorgenti, in aree con scarsità di acqua (quindi sotto maggiore pressione antropica), soprattutto nelle isole o in montagne isolate;
– associati come predatori o microfagi acquatici ai tratti di *potamon* di grandi fiumi di pianura sotto elevata pressione antropica;
– associati come predatori, fitofagi specializzati, saprofagi o xilofagi o parassiti, ad aree sabbiose costiere sotto elevata pressione antropica;
– associati come saproxilofagi a foreste e alberi vetusti;
– associati come predatori o fitofagi specializzati a zone umide di pianura sotto elevata pressione antropica;
– associati come predatori o fitofagi specializzati a praterie xeriche e magredi in aree montane sotto elevata pressione antropica e particolarmente esposte ai cambiamenti climatici.

Non vi è peraltro dubbio che fenomeni generalizzati quali il *Climate Change*, la continua introduzione di specie aliene invasive, la distruzione e frammentazione degli habitat naturali, e il crescente disturbo antropico possano rendere il quadro generale su scala europea molto più preoccupante, probabilmente nell'arco di pochi decenni.

## BIBLIOGRAFIA


Bologna M.A., 1989 – *Un nuovo* Alosimus *del litorale tirrenico e note tassonomiche su altre specie congeneriche nordafricane (Coleoptera, Meloidae)*. - Fragmenta entomologica, 21 (2): 191-204.

Bologna M.A., Di Giulio A., Pitzalis M., 2008 – *Examples of disjunct distributions between Mediterranean and southem oreastem Africa in Meloidae (Coleoptera, Tenebrionoidea).* - Biogeographia, 29: 81-98.

Carpaneto G.M., Baviera C., Biscaccianti A.B., Brandmayr P., Mazzei A., Mason F., Battistoni A., Teofili C., Rondinini C., Fattorini S., Audisio P. (eds), 2015 – *A Red List of Italian Saproxylic Beetles: taxonomic overview, ecological features and conservation issues (Coleoptera)*. - Fragmenta entomologica, 47 (2): 53-126.

Casale A., Sturani M., Vigna Taglianti A., 1982 – *Coleoptera Carabidae. I. Introduzione, Paussinae, Carabinae*. - Fauna d'Italia, XVIII. Bologna, Edizioni Calderini, 499 pp.

Chiesa A., 1959 – *Hydrophylidae Europae. Coleoptera Palpicornia*. Arnaldo Forni Editore, Bologna, 198 pp.

Fochetti R., Tierno De Figueroa M., 2008 – Fauna d'Italia, vol. XLIII - Calderini ed., Milano, 339 pp.

Fontaine,B., Bouchet P., Van Achterberg K., Alonso-Zarazaga M.A, Araujo R., Aspöck U., Audisio P., Aukema B., Bailly N., Balsamo M., Bank R.A., Barnard P., Belfiore C., Bogdanowicz W., Bongers T., Boxshall G., Burckhardt D., Camicas J.L., Chylarecki P., Crucitti P., Deharveng L., Dubois A., Enghoff H., Faubel, A., Fochetti, R., Gargominy, O., Gibson, D., Gibson, R., Gómez López, M.S., Goujet, D., Harvey, M.S., Heller K.G., Van Helsdingen P., Hoch H., De Jong H., De Jong Y., Karsholt O, S.J., Mendes L.F., Mey E., Michelsen V., Minelli A., Nielsen C., Nieto Nafría J.M., Van Nieukerken E., Noyes J., Pape T., Pohl H., De Prins W., Ricci C., Roselaar C., Rota E., Schmidt-Rhaesa A., Segers H., Zur Strassen R., Szeptycki A., Thibaud J.M., Thomas A., Timm T., Van Tol J., Vervoort W., Willmann R., 2007 – *The European Union's 2010 target: putting rare species in focus*. - Biological Conservation, 139: 167-185.

Fontaine B., Van Achterberg K., Alonso-Zarazaga M.A., Araujo R., Aspöck H., Aspöck U., Audisio P., Aukema B., Bailly N., Balsamo M., Bank R.A., Belfiore C., Bogdanowicz W., Boxshall G., Burckhardt D., Deharveng L., Dubois A, Enghoff H., Fochetti R., Fontaine C., Gargominy O., Gomez Lopez M.S., Goujet D., Harvey M.S., Heller K.-G., Van Helsdingen P., Hoch H., De Jong Y., Karsholt O., Los W., Magowski W., Massard J.A., Mcinnes S.J., Mendes L.F., Mey E, Michelsen V., Minelli A., Nieto Nafria J.M., Van Nieukerken E.J., Pape T., De Prins W., Ramos M., Ricci C., Roselaar C., Rota E., Segers H., Timm T., Van Tol J., Bouchet P., 2012 – *New Species in the Old World: Europe as a Frontier in Biodiversity Exploration, a Test Bed for 21st century Taxonomy.* - PLOS Biology, 7(5): e36881. doi: 10.1371/journal.pone.0036881.

IUCN 2012a – *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition.* – Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN.

IUCN 2012b – *Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional and National Levels. Version 4.0.* IUCN Species Survival Commission. - Gland: IUCN.

Janssens E., 1965 – *Les* Hydraena *de l'Égeide*. - Memoiries de l'Académie royale de Belgique. Classes de Sciences. Deuxième série, 16 (4): 1-126.

Liu M., Sabatelli S., Mancini E., Trizzino M., Huang M., Cline A.R., Audisio P. 2019 – *Rediscovery of* Brassicogethes salvan *(Coleoptera: Nitidulidae, Meligethinae) in the southwestern Alps.* - Insect

Conservation and Diversity, 12: 80-87. doi: 10.1111/icad.12317

Mazzei A., Bonacci T., Contarini E., Zetto T., Brandmayr P. 2011 – *Rediscovering of the "umbrella species" candidate* Cucujus cinnaberinus *(Scopoli, 1763) in Southern Italy (Coleoptera Cucujidae)*. - Italian Journal of Zoology, 78(2): 264-270.

Negro M., Casale A., Migliore L., Palestrini C., Rolando A., 2008 – *Habitat use and movement patterns in the endangered ground beetle species,* Carabus olympiae (*Coleoptera: Carabidae).* - *European Journal of Entomology*, 105: 105-112.

Nieto A., Alexander K.N.A., 2010 – *European Red List of Saproxylic Beetles.* Luxembourg: Publications Office of the European Union, 54 pp.

Pace R., 1975 – *An exceptional endogeous beetle*: Crowsoniella relicta *n. gen. n. sp. of Archostemata Tetraphaleridae from central Italy.* - Bollettino del Museo Civico di Storia Naturale di Verona, 2: 445-458.

Trizzino M., Audisio P**.**, Bisi F., Bottacci A, Campanaro A., Carpaneto G. M., Hardersen S., Mason F., Nardi G., Preatoni D., Vigna Taglianti A., Zilli A., Cerretti P., 2013 – *Gli artropodi italiani in Direttiva Habitat: biologia, ecologia, riconoscimento e monitoraggio.* MiPAAF – Corpo Forestale dello Stato, Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale "Bosco Fontana" di Verona. *Conservazione Habitat Invertebrati*, 7, 255 pp., Cierre Edizioni, Verona.

Trizzino M., Carnevali L., De Felici S., Audisio P., 2013 – *A revision of* Hydraena *species of the "*Haenydra*" lineage (Coleoptera, Hydraenidae)* - Zootaxa, 3607 (1): 1-173.

Trizzino M., Bisi F., Maiorano L., Martinoli A., Petitta M., Preatoni D.G., Audisio P., 2015 - *Mapping biodiversity hotspots and conservation priorities for the Euro-Mediterranean headwater ecosystems, as inferred from diversity and distribution of a water beetle lineage*. - Biodiversity and Conservation, 24: 149-170.

196 - Pagina bianca

Atti Accademia Nazionale
Italiana di Entomologia
*Anno LXVI, 2018: 197-205*

# ENTOMOLOGIA URBANA ED ESTINZIONI

MARZIO ZAPPAROLI[a]

[a] *Dipartimento per la Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (CIBAF), Università degli Studi della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo;* e-mail: zapparol@unitus.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Estinzioni globali ed estinzioni locali". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2018

## *Urban Entomology and extinctions*

Urban Entomology can be understood as that branch of Applied Entomology that studies arthropods that cause problems to humans in urban areas. These studies are aimed at understanding the biology and ecology of these organisms to develop ecologically sustainable control programs. However, the interest for arthropods in urban areas goes beyond these applicative aspects and also extends to faunistic, ecology and nature conservation aspects. In Italy, the best known city from this point of view is Rome, whose entomological fauna has been investigated since the first half of the nineteenth century. According to a summary published in 1997, 5,200 species of insects (26 orders, 356 families) have been reported in this territory. This study stimulated the start of other entomological studies that provided a key to understand the complexity of the local entomological fauna, of the anthropogenic transformations of the territory and of the consequences these have had on local biodiversity. Data on the consistency of insect populations in Rome are absent. The only case that can be remembered is that of the meloid beetle *Mylabris variabilis*, whose rarefaction in the Campagna Romana is related to the change in agricultural practices. Another factor of reduction of insect populations can be represented by the predation by opportunistic birds, more and more numerous in the city. Nowadays, species of insects that were once widespread show today a relict microdistribution, being present only in the remains of the Campagna Romana between the built-up areas or in the historic villas. Some species have conservation interest being included in national Red Lists, in "Habitat" Directive and Berne Convention (*Coenagrion mercuriale, Osmoderma eremita, Cerambyx cerdo, Eriogastes catax, Proserpine proserpinus, Melanargia arge, Zerynthia cassandra*). Particular attention should be paid to the presence of saproxylic species in urban parks, which can create situations of conflict in the case of collapses of trees attacked by these insects. Although extinction peaks are related to the urbanization of the territory, especially since the 1950s, studies on this phenomenon in Rome have highlighted different patterns according to taxonomic groups, based on the ecology and the tolerance degree of the species. The most sensitive, specialized and with less dispersal capacity are those species that first disappeared. Habitat alteration and spatial isolation of populations appear to be the most important causes of extinction. The Municipal Administration of Rome has developed an "Ecological Network" for the drafting of the New Town Planning Plan, in order to preserve the environmental and biodiversity values of its territory. However, it is considered that the administrative tools are not sufficient to guarantee the protection of these values. In addition to specific solutions, it is necessary to support scientific research, strengthen the synergy between administrators and the scientific community and give space to a greater sensitivity to the concept that scientific culture can add value to everyone's daily life.

KEY WORDS: Rome, Italy, insects, nature conservation, urban areas.

## INTRODUZIONE: PER UNA DEFINIZIONE DELL'ENTOMOLOGIA URBANA

A partire dagli anni '50 del 900, specialmente in Europa e negli Stati Uniti sono stati condotti numerosi studi su insetti ed altri artropodi nelle aree urbane, essenzialmente inquadrati all'interno di due ambiti scientifici fondamentali, uno di carattere applicativo (es., su artropodi di interesse sanitario, insetti fitofagi e altri insetti infestanti), l'altro di carattere faunistico-ecologico (con studi svolti in varie città), entrambi spesso sviluppati nel quadro di più ampie indagini sulla ecologia delle aree urbane (DAVIS e GLICK, 1978; REBELE, 1994; GASTON, 2010).

Tali tematiche sono state sviluppate anche in Italia e la tradizione su questo tipo di indagini è piuttosto lunga. Già nel 1917, infatti, Antonio Berlese (1863-1927) pubblicava per i tipi della Hoepli un manualetto dal titolo "*Insetti delle case e dell'Uomo e delle malattie che diffondono*", con il significativo sottotitolo "*con particolare riguardo al modo di difendersene nelle città, nelle campagne, al fronte*", da cui si evince, oltre che la collocazione tematica e l'ambito ecologico, anche la drammatica vicenda storica in cui l'Italia era all'epoca coinvolta, la Grande Guerra (1914 -1918).

A questo contributo sono seguiti poi numerosi altri studi e monografie, per lo più di impostazione applicativa, tanto di carattere scientifico, quanto di natura tecnica o divulgativa (si veda, ad esempio, AA. VV., 1985; DOMENICHINI e CROVETTI, 1989; SÜSS, 1990; TREMATERRA e SÜSS, 2007; TREMATERRA, 2016 e, per una sintesi aggiornata fino alla fine degli anni Novanta, ZAPPAROLI, 1997a, 1997b).

Definire l'Entomologia urbana non è facile e il suo

– Pubblicato marzo 2019

campo di indagine è potenzialmente molto ampio. In base alla consistente tradizione anglosassone degli anni settanta del Novecento (vedi ad es., Ebeling, 1978, Frankie e Ehler, 1978; Frankie e Koehler, 1978, 1983; Robinson, 1996, 2005), successivamente ripresa anche in Italia (vedi ad es., Domenichini e Crovetti, 1989; Süss, 1990; Trematerra e Süss, 2007; Trematerra, 2016), essa può essere intesa come quella branca dell'Entomologia applicata che studia gli artropodi – con particolare riguardo a blattari, isotteri, psocotteri, anopluri, omotteri, coleotteri, sifonatteri, ditteri, lepidotteri, imenotteri, oltre che ad acari, altri aracnidi e miriapodi – che interagiscono con l'uomo nelle aree urbane, soprattutto in ambienti residenziali, ricreativi, museali, industriali, commerciali, sanitari, scolastici, ecc., pubblici e privati, e inducono problemi specialmente in campo agrario, forestale, igienico-sanitario, fino alla industria agro-alimentare e alla conservazione dei beni culturali e delle collezioni scientifiche, al fine comprenderne la biologia e l'ecologia, per elaborare programmi di gestione e controllo economicamente sostenibili e rispettosi dell'ambiente.

Tuttavia, oltre ad avere rilevanza applicativa e forte impatto sociale (ad es., come fonte di ossessioni e di fobie, vedi Olkowski e Olkowski, 1976; Cavell, 2018), gli artropodi nelle aree urbane, e gli insetti in particolare, presentano anche altri motivi di interesse. Nei contesti fortemente antropizzati, soprattutto nell'ambito di ambienti seminaturali residui adiacenti agli abitati, nelle aree metropolitane, ad esempio lungo le rive fluviali, nelle aree agricole, nei parchi, nelle ville storiche, nei contesti archeologici, essi rappresentano sempre il nucleo principale della biodiversità (e.g., Zapparoli, 1997a, 1997b; Savard *et al*., 2000; Vigna Taglianti, 2001; Lin *et al*., 2015; Heino *et al*., 2017), dominano le catene e le reti alimentari per biomassa e numero (Scanlon e Petit, 2008), sono fondamentali in numerosi Servizi Ecosistemici (e.g., Schwarz *et al*., 2017; Baldock *et al*., 2015) e, poiché rispondono rapidamente ai cambiamenti ambientali causati dall'uomo, possono essere anche qui utilizzati come indicatori ambientali (e.g., Chown *et al*., 2001; Zhang *et al*., 2009; Santorufo *et al.*, 2012; Júnior *et al.*, 2015).

L'interesse di questi organismi nelle aree urbane va quindi oltre gli aspetti applicativi tradizionali, pur importanti, e si estende anche ad ambiti come l'ecologia, la biogeografia, la faunistica, nonché alla conservazione, tematiche sulle quali esiste oramai una vasta letteratura (e.g., Gibb e Hochuli, 2002; Hunter e Hunter, 2008; Connor *et al.*, 2010; Carpaneto *et al*., 2010).

Il fenomeno della rarefazione e della estinzione degli insetti nelle aree urbane è stato ancora poco indagato e si riferisce soprattutto a coleotteri, ditteri, lepidotteri e imenotteri (e.g., Connor *et al*., 2002; New e Sands, 2002; Fattorini, 2011a, 2011b; Bonebrake e Cooper, 2014). Scopo di questa nota è quello di fornire una parziale sintesi di quanto sinora noto sul fenomeno della rarefazione e della estinzione degli insetti nell'area urbana di Roma, città la cui biodiversità è ben conosciuta e per la quale si dispone oramai di un'ampia letteratura.

## Gli insetti di Roma

La fauna entomologica dell'area romana è stata oggetto d'indagine sin dalla prima metà del XIX secolo. La letteratura scientifica italiana e straniera contiene infatti numerose segnalazioni di insetti ed altri artropodi raccolti nel territorio urbano e suburbano della città. Tra le personalità scientifiche che hanno dato avvio a tali studi, si può ricordare quella di Antonio Carruccio (1837-1923), direttore dell'Istituto e Museo Zoologico della Regia Università di Roma tra il 1883 e il 1914, il quale può essere considerato il fondatore della ricerca zoologica in generale, e di quella entomologica in particolare, a Roma (Vigna Taglianti, 1980).

Nel 1997 è stata pubblicata una sintesi di oltre 350 pagine che raccoglie in modo organico gran parte dei dati spaziali e temporali al momento disponibili, a cui hanno partecipato 97 autori, italiani e stranieri (Zapparoli, 1997a). In base a questo studio, dalla prima metà del XIX secolo alla fine degli anni '90 del Novecento, nel territorio del Comune di Roma compreso all'interno del Grande Raccordo Anulare (GRA, circa 360 kmq) sono state segnalate circa 5.200 specie riferibili a 26 ordini e 356 famiglie di esapodi, provenienti da circa 650 località, per un totale di circa 20.000 record. Si tratta di una quantità di dati e di un numero di specie molto elevato, se si considera che in Italia sono state segnalate circa 37.500 specie di insetti (Minelli *et al.*, 1994-1995) e che la banca dati del Progetto CKmap (Checklist e distribuzione della fauna italiana) comprende circa 500.000 record (Latella *et al.*, 2005).

Per alcuni gruppi, tradizionalmente studiati dagli entomologi della scuola romana (Vigna Taglianti, 1980), l'informazione è relativamente completa. Sono infatti note 42 specie di odonati su 88 segnalate in Italia, 2.385 specie di coleotteri su 12.000 in Italia; 520 specie di macrolepidotteri, su oltre 5.000 in Italia; oltre 660 specie di imenotteri, tra formicidi e apoidei, su 7.526 in Italia. Altri gruppi tassonomici sono invece assai poco conosciuti come, ad esempio, collemboli, psocotteri, ortotteri, tisanotteri, omotteri, ditteri, microlepidotteri, imenotteri non-aculeati. Nessun dato è noto per archeognati, mallofagi e rafidiotteri, certamente presenti nell'area.

Assai lacunosi sono inoltre i dati relativi ad importanti comunità e tassocenosi. Ad esempio, si può ricordare

che mancano informazioni adeguate sui fitofagi del verde ornamentale in generale (afidi, cocciniglie, coleotteri di varie famiglie, lepidotteri e altri ancora). Più in dettaglio, a fronte di circa 1.400 specie di piante vascolari segnalate a Roma (Celesti Grapow, 1995) e di circa 120 specie utilizzate per le alberate stradali (Aa. Vv., 2011), nell'area romana risultano segnalate solo 80 specie di afidi, su 269 note nel Lazio (Barbagallo e Massimino Cocuzza, 2014) e circa 690 in Italia (Barbagallo *et al*. 1994). Per quanto riguarda le cocciniglie, a Roma risultano segnalate solo 37 specie, su circa 320 specie in Italia (Barbagallo *et al.*, 1994).

L'alto numero di specie comunque segnalato a Roma entro il GRA è in relazione:

1. alla posizione geografica dell'area in cui si è sviluppata la città, settore collinare al centro della penisola italiana, a ~30 km dalla costa tirrenica, a ~ 50 km dall'Appennino (De Vecchis, 2007);
2. al mosaico ambientale, tipico delle aree urbane (Allen, 2003), sovrapposto all'articolazione ambientale originale;
3. allo sforzo di ricerca condotto negli anni (Stoch, 2005), essendo Roma sede di tre Università e di due musei naturalistici (Merzagora, 2010).

La monografia dedicata agli insetti di Roma ha però rappresentato non solo una lista di specie, ma anche una chiave di lettura:

1. della complessità del popolamento animale locale, comprendente i) specie autoctone appartenenti a diversi contingenti faunistici, relativi a diverse ondate di popolamento e provenienti da settori geografici differenti, ii) specie sinantrope *s.l.*, ad ampia distribuzione geografica, iii) specie alloctone, di origine recente o recentissima;
2. delle trasformazioni del territorio per cause antropiche che si sono svolte a diversa scala, locale (e.g., urbanizzazione e incremento demografico, modifiche degli alvei dei fiumi Tevere e Aniene) e regionale (e.g., bonifica della Campagna Romana; lotta antianofelica; uso del DDT; espansione delle aree coltivate; sprawl urbano; conurbazione);
3. delle conseguenze che queste trasformazioni hanno avuto sulla diversità entomologica locale, dando luogo a fenomeni di isolamento, di relittualità, di estinzione e di invasioni biologiche.

Gli "*Insetti di Roma*" ha stimolato l'avvio di numerosi studi sulla fauna entomologica capitolina e molti altri studi sono stati pubblicati tra il 1998 e il 2018. Si tratta di circa 50 lavori relativi a nuove segnalazioni, revisioni, studi di comunità, studi applicativi, e sulla conservazione (vedi ad es. Di Luca *et al.*, 2001; Viglioglia, 2004; Di Giovanni e Mei, 2012; Sabbatini Peverieri *et al.*, 2012; Fattorini, 2013, 2014a, 2014b; Fattorini *et al*., 2014; altri lavori saranno citati via via nel testo che segue).

## Conseguenze sull'entomofauna locale

### *1. Declino delle popolazioni: il caso di* Mylabris variabilis

Dati sulla consistenza numerica delle popolazioni di insetti nell'area romana sono praticamente assenti. Tuttavia, l'unico caso che si può ricordare a questo proposito è forse quello del coleottero meloide *Mylabris variabilis*. Nel 1946, in un piccolo centro a circa 20 km a NW della Capitale, Santa Maria di Galeria, tre operatori raccolsero in due sole riprese ben diciottomila esemplari di questa specie. Tali esemplari vennero sperimentalmente introdotti in Sardegna nell'ambito degli studi condotti dall'entomologo Guido Paoli sul controllo biologico dell'ortottero acridide *Dociostaurus maroccanus*, di cui il coleottero è parassita oofago. Appena pochi anni più tardi in nessuna altra località del Lazio sarà più possibile incontrare popolazioni del meloide così consistenti. In questo caso, il locale declino della specie, legata alla presenza dei suoi ospiti i quali ovidepongono nel suolo, è da mettere verosimilmente in relazione al progressivo diffondersi delle pratiche di dissodamento dei terreni per scopi agricoli (Zapparoli, 1997a).

Altri fattori possono essere direttamente o indirettamente coinvolti nel declino degli insetti nelle aree urbane, oltre all'urbanizzazione. Secondo Carpaneto *et al.* (2005), ad esempio, la predazione da parte di uccelli a dieta onnivora ed ecologicamente opportunisti, come *Corvus cornix*, *Sturnus vulgaris*, da alcuni decenni presenti a Roma con sempre più consistenti popolazioni, può rappresentare un possibile fattore di riduzione degli scarabeidi coprofagi. Recenti studi (Fattorini *et al.*, 1990; Fattorini, 2001, 2011b) hanno inoltre dimostrato come gli insetti, in particolare i coleotteri e fra essi i tenebrionidi, possono rappresentare una importante risorsa trofica per alcune specie di rapaci diurni e notturni a regime alimentare anche parzialmente insettivoro (*Falco tinnunculus*, *Athene noctua*, *Strix aluco*).

### *2. Relittualità della componente autoctona*: *l'esempio dei coleotteri saproxilici e delle specie in Direttiva Habitat*

Molte specie di insetti un tempo relativamente diffuse, popolano oggi isolati settori seminaturali, nelle ville storiche, nei residui di Campagna Romana tra le aree costruite, negli ambienti ripari lungo il Tevere e l'Aniene e lungo i fossi confluenti. Alcune di queste specie hanno valore conservazionistico a livello nazionale ed internazionale (Vigna Taglianti e Zapparoli, 2006).

Per la presenza del coleottero scarabeide *Osmoderma eremita,* due importanti ed estese ville storiche romane, Villa Borghese (80 ha), nel Centro Storico, e Villa Pamphili (184 ha), nel quadrante sud-occidentale

della città, sono inserite tra i proposti Siti d'Interesse Comunitario (IT6030052) della Commissione Europea. La specie è infatti inclusa nella Direttiva Europea "Habitat" (92/43/CEE), in particolare nell'Allegato 2 (specie la cui conservazione richiede l'istituzione di Zone Speciali di Conservazione) e nell'Allegato 4 (specie per le quali è necessario adottare misure di rigorosa tutela e delle quali è vietata qualsiasi forma di raccolta, uccisione, detenzione e scambio a fini commerciali). *O. eremita* è inoltre protetta a livello internazionale ai sensi della Convenzione di Berna (L. 503/1981), per la conservazione della vita selvatica e dei suoi biotopi in Europa (Allegato 2, specie strettamente protette), ed è valutata come Vulnerabile nella recente Lista Rossa IUCN dei coleotteri saproxilici italiani (Audisio *et al.*, 2014). Nel Lazio, questo scarabeide è stato segnalato in poche altre località (Ruffo e Stoch, 2005; Antonsson *et al.*, 2005) e la sua presenza in parchi urbani è stata rilevata anche in altre città europee, italiane (Firenze, L'Aquila) ed estere (Antonsson *et al.*, 2005; Carpaneto *et al.*, 2010; Giangregorio *et al*., 2015).

In aggiunta a *O. eremita*, altre specie di coleotteri saproxilici sono state segnalate nelle ville e nei parchi storici romani. Tra questi si ricordano il cerambicide *Cerambyx cerdo*, anch'esso incluso in Direttiva "Habitat" (Allegati 2 e 4) e in Convenzione di Berna (Allegato 2) ma assai più diffuso in Italia e a Roma, e valutato come specie a Minor Preoccupazione nella Red List dei coleotteri saproxilici italiani (Audisio *et al*., 2014), e il lucanide *Lucanus tetraodon*, non incluso in Direttiva Habitat, anch'esso valutato come specie a Minor Preoccupazione nella stessa Red List (Audisio *et al*., 2014) ed assai più localizzato.

Va sottolineato, d'altra parte, che la presenza di specie saproxiliche nei parchi urbani può entrare in conflitto con la necessità di tutela da parte delle amministrazioni pubbliche e delle proprietà private nel caso di potenziali problemi provocati dal crollo di alberi attaccati da queste specie ed il caso di *O. eremita* risulta emblematico in questo senso (Carpaneto *et al.*, 2010). È quindi necessario che si stabiliscano forme di collaborazione tra il mondo della ricerca scientifica e gli amministratori nella pianificazione delle attività selvicolturali (tagli) su alberi attaccati da specie protette, al fine di assicurare un compromesso tra la tutela delle specie e l'incolumità della cittadinanza (Audisio *et al.*, 2014).

D'interesse conservazionistico è anche l'odonato cenagrionide *Coenagrion mercuriale*, specie compresa in Allegato 2 della Direttiva "Habitat", in Allegato 2 della Convenzione di Berna e valutata come Quasi Minacciata nella recente Lista Rossa IUCN delle libellule italiane per il declino a cui è andata incontro negli ultimi anni a causa della riduzione della qualità dell'habitat (Riservato *et al.*, 2014). A Roma, *C. mercuriale* è stata segnalata in poche località periferiche della città, tra cui Cecchignola (nel 1936), nel settore sud-orientale, Acquatraversa (nel 1949) e Insugherata (nel 1994), entrambe nel settore nord-occidentale.

Nell'area capitolina risultano segnalate anche altre specie di insetti protetti ai sensi della Direttiva "Habitat" e della Convenzione di Berna (Vigna Taglianti e Zapparoli, 2006). Si tratta del lasiocampide *Eriogastes catax*, segnalato fino agli anni venti del '900 (Farnesina, Valle Inferno); dello sfingide *Proserpina proserpinus*, di cui è nota una sola segnalazione risalente al 1971 (Camilluccia); del satiride *Melanargia arge*, endemita dell'Italia centro-meridionale le cui ultime segnalazioni risalgono alla fine degli anni venti del '900 (Acquatraversa, Farnesina); e del papilionide *Zerynthia cassandra*, esclusivo della penisola italiana e della Sicilia, ritenuta scomparsa prima del 1950 per la mancanza di habitat idonei (Fattorini, 2011b) è invece oggi ancora presente nella Riserva Naturale dell'Insugherata, gestita dall'ente RomaNatura.

*3. Estinzione di specie e di cenosi autoctone*

Il fenomeno dell'estinzione degli insetti a seguito dell'urbanizzazione del territorio a Roma è stato recentemente esaminato da Fattorini (2011b). Per studiare il processo, l'autore ha preso in esame tre gruppi tassonomici tra i meglio conosciuti nell'area di studio (l'area urbana entro il GRA), ripartiti in base alle rispettive caratteristiche ecologiche: lepidotteri papilionoidei (60 specie), coleotteri tenebrionidi (37 specie), coleotteri scarabeoidei coprofagi (geotrupidi, ibosoridi, ocodeidi, afodidi, scarabeidi: 87 specie) e coleotteri scarabeoidei non-coprofagi (glafiridi, melolontidi, rutelidi, dinastidi, cetonidi: 39 specie); in tutto, 223 specie. Per questi gruppi ecologico-tassonomici sono state prese in considerazione le segnalazioni raccolte in un arco di tempo di 114 anni, tra il 1885 e il 1999, desunte da Zapparoli (1997a) per quanto riguarda lepidotteri e coleotteri scarabeoidei, e da Fattorini (2010) per i coleotteri tenebrionidi, questi ultimi aggiornati in base allo studio di reperti museali inediti e a nuove indagini sul campo (v. anche Fattorini, 2011a). Su ciascun gruppo sono state condotte accurate analisi statistiche, relative alla persistenza delle specie nel tempo, diviso in decadi; alle percentuali del numero cumulativo di specie estinte per decade; alla percentuale relativa di specie estinte per decade; alle tendenze nel declino delle specie, effettuando anche un confronto tra i gruppi delle variazioni temporali per decade nella percentuale del numero cumulativo di specie estinte e nella percentuale relativa di specie estinte.

In base ai dati raccolti ed alle elaborazioni effettuate, Fattorini (2011b) è in grado di mettere in evidenza picchi di estinzione chiaramente correlati con l'urbanizzazione del territorio, soprattutto a partire dagli anni Cinquanta del 900. Tra i gruppi considerati

evidenzia tuttavia alcune differenze, dovute alla ecologia generale delle specie ad essi riferite.

Ad esempio, tra gli scarabeoidei la scomparsa di specie psammofile del genere *Scarabeus* (e.g., *S. sacer*, *S. semipunctatus*) e *Rhyssemus* (e.g., *R. plicatus*, *R. sulcatus*), legate alle rive sabbiose del Tevere dove erano presenti fino agli anni Trenta del 900, sembra in relazione ai profondi cambiamenti ambientali intervenuti a seguito della costruzione degli argini in muratura, effettuata tra il 1877 e il 1910 per contrastare le periodiche inondazioni del fiume che interessavano la città (Bortolotti, 1988).

Queste modificazioni hanno coinvolto anche specie appartenenti ad altri gruppi di coleotteri non considerati da Fattorini (2011b), come ad esempio l'elateride *Negastrius sabulicola* e i carabidi *Broscus cephalotes*, *Asaphidion nebulosum*, *A. pallipes*, *Odontium laticolle*, *O. foraminosum*, *O. striatum*, *Ocydromus concoeruleus*, *Poecilus striatopunctatus* (Zapparoli, 1997a; Vigna Taglianti e Zapparoli, 2006).

Sempre tra gli scarabeoidei, la percentuale di specie estinte sul totale delle specie segnalate risulta maggiore tra i coprofagi (65%) rispetto ai non coprofagi (56%). Ciò può attribuirsi alla forte riduzione del pascolo ovino anche nelle aree cittadine periferiche dopo gli anni '60 del Novecento (Fattorini, 2011b). Specie come *Gymnopleurus mopsus*, *Copris lunaris*, *Chironitis irroratus*, *C. furcifer* ed *Euoniticellus pallipes*, oggi scomparse, erano comuni a Roma fino al 1970.

A questo proposito si ricorda uno studio di Carpaneto *et al.* (2005), in cui si dimostra come la riduzione nel tempo di idonee risorse trofiche (es., sterco ovino) ha rappresentato una importante causa di estinzione per alcuni scarabeoidei coprofagi una volta comuni come, ad esempio, *Scarabaeus laticollis* e *Thorectes intermedius*, non in grado di utilizzare risorse trofiche (es., sterco canino) che nel frattempo si sono rese sempre più disponibili a seguito dei rapidi cambiamenti sociali ed economici intervenuti nell'area dopo gli anni Settanta del 900. Al contrario, le stesse nuove risorse alimentari sembra abbiano favorito alcune specie in precedenza rare, come *Onthophagus coenobita* e *Aphodius johnsoni*, in grado di sfruttare sterco di animali onnivori (Carpaneto *et al.*, 2005). Anche i cambiamenti quantitativi sono impressionanti: confrontando i campionamenti effettuati dallo stesso operatore e con gli stessi metodi nel 1986 e nel 1999, Carpaneto *et al.* (2005) trovano differenze enormi sia nella diversità tassonomica, 19 specie (6 generi) contro 9 specie (2 generi), che nel numero di individui, 210 contro 1.498, rispettivamente. Significativo è il caso di *Aphodius johnsoni*, che nel 1986 era rappresentato da un solo individuo, mentre nel 1999 ne sono stati raccolti 1.227, più dell'80% del campione.

Per quanto riguarda gli scarabeoidei non coprofagi, secondo Fattorini (2011a, 2011b) elementi come, ad esempio, *Liocola lugubris*, *Potosia fieberi* e *P. opaca* si sono estinti all'inizio del XX secolo, mentre altri, come *Eupotosia mirifica*, *Anthypna carceli* e *Trichius rosaceus*, sono stati segnalati fino agli anni '40-'50 del 900. Numerose specie di scarabeoidei non-coprofagi sono localmente scomparse nel periodo 1950-1960, suggerendo che i principali fattori che hanno contribuito alla loro estinzione potrebbero essere associati alla urbanizzazione delle aree periferiche avvenuta in quegli anni (vedi ad es. Insolera, 1980).

Per quanto riguarda i tenebrionidi, la maggior parte delle prime estinzioni si è verificata tra le specie psammofile associate alle sponde del Tevere e dell'Aniene (Fattorini, 2011b). In particolare, *Cnemeplatia atropos* sarebbe scomparsa prima del 1900 e *Melanimon tibialis* prima del 1950. La più alta percentuale di estinzioni si è registrata alla fine degli anni '80, quando scomparvero elementi del suolo associati a terreni aridi e sabbiosi (e.g., *Tentyria italica*, *Gonocephalum obscurum*, *Opatrum sabulosum*, *Cossyphus tauricus*). Nei tenebrionidi la percentuale di specie estinte è inferiore (32%) a quella degli scarabaeidi (62,5%) e delle farfalle (45%). Questa differenza può essere dovuta alla presenza nel popolamento dei tenebrionidi capitolini di una componente di specie eurisilvicole (e.g., *Colpotus strigosus*, *Dendarus coarcticollis*, *Catomus rotundicollis*, *Accanthopus velikensis*, *Nalassus* spp.), in grado di sopravvivere nelle grandi ville storiche della città, e di una componente di specie antropofile (e.g., *Asida luigionii*, *Scaurus striatus*, *Akis bacarozzo*, *A. italica*, *Blaps* spp.), associate a ruderi e a siti archeologici (Fattorini, 2011b), entrambe assenti negli altri gruppi.

Per quanto riguarda le farfalle diurne, Fattorini (2011b) mostra che nessuna estinzione è avvenuta prima del 1900. Significativi cambiamenti nella composizione delle cenosi avvennero invece tra il 1900 e la fine degli anni 40, probabilmente a seguito di cambiamenti ambientali particolarmente gravi per questi insetti. Infatti, il 33% delle specie di papilonoidei non è stata più segnalata proprio in coincidenza di quel periodo e un ulteriore 2,5% è scomparsa tra il 1950 e il 1960. Nessuna specie sembra invece scomparsa tra il 1960 e il 1980. La maggior parte delle specie estinte precocemente è rappresentata da elementi già localizzati anche nel resto del loro areale appenninico e quindi piuttosto rari anche nell'area romana, probabilmente meno tolleranti e con minori capacità di dispersione (e.g., *Lycaena tityrus*, *Thecla quercus*, *Cupido alcetas*, *Aricia agestis*, *Boloria dia*, *Apatura ilia*, *Melanargia arge*, *Pyronia tithonus*). Nella maggior parte dei lepidotteri diurni, la principale causa di estinzione è probabilmente rappresentata dall'alterazione dell'habitat. Per altre specie un ulteriore fattore di declino potrebbe essere invece costituito dall'isolamento dell'habitat. Ad esempio, nel caso di *Melanargia arge*,

considerata estinta a Roma a causa dell'urbanizzazione da VERITY (1953), ZILLI (1998) propone una ipotesi alternativa secondo la quale la causa più importante della sua scomparsa potrebbe essere rappresentata proprio dal fattore isolamento, dato che ambienti idonei a questa specie sono ancora presenti nell'area di studio.

Tra i coleotteri curculionidei, di cui a Roma risultano segnalate circa 500 specie, molte non risultano più presenti dopo gli anni '40-'50 del 900 (COLONNELLI e SACCO, 1997). Tra queste, emblematico è il caso di *Elytrodon luigionii*, descritto nel 1899 su esemplari raccolti a Roma e segnalato solo in poche località lungo l'Aniene (Ponte Nomentano: 1914) e il Tevere (Acquacetosa: 1946). Solo recentemente (1983) questa specie è stata ritrovata in una località molto periferica, nelle immediate adiacenze del GRA, nel settore nord-orientale della città (Via di Settebagni/GRA: GIGLI, 2009), a dimostrazione di quanto sia difficile documentare la definitiva scomparsa di una specie di insetto da un dato territorio.

Figura 1 – Una località classica dell'entomologia romana, Ponte Nomentano, lungo il fiume Aniene, oggi in un quartiere densamente urbanizzato, in una cartolina degli anni Trenta (?) del 900 (coll. M. Zapparoli).

Figura 2 – Il coleottero curculionide *Elytrodon luigionii*: habitus (disegno di Niccolò Falchi).

## GLI INSETTI DI ROMA: QUALE FUTURO?

Al termine di questa breve e parziale rassegna ci si potrebbe chiedere quale possa essere il ruolo di un'area urbana come quella di Roma nella conservazione degli insetti, in particolare, e della biodiversità, più in generale, considerando che ci troviamo di fronte ad una città unica, Capitale della Repubblica Italiana, capoluogo dell'omonima Area Metropolitana e della Regione Lazio, il cui territorio si estende per 128.500 ettari, che ospita circa 2.800.000 abitanti, con una densità media di oltre 2.200 abitanti/kmq, il comune più popoloso ed esteso d'Italia, il quarto dei Paesi dell'Unione Europea, dotato di un ordinamento amministrativo speciale (Roma Capitale), disciplinato da una legge dello Stato (L. 42/2009, art. 24), con oltre 2000 anni di storia, al centro di interessi politici, amministrativi, commerciali, culturali, storici e religiosi unici, nazionali ed internazionali, nonché teatro di enormi contraddizioni sociali ed economiche.

Roma è d'altra parte la città europea con la maggiore estensione di aree verdi. La sua straordinaria articolazione territoriale comprende ambienti unici nell'ambito del versante tirrenico dell'Italia centrale, in cui i valori di biodiversità hanno ancora grande interesse scientifico e culturale e sono meritevoli di conservazione.

Nel 2003, il Dipartimento Tutela Ambientale di Roma Capitale ha elaborato una "Rete Ecologica" per la redazione del Nuovo Piano Regolatore della città. L'obiettivo di questa Rete è quello di definire la continuità e la connessione tra le aree verdi della città con le zone seminaturali e/o agricole intorno ad essa, al fine di tutelare la biodiversità e i valori ambientali contenuti in questo territorio. La Rete Ecologica di Roma Capitale interessa circa i 2/3 del territorio amministrato da questo ente (86.000 ha, pari al 67% della superficie comunale) ed include aree naturali protette (15 riserve, più una marina), aree verdi (ville storiche, siti archeologici, parchi e giardini, nonché alberate stradali), aree golenali (del Tevere, dell'Aniene e dei fossi ad essi tributari) e aree agricole.

Ovviamente, gli strumenti amministrativi, benché necessari, non bastano per garantire la tutela dei valori

ambientali di questo territorio, specialmente a fronte di crescenti problematiche ambientali, come ad esempio il consumo di suolo (Munafò, 2018), fenomeno strettamente collegato all'urbanizzazione, al degrado degli habitat e alla perdita di biodiversità. Oltre a soluzioni specifiche, che contrastino l'erosione della biodiversità, l'alterazione degli habitat, la "banalizzazione" delle biocenosi, più in generale sarà necessario in primo luogo dare sostegno ed incrementare la ricerca scientifica, corrispondendo risorse adeguate agli obbiettivi che si intende perseguire, in particolare negli studi faunistici ed ecologici di dettaglio, su specie e biocenosi. Sarà inoltre necessario costruire e rafforzare la sinergia tra gli amministratori e la comunità scientifica, affinché i risultati delle indagini, in particolare quelle direttamente o indirettamente applicative, trovino attuazione in strategie di gestione del territorio condivise ed efficaci, superando i conflitti (vedi ad es. Carpaneto *et al.*, 2010). Inoltre, dovrà obbligatoriamente trovare spazio, tanto negli amministratori, quanto nella cittadinanza, una maggiore sensibilità al concetto che la cultura, ed in particolare la cultura scientifica, può aggiungere valore alla vita quotidiana di tutti, anche attraverso lo studio degli insetti, "*the little things that run the world"* (riprendendo Wilson, 1987), animali "negletti" il cui ruolo nel funzionamento degli ecosistemi è però insostituibile.

## RIASSUNTO

L'Entomologia urbana può essere intesa come quella branca dell'Entomologia applicata che studia gli artropodi che inducono problemi all'uomo nelle aree urbane. Tali studi sono finalizzati a comprendere biologia ed ecologia di questi organismi per elaborare programmi di controllo rispettosi dell'ambiente. L'interesse per gli artropodi nelle aree urbane va però oltre questi aspetti applicativi e si estende anche ad aspetti faunistici, ecologici e di conservazione della natura. In Italia, la città meglio conosciuta da questo punto di vista è Roma, la cui fauna entomologica è stata oggetto d'indagine sin dalla prima metà del XIX secolo. In base ad una sintesi pubblicata nel 1997, nel territorio di Roma entro il Grande Raccordo Anulare sono state segnalate 5.200 specie di insetti (26 ordini, 356 famiglie). Tale studio ha stimolato l'avvio di altri studi entomologici che hanno fornito una chiave di lettura della complessità del popolamento locale, delle trasformazioni antropiche del territorio e delle conseguenze che queste hanno avuto sulla diversità locale. Dati sulla consistenza numerica delle popolazioni di insetti a Roma sono praticamente assenti. L'unico caso che si può ricordare è quello del coleottero meloide *Mylabris variabilis*, la cui rarefazione nella Campagna Romana è in relazione al cambiamento delle pratiche agricole. Un altro fattore di riduzione numerica delle popolazioni può essere rappresentato dalla predazione da parte degli uccelli opportunisti, sempre più numerosi nella città. Specie di insetti un tempo relativamente diffuse mostrano oggi una microdistribuzione di tipo relitto, essendo presenti solo nei residui di Campagna Romana tra le aree costruite o nelle ville storiche. Alcune specie hanno interesse conservazionistico essendo incluse in Liste Rosse, Direttiva "Habitat", Convenzione di Berna (*Coenagrion mercuriale*, *Osmoderma eremita, Cerambyx cerdo, Eriogastes catax*, *Proserpina proserpinus*, *Melanargia arge*, *Zerynthia cassandra*). Particolare attenzione va prestata alla presenza di specie saproxiliche nei parchi urbani, che può creare situazioni di conflitto nel caso di crolli di alberi attaccati da queste specie. Benché picchi di estinzione siano correlati con l'urbanizzazione del territorio, soprattutto a partire dagli anni Cinquanta del 900, gli studi a Roma hanno messo in evidenza modelli diversi secondo i gruppi tassonomici, in base alla ecologia e al grado di tolleranza delle specie. Gli elementi più sensibili, specializzati e con minori capacità di dispersione sono quelli che per primi sono scomparsi. Alterazione dell'habitat e isolamento spaziale delle popolazioni appaiono le cause di estinzione più importanti. L'Amministrazione capitolina ha elaborato una "Rete Ecologica" per la redazione del Nuovo Piano Regolatore della città, al fine di conservare i valori ambientali e di biodiversità del suo territorio. Si ritiene però che gli strumenti amministrativi non siano sufficienti a garantire la tutela di tali valori. Oltre a soluzioni specifiche, è necessario dare sostegno alla ricerca scientifica, rafforzare la sinergia tra amministratori e comunità scientifica nonché dare spazio ad una maggiore sensibilità al concetto che la cultura scientifica può aggiungere valore alla vita quotidiana di tutti.

## BIBLIOGRAFIA

Aa.Vv., 1985 – *Entomologia urbana per la qualità della vita*. - Atti I Convegno dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, 17-18 maggio 1984, Milano, 241 pp.

Aa. Vv., 2011 – *Relazione sullo Stato dell'Ambiente. Natura e verde pubblico*. - Comune di Roma, 118 pp.

Allen A., 2003 – *Environmental planning and management of the peri-urban interface: perspectives on an emerging field*. - Environment and urbanization, 15(1): 135-148.

Audisio P., Baviera C., Carpaneto G.M., Biscaccianti A.B., Battistoni A., Teofili C., Rondinini C. (compilatori), 2014 – Lista Rossa IUCN dei Coleotteri saproxilici Italiani. - Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma, 132 pp.

Baldock K.C., Goddard M.A., Hicks D.M., Kunin W.E., Mitschunas N., Osgathorpe L.M., Potts S.G, Robertson K.M., Scott A.V., Stone G.N., Vaughan I.P., Memmot J., 2015 – *Where is the UK's pollinator biodiversity? The importance of urban areas for flower-visiting insects*. - Proc. R. Soc. B, 282 (1803): 20142849 (10 pp.).

Barbagallo S., Binazzi A., Bolchi Serini G., Conci C., Longo S., Marotta S., Martelli M., Patti I., Pellizzari G., Rapisarda C., Russo A., Tranfaglia A. 1995 – *Homoptera Sternorrhyncha*. - In: Minelli A., Ruffo S., La Posta S. (Eds), Checklist delle specie della fauna italiana, 43. Calderini, Bologna, 57 pp.

Barbagallo S., Massimino Cocuzza G.E., 2014 – *A survey of the aphid fauna in the Italian regions of Latium and Campania*. - Redia, 97: 19-47.

Bonebrake T.C., Cooper D.S., 2014 – *A Hollywood drama of butterfly extirpation and persistence over a century of urbanization*. - Journal of insect conservation, 18 (4): 683-692.

Bortolotti L. 1988 – *Roma fuori le mura, l'Agro romano da palude a metropoli*. - Laterza, Roma, Bari, 309 pp.

Carpaneto G.M., Mazziotta A., Coletti G., Luiselli L., Audisio P., 2010 – *Conflict between insect conservation*

*and public safety: the case study of a saproxylic beetle (*Osmoderma eremita*) in urban parks*. - Journal of Insect Conservation, 14 (5): 555-565.

Carpaneto G.M., Mazziotta A., Piattella E., 2005 – *Changes in food resources and conservation of scarab beetles: from sheep to dog dung in a green urban area of Rome (Coleoptera, Scarabaeoidea).* - Biological Conservation, 123: 547–556.

Cavell M., 2018 – *Arachnophobia and early English literature*. - New Medieval Literatures, 18: 1-43.

Celesti Grapow L., 1995 – *Atlante della Flora di Roma*. - Argos Editore, Roma, 222 pp.

Chown S.L., McGeoch M.A., Rosch M., 2001 – *Testing a bioindicator assemblage: gall-inhabiting moths and urbanization*. - African Entomology, 9: 85-94.

Colonnelli E., Sacco F., 1997 – *Coleoptera Curculionidea.* - In: Zapparoli M. (Ed.), Gli Insetti di Roma. Palombi Editore, Roma, pp. 217-235.

Connor E.F., Hafernik J., Levy J., Moore V.L., Rickman J.K., 2002 – *Insect conservation in an urban biodiversity hotspot: the San Francisco Bay Area*. – J. Insect Conservation, 6: 247–259.

Corbellini G., Merzagora M., 1998 – *La malaria tra passato e presente*. - Università di Roma Sapienza, Roma, 113 pp.

Davis A.M., Glick T.F., 1978 – *Urban ecosystems and island biogeography*. - Environmental Conservation, 5 (4): 299-304.

De Vecchis G. (Ed.), 2007 – *Per una geografia del Lazio*. - Kappa, Roma, 136 pp.

Di Giovanni F., Mei M., 2012 – *First records of* Pison carinatum *R. Turner, 1917 from Italy and Greece (Hymenoptera, Crabronidae)*. - Ampulex, 5: 1 p.

Di Luca M., Toma L., Severini F., D'Ancona F., Romi R., 2001 – Aedes albopictus *a Roma: monitoraggio nel triennio 1998-2000*. - Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 37(2): 249-254.

Domenichini G., Crovetti A. (Eds), 1989 – *Entomologia urbana e sanità ambientale*. - Utet, Torino, XVI + 253 pp.

Ebeling W., 1978 – *Urban entomology*. - Division of Agricultural Sciences, University of California, viii + 695 pp.

Fattorini S., 2001 – *Temporal and spatial variations in darkling beetle predation by kestrels and other raptors in a Mediterranean urban area.* - Biologia 56, 165170.

Fattorini S., 2010 – *Use of insect rarity for biotope prioritisation: the tenebrionid beetles of the Central Apennines (Italy)*. - Journal of Insect Conservation, 14: 367-378.

Fattorini S., 2011a – *Insect rarity, extinction and conservation in urban Rome (Italy): a 120-year-long study of tenebrionid beetles*. - Insect Conservation and Diversity, 4: 307–315

Fattorini S., 2011b – *Insect extintion by urbanization: a long term study in Rome*. - Biological conservation, 144: 370-375.

Fattorini S., 2013 – *I Coleotteri Tenebrionidi di Roma (Coleoptera, Tenebrionidae).* - Fragmenta Entomologica, 45 (1-2): 87-142.

Fattorini S., 2014a – *Urban biodiversity hotspots are not related to the structure of green spaces: a case study of tenebrionid beetles from Rome, Italy.* - Urban ecosystems, 17 (4): 1033-1045.

Fattorini S., 2014b – *Island biogeography of urban insects: tenebrionid beetles from Rome tell a different story.* Journal of insect conservation, 18 (4): 729-735.

Fattorini S., Manganaro A., Piatella E., Salvati L., 1990 – *Role of the beetles in raptor diets from a Mediterranean urban area (Coleoptera)*. - Fragmenta entomologica, 31(1): 57-69.

Fattorini S., Porena B., Bernardini F., Di Giulio A., 2014 – *Nuovi dati sui Coleotteri Tenebrionidi della città di Roma (Coleoptera Tenebrionidae).* - Bollettino della Società Entomologica Italiana, 146 (3): 137-142.

Frankie G.W., Ehler L.E., 1978 – *Ecology of insects in urban environments*. - Annual Review of Entomology, 23 (1): 367-387.

Frankie G.W., Koehler C.S., 1978 – *Perspectives in Urban Entomology*. - Academic Press, New York. 417 pp.

Frankie G.W., Koehler C.S., 1983 – *Urban entomology, interdisciplinary perspectives*. - Praeger, New York, xii + 493 pp.

Gaston K.J. (Ed.), 2010 – *Urban ecology*. - Cambridge University Press, Cambridge, 317 pp.

Giangregorio P., Audisio P., Carpaneto G.M., Marcantonio G., Maurizi E., Mosconi F., Campanaro A., 2015 – *Updated distribution of* Osmoderma eremita *in Abruzzo (Italy) and agro-pastoral practices affecting its conservation (Coleoptera: Scarabaeidae).* - Fragmenta entomologica, 47 (2): 139-146.

Gibb H., Hochuli D.F., 2002 – *Habitat fragmentation in an urban environment: large and small fragments support different arthropod assemblages*. - Biological conservation, 106 (1): 91-100.

Gigli M., 2009. *Elytrodon luigionii* Desbrochers, 1899 - Curculionidae. Forum Entomologi Italiani. http://www.entomologiitaliani.net/public/forum/phpBB3/viewtopic.php?t=58846

Heino J., Bini L.M., Andersson J., Bergsten J., Bjelke U., Johansson F., 2017 – *Unravelling the correlates of species richness and ecological uniqueness in a metacommunity of urban pond insects*. - Ecological indicators, 73: 422-431.

Hunter M.R., Hunter M.D., 2008. *Designing for conservation of insects in the built environment*. - Insect Conservation and diversity, 1 (4): 189-196.

Insolera I., 1980. *Roma. Immagini e realtà dal X al XX secolo*. - Laterza, Bari, 468 pp.

Júnior C.D.S.M., Juen L., Hamada N., 2015 – *Analysis of urban impacts on aquatic habitats in the central Amazon basin: adult odonates as bioindicators of environmental quality*. - Ecological indicators, 48: 303-311.

Latella L., Ruffo S., Stoch F., 2005 – *Il progetto CKmap (Checklist e distribuzione della fauna italiana): metodologia di lavoro e tecniche informatiche*. In: Ruffo S., Stoch F. (Eds), Checklist e distribuzione della fauna italiana. - Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona, 2.serie, Sezione Scienze della Vita, 16: 15-20.

Lin B.B., Philpott S.M., Jha S., 2015 – *The future of urban agriculture and biodiversity-ecosystem services: challenges and next steps*. - Basic and applied ecology, 16 (3): 189-201.

Merzagora L., 2010 – *RESINA: struttura di rete e ruoli emergenti nel sistema museale naturalistico del Lazio*. - Museologia Scientifica Memorie, 6: 320-323.

Minelli A., Ruffo S., La Posta S. (Eds), 1994-1995 – *Checklist delle specie della fauna italiana*. - Calderini, Bologna, voll. 33-106.

Munafò M. (Ed.), 2018. *Consumo di suolo, dinamiche territoriali e servizi ecosistemici. Edizione 2017.* - Rapporti ISPRA 288, 288 pp.

New T.R., Sands D.P.A., 2002 – *Conservation concerns for butterflies in urban areas of Australia*. - J. Insect Conserv., 6: 207-215.

Olkowski H., Olkowski W., 1976 – *Entomophobia in the urban ecosystem, some observations and suggestions*. - Bulletin of the ESA, 22 (3): 313-318.

Pictet F.J., 1841 – *Histoire naturelle générale et particlière des Insectes Névroptères. Famille des Perlides*. - Kessmann, Genéve, et Baillière, Paris, XVI + 423 pp.

Ranius T., Aguado L.O., Antonsson K., Audisio P., Ballerio A., Carpaneto G.M., Chobot K., Gjurasin B., Hanssen O., Huijbregts H., Lakatos F., Martin O., Neculiseanu Z., Nikitsky N.B., Paill W., Pirnat A., Rizun V., Ruicanescu A., Stegner J., Süda I., Szwalko P., Tamutis V., Telnov D., Tsinkevich V., Vignon V., Versteirt V., Vögeli V., Zach P., 2005 – Osmoderma eremita *(Coleoptera, Scarabaeidae, Cetoniinae) in Europe*. - Animal biodiversity and conservation, 28 (1): 1-44.

Rebele F., 1994 – *Urban ecology and special features of urban ecosystems*. - Global ecology and biogeography letters, 173-187.

Riservato E., Fabbri R., Festi A., Grieco C., Hardersen S., Landi F., Utzeri C., Rondinini C., Battistoni A., Teofili C., 2014 – Lista Rossa IUCN delle libellule Italiane. - Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma, 39 pp.

Robinson W.H., 1996 – *Urban entomology: insect and mite pests in the human environment*. - Chapman & Hall, xv + 430 pp.

Robinson W.H., 2005 – *Urban Insects and Arachnids. A Handbook of Urban Entomology*. - Cambridge University Press, Cambridge, 472 pp.

Ruffo S., Stoch F. (Eds), 2005 – Checklist e distribuzione della fauna italiana. - Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona, 2.serie, Sezione Scienze della Vita, 16: 307 pp. + CD rom.

Sabbatini Peverieri G., Bertini G., Furlan P., Cortini G., Roversi P.F., 2012 – Anoplophora chinensis *(Forster) (Coleoptera Cerambycidae) in the outbreak site in Rome (Italy): experiences in dating exit holes.* - Redia, 95: 89-92.

Santorufo L., Van Gestel C.A., Rocco A., Maisto G., 2012 – *Soil invertebrates as bioindicators of urban soil quality*. - Environmental Pollution, 161: 57-63.

Savard J.P.L., Clergeau P., Mennechez G., 2000 – *Biodiversity concepts and urban ecosystems*. - Landscape and urban planning, 48 (3-4): 131-142.

Scanlon A.T., Petit S., 2008 – *Biomass and biodiversity of nocturnal aerial insects in an Adelaide City park and implications for bats (Microchiroptera)*. - Urban Ecosystems, 11 (1): 91-106.

Schwarz N., Moretti M., Bugalho M.N., Davies Z.G., Haase D., Hack J., Hof A., Melero Y., Pett T.J., Knapp S., 2017 – *Understanding biodiversity-ecosystem service relationships in urban areas: A comprehensive literature review*. - Ecosystem services, 27: 161-171.

Stoch F., 2005 – *Ricchezza di specie e rarità: analisi della distribuzione in Italia*. In: Ruffo S., Stoch F. (Eds), Checklist e distribuzione della fauna italiana. - Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona, 2.serie, Sezione Scienze della Vita, 16: 33-35.

Süss L., 1990 – *Gli intrusi. Guida di entomologia urbana.* - Edagricole, Bologna, 226 pp.

Trematerra P., 2016 – *Entomologia Urbana e applicata. Animali infestanti o molesti e loro gestione*. -

Trematerra P., Süss, L., 2007 – *Prontuario di Entomologia merceologica e urbana. Con note morfologiche, biologiche e di gestione delle infestazioni*. - Aracne Editrice, Roma, 164 pp.

Verity R., 1953 – Le Farfalle diurne d'Italia. Vol. V: Satyridae. - Marzocco, Firenze, xix + 354 pp.

Viglioglia V., 2004 – *Note preliminari sull'entomofauna del Parco degli Acquedotti (Roma).* - Bollettino dell'Associazione Romana di Entomologia, 59: 1-18.

Vigna Taglianti A., 1980 – *Storia dell'Entomologia romana*. - Atti XII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Roma, 1: 5-66.

Vigna Taglianti A., 2001 – *Biodiversità negli insetti e sua conservazione*. - Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, XLIX: 191-204.

Vigna Taglianti A., Zapparoli M., 2006 – *Insetti di Roma. Biodiversità in un ecosistema urbano.* Le Scienze, Edizioni Belvedere, Latina, 72 pp.

Wilson E.O., 1987 – *The Little Things That Run the world (The Importance and Conservation of Invertebrates)*. - Conservation biology, 1 (4): 344-346.

Zapparoli M., 1997a – *Gli Insetti di Roma*. - Fratelli Palombi Editori, Roma, 358 pp.

Zapparoli M., 1997b – *Urban development and insect biodiversity of the Rome area, Italy*. - Landscape and Urban Planning, 38: 77-86.

Zhang Z.S., Lu X.G., Wang Q.C., Zheng D.M., 2009 – *Mercury, cadmium and lead biogeochemistry in the soil-plant-insect system in Huludao City*. - Bulletin of environmental contamination and toxicology, 83: 255-259.

Zilli A., 1998 – *Il turnover delle faune lepidotterologiche in ambiente urbano: dinamiche a confronto ed effetti dell'hinterland*. - In: Bologna M.A., Carpaneto G.M., Cignini B. (Eds), Atti del I Convegno Nazionale sulla Fauna Urbana, pp. 73-81.

206 - Pagina bianca

# NORME REDAZIONALI

I testi devono essere spediti per posta elettronica al Coordinatore della Redazione "Atti Accademia Entomologia" c/o CREA-DC, Centro di Ricerca per la Difesa e la Certificazione all'indirizzo mail:

roberto.nannelli@crea.gov.it

I contenuti dei lavori sono di esclusiva responsabilità dell'Autore/i.

Il testo deve essere fornito in formato Word con l'estensione .doc oppure .docx (molto gradito anche il file salvato in formato PDF); il testo non deve contenere indicazioni di carattere redazionale e deve essere uniformato alle seguenti norme:

– Titolo, informativo ma conciso.
– Nome dell'Autore (o degli Autori).
– Istituto di appartenenza dell'Autore (o degli Autori) e indirizzo; e-mail dell'autore corrispondente.
– Titolo in inglese.
– Summary.
– Key words, in inglese, massimo cinque parole, che devono dare brevi informazioni integrative al titolo del lavoro.
– Testo del lavoro con ben indicato l'inizio e la fine di ogni capitolo; i rimandi bibliografici devono essere così indicati: (Ramarkers, 1983) o Ramarkers (1983); (Riom e Gerbinot, 1977) oppure Deubert & Rhode (1971); (Robertson *et al.*, 1989).
– Eventuali ringraziamenti.
– Riassunto in italiano.
– Bibliografia indicata come da esempio:

Dallai R., 1975 – *Fine structure of the spermatheca of* Apis mellifera. - J. Insect Physiol., 21: 89-109.

Wallwork J.A., 1967 – *Acari*. In: Soil Biology, Burgers A. & Raw F. Ed., Academic Press, London, New York, pp. 365-395.

Hill D.S., 1987 – *Agricultural insect pests of the tropics and their control*. Cambridge University Press, XII+746 pp.

Nordlund D.A., Jones R.L., Lewis W.J. (Eds.), 1981 – *Semiochemical: their role in Pest control*. Wiley, N.Y., 850 pp.

Le figure e le relative didascalie devono essere indicate in cifre arabe (es. Fig. 1); devono essere fornite in formato JPG o TIFF. Per i grafici è preferito il formato PDF, le linee non dovrebbero essere più sottili di 0,25 pts e i retini avere una densità di almeno il 10%. Per le figure b/n sono ottimali risoluzioni di 600-1200 dpi, per le fotografie 300 dpi; le fotografie in JPG devono essere di buona qualità e dimensione tale da essere ridotte.

Finito di stampare nel marzo 2019
Tipografia Coppini - Firenze

208 - Pagina bianca