



Tavole Rotonde sui maggiori problemi  
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia  
Sotto gli auspici del MIPAAF

## XXV. IL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME: NUOVE ACQUISIZIONI E POSSIBILITÀ DI CONTROLLO DEMOGRAFICO



*Estratto da:*  
ATTI DELLA  
ACCADEMIA NAZIONALE  
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA  
Rendiconti Anno LXI - 2013



Tavole Rotonde sui maggiori problemi  
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia  
Sotto gli auspici del MIPAAF

**XXV.**

**IL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME:  
NUOVE ACQUISIZIONI  
E POSSIBILITÀ DI CONTROLLO DEMOGRAFICO**

*Estratto da:*  
ATTI DELLA  
ACCADEMIA NAZIONALE  
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA  
Rendiconti Anno LXI - 2013

© 2014 Accademia Nazionale Italiana di Entomologia  
50125 Firenze - Via Lanciola 12/a

ISBN 978-88-96493-12-0

## PRESENTAZIONE

*La Seduta scientifica organizzata dall'Accademia ha lo scopo di stabilire l'attuale stato delle conoscenze sulla biologia ed i risultati degli interventi per contenere gli attacchi del Punteruolo rosso delle palme (Rhynchophorus ferrugineus). Come è noto questo curculionide provoca seri danni alle piantagioni produttive di palme, alterando l'aspetto paesaggistico delle località ove le palme rappresentano un elemento caratterizzante e qualificante del territorio. È emerso in primo luogo che il parassita sta espandendosi nel nostro Paese, colpendo in particolare le palme (Phoenix canariensis) delle regioni rivierasche peninsulari e delle maggiori isole.*

*Il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, sensibile al problema della progressiva scomparsa delle palme, ha affidato ad alcune strutture scientifiche lo studio del problema per approfondire le conoscenze di base ed applicative per il controllo di questo coleottero.*

*Nella Seduta scientifica sono stati riferiti i risultati finora conseguiti dagli studi sul curculionide a riguardo del comportamento sociale, la riproduzione, gli aspetti genetici delle popolazioni mediterranee. La conoscenza del complesso di simbionti pre-*

*senti nell'intestino del parassita e che contribuiscono alla degradazione della cellulosa può inoltre fornire utili indicazioni per future applicazioni alternative al controllo del parassita attraverso l'uso di insetticidi. Il controllo biologico del Punteruolo rosso è all'attenzione di molti ricercatori. Gli esperimenti con funghi patogeni appaiono promettenti, così come l'utilizzo di nematodi entomopatogeni da impiegare in programmi di controllo integrato. Analogamente l'applicazione di alcuni composti repellenti volatili hanno mostrato risultati incoraggianti, poiché interferiscono con la biologia del parassita. Infine è in fase sperimentale il controllo del Punteruolo rosso attraverso la tecnica del maschio sterile.*

*La soluzione del problema, tuttavia, non appare di facile realizzazione anche per la scarsa attenzione delle amministrazioni comunali che spesso non valutano attentamente le conseguenze di una interruzione degli interventi e dei controlli per stabilire lo stato degli attacchi del parassita.*

ROMANO DALLAI

Presidente Accademia Nazionale Italiana di Entomologia



## INDICE

### Tavola Rotonda su:

IL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME:

NUOVE ACQUISIZIONI E POSSIBILITÀ DI CONTROLLO DEMOGRAFICO

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| SANTI LONGO, PIO FEDERICO ROVERSI – <i>Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico - Introduzione</i> .....                                                                                                                                                             | Pag. 187 |
| ALBERTO INGHILESI, GIUSEPPE MAZZA, ALESSANDRO CINI, RITA CERVO – <i>Comportamento sociale e riproduttivo del Punteruolo rosso delle palme: approfondire le conoscenze per contrastare questo flagello</i> .....                                                                                                        | » 189    |
| ALESSIO DE BIASE, SILVIA BELVEDERE, GABRIELE SENIA, VERONICA MARCARI, ALESSANDRA LA MARCA, LIEN VAN VU, MASSIMO CRISTOFARO – <i>Preliminary analysis of genetic variability and differentiation of Asian and Mediterranean populations of Red Palm Weevil</i> .....                                                    | » 193    |
| MATTEO MONTAGNA, BESSEM CHOUAIA, GIUSEPPE MAZZA, ERICA MARIA PROSDOCIMI, ELENA CROTTI, ANNAMARIA GIORGI, LUCIANO SACCHI, SANTI LONGO, GIUSEPPE LOZZIA, ALESSIO DE BIASE, CLAUDIO BANDI, RITA CERVO, DANIELE DAFFONCHIO – <i>Il microbioma associato a Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Dryophthoridae)</i> ..... | » 201    |
| VALERIA FRANCARDI, CLAUDIA BENVENUTI, GIAN PAOLO BARZANTI, PIO FEDERICO ROVERSI – <i>Controllo microbiologico di Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera Curculionidae) mediante impiego di una trappola "attract, infect and release"</i> .....                                                               | » 205    |
| GIUSEPPE MAZZA, VALERIA FRANCARDI, SANTI LONGO, ROBERTO NANNELLI, EUSTACHIO TARASCO, RITA CERVO, CLAUDIA BENVENUTI, PIO FEDERICO ROVERSI – <i>Controllo biologico del Punteruolo rosso delle palme Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)</i> .....                                                                       | » 211    |
| SALVATORE GUARINO, PAOLO LO BUE, EZIO PERI, VICTORIA SOROKER, STEFANO COLAZZA – <i>Individuazione e applicazione di composti volatili repellenti per il controllo delle popolazioni del Punteruolo rosso delle palme</i> .....                                                                                         | » 219    |
| POMPEO SUMA, SANTI LONGO, ALESSANDRA LA PERGOLA, VICTORIA SOROKER – <i>Metodi di monitoraggio delle infestazioni del Punteruolo rosso delle palme</i> .....                                                                                                                                                            | » 225    |
| FRANCESCO PORCELLI, DANIELE CORNARA – <i>Mezzi e metodi di controllo integrato del Punteruolo rosso delle palme</i> .....                                                                                                                                                                                              | » 233    |
| SERGIO MUSMECI, MASSIMO CRISTOFARO, SILVIA ARNONE, RAFFAELE SASSO, STEFANIA BACCARO, ANGELO PASQUALI, SILVIA CATARCI – <i>Controllo del Punteruolo rosso mediante la tecnica del maschio sterile (SIT): utopia o realtà?</i> .....                                                                                     | » 239    |
| FRANCESCO PAOLI, MASSIMO CRISTOFARO, SILVIA ARNONE, VALERIA FRANCARDI, PIO FEDERICO ROVERSI – <i>Ultrastruttura degli spermatozoi di Rhynchophorus ferrugineus</i> .....                                                                                                                                               | » 247    |



SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 15 NOVEMBRE 2013

Tavola Rotonda su:

IL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME:  
NUOVE ACQUISIZIONI E POSSIBILITÀ DI CONTROLLO DEMOGRAFICO

Coordinatori:

SANTI LONGO e PIO FEDERICO ROVERSI, Accademici



## IL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME: NUOVE ACQUISIZIONI E POSSIBILITÀ DI CONTROLLO DEMOGRAFICO

### INTRODUZIONE

SANTI LONGO (\*) - PIO FEDERICO ROVERSI (\*\*)

(\*) DiGeSA Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Catania, via Santa Sofia 100, 95123 Catania; longosan@unict.it

(\*\*) Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia, via di Lanciola 12/a, 50125 - Cascine del Riccio, Firenze, Italia; piofederico.roversi@entecra.it

Introduzione alla Tavola Rotonda "Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

L'asiatico coleottero Dryophthoridae *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), specie da quarantena inserita nella lista A2 dell'EPPPO noto come Punteruolo rosso delle palme, originario del Sud Est Asiatico e della Melanesia, a seguito del moltiplicarsi delle introduzioni accidentali causate dal trasporto di piante infestate risulta ormai ampiamente diffuso in Asia, Medio Oriente e Bacino del Mediterraneo. Il fitofago è stato inoltre segnalato anche nelle Isole Canarie e nei Caraibi. Il Coleottero è il principale insetto nocivo delle palme e la sua diffusione epidemica si configura ormai in varie aree come una vera e propria invasione biologica, in grado di determinare seri danni alle piantagioni produttive e stravolgimenti dell'impianto paesistico in quei territori ove le palme costituiscono un elemento qualificante della fisionomia degli ambienti.

In Italia il Punteruolo rosso, presumibilmente introdotto prima del 2004, si è rapidamente diffuso in molti centri urbani delle regioni rivierasche peninsulari e nelle isole maggiori, dove ha infestato principalmente *Phoenix canariensis* (Hortorum ex Chabaud), tanto che si ritengono attendibili le stime che valutano in oltre duecentomila gli esemplari di Palma delle Canarie attaccate, cui va aggiunto circa un migliaio di palme appartenenti ad altre specie. Da segnalare in particolare le infestazioni, pur sporadiche, sull'endemica *Chamaerops humilis* L.

Le problematiche fitosanitarie, economiche ed ecologiche sollevate dall'introduzione anche nel nostro Paese di questo nuovo "pest", hanno indotto ad avviare varie iniziative e progetti di ricerca per contenerne i danni.

Il Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAAF) in prosecuzione di un

primo progetto denominato DIPROPALM, nel 2012 ha avviato il Progetto Finalizzato Nazionale "PROPALMA – Protezione delle Palme ornamentali e spontanee dall'invasione biologica del Punteruolo rosso, *Rhynchophorus ferrugineus*", al quale partecipano le seguenti strutture del CRA: Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia di Firenze, Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie ornamentali di Sanremo, Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria di Monterotondo, Unità di Ricerca per il Recupero e la Valorizzazione delle Specie Floricole mediterranee di Bagheria. Al progetto PROPALMA collabora anche l'Enea con il laboratorio Utagri-Eco. Obiettivi specifici primari di questo progetto sono la messa a punto di tecniche e strumenti per una diagnosi precoce di piante asintomatiche, la verifica dell'efficacia di insetticidi di sintesi e di origine vegetale e di mezzi fisici per trattamenti curativi, la messa a punto di metodi e strumenti per il trattamento delle palme abbattute, l'individuazione di nemici naturali nelle aree di indigenato naturale del fitofago e negli ambienti di nuova introduzione suscettibili di impiego in programmi di controllo biologico e integrato.

L'Unione Europea ha finanziato il Progetto *PalmProtect* (Settimo programma - Project number FP7-KBBE-2011-5 -289566) "Strategies for the eradication and containment of the invasive pests *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier and *Paysandisia archon* Burmeister". Il progetto, avviato nel 2012, ha una durata: di 36 mesi e vede coinvolte 13 Istituzioni di ricerca Inglesi, Israeliane, Spagnole, Greche, Francesi, Slovene, Egiziane e Italiane. Obiettivi del *PalmProtect* riguardano lo studio della biologia nonché lo sviluppo di metodi affidabili per il monitoraggio e la dia-

gnosi precoce, nonché per l'eradicazione, il contenimento delle infestazioni del Punteruolo rosso e della Paisandisia delle palme da divulgare ai Servizi Fitosanitari Nazionali e ai Servizi di ispezione, nonché a coltivatori e altri utenti finali.

Nell'ambito della Società Entomologica Italiana è stato inoltre costituito uno specifico gruppo di lavoro su *Rynchophorus ferrugineus* cui hanno finora aderito ricercatori delle Università di Cata-

nia, Firenze, Milano, Roma, e Torino, nonché del CRA di Firenze e dell'ENEA di Roma.

La presente giornata vede coinvolti, per la presentazione di importanti contributi, molti degli studiosi italiani impegnati sulla tematica, con il fine di presentare una esaustiva panoramica di quanto la ricerca sta facendo e i risultati finora ottenuti per affrontare correttamente il problema Punteruolo delle palme.

## COMPORTAMENTO SOCIALE E RIPRODUTTIVO DEL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME: APPROFONDIRE LE CONOSCENZE PER CONTRASTARE QUESTO FLAGELLO

ALBERTO INGHILESI (\*) - GIUSEPPE MAZZA (\*) (\*\*)  
ALESSANDRO CINI (\*) - RITA CERVO (\*)

(\*) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Via Madonna del Piano 6, 50019 – Sesto Fiorentino, Firenze, Italia; rita.cervo@unifi.it

(\*\*) Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia, via di Lanciola 12/a, 50125 - Cascine del Riccio, Firenze, Italia.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *Social and reproductive behaviour of the red palm weevil: deepen the knowledge to better contrast this pest*

The many methods currently used for the prevention and management of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, are mostly ineffective or not sufficiently adequate to fight against this pest, which thus continues to spread relentlessly. Hence, the increasing of knowledge on the life history traits and behaviour of this species is crucial to both improve the currently management tools and develop new management strategies. Studies which investigated the red palm weevil reproductive biology showed that this species is characterized by marked aggregation phenomena, i.e. high densities inside palm trunks, which determine continuous and frequent social interactions among group members. Consequently, *R. ferrugineus* has promiscuous mating and social systems, which should be taken into account when implementing management tools. Moreover, chemical stimuli mediate the choice of the oviposition site, attracting females to lay eggs in already used sites. These studies highlighted the importance of deeply investigating the biology and the behavioural ecology of *R. ferrugineus* in order to properly develop and tune effective management strategies for this pest.

KEY WORDS: *Rhynchophorus ferrugineus*, palm weevil, palm pest, reproductive behavior, egg-laying behaviour.

*Rhynchophorus ferrugineus* rientra nello scenario delle specie aliene, essendo una specie che, a partire negli anni '80, ha ampliato il suo areale di distribuzione dal Sud Est asiatico, suo areale originario (WATTANAPONGSIRI, 1966; MURPHY & BRISCOE, 1999), al Medio Oriente e, successivamente, al Bacino del Mediterraneo, Australia, Cina, Giappone, California (ESTBAN-DURAN *et al.*, 1998; MURPHY & BRISCOE, 1999; ZHANG *et al.*, 2003; AL-AYEDH, 2008; YUEZHONG *et al.*, 2009), e più recentemente ai Caraibi (THOMAS 2010). Analogamente a quanto accade per molte specie aliene, nelle zone di recente colonizzazione la popolazione si è stabilizzata e, mancando di efficaci nemici naturali, sta proliferando diffondendosi assai velocemente. Nel nostro paese, ad esempio, questo insetto, comunemente conosciuto come punteruolo rosso delle palme, è stato segnalato per la prima volta nel un vivaio di Pistoia (SACCHETTI, 2005), dove è sicuramente giunto a seguito del commercio di palme infestate. Negli anni successivi il fenomeno è dilagato, e il coleottero, dopo aver distrutto le numerose palme delle Canarie del litorale del Meridione della nostra

Penisola (Sicilia, Campania, Calabria e Puglia, Abruzzo, Molise, Basilicata) sta diffondendosi inesorabilmente verso Nord (Sardegna, Marche, Lazio, Liguria, Veneto) ed è ricomparso nuovamente in Toscana nel 2011. Attualmente, quindi, il punteruolo rosso rappresenta un problema nazionale ed internazionale a causa della sua azione fitofaga distruttiva all'interno delle palme.

I danni provocati dal punteruolo rosso sono numerosi: danni paesaggistici oltre a quelli economici, problemi di inquinamento e di salute umana a causa dei prodotti utilizzati per la disinfestazione, ma anche preoccupazione per la diminuzione della biodiversità, dal momento che il coleottero è in grado di attaccare specie endemiche del Mediterraneo, come la palma nana, *Chamaerops humilis*.

Combattere il punteruolo rosso non è cosa semplice, dato che la sua presenza nella palma non viene manifestata durante le prime fasi dell'attacco. Nel momento in cui la palma mostra i sintomi dell'avvenuto attacco è spesso troppo tardi per prevenire la morte della pianta (FALEIRO, 2006): infatti, ai primi segni evidenti, come la per-

dità dell'apice vegetativo e il portamento a ombrello delle foglie, l'infestazione è già in stato avanzato e la sopravvivenza della palma, nella maggior parte dei casi, è ormai compromessa. Naturalmente, individuare precocemente la presenza delle larve del fitofago all'interno della pianta sarebbe auspicabile poiché potrebbe permettere di intervenire sulla palma prima della sua morte. I tentativi di individuare un metodo efficace che permetta l'individuazione della sua presenza si sono quindi moltiplicati, spaziando dall'utilizzo della termografia, dei termometri a sonda, della fotografia infrarossa e di microtelecamere, all'utilizzo di cani addestrati e dell'endoscopia (LONGO, 2008). Recenti progressi nel tentativo di utilizzare metodi bioacustici per individuare precocemente i suoni prodotti dal fitofago e dalle sue larve all'interno delle piante sono stati riportati da svariati autori (FIABOE *et al.*, 2011; MANKIN, 2011; MANKIN *et al.*, 2011; HERRICK & MANKIN, 2012). Tuttavia, tutti questi metodi non hanno ancora consentito di accertare con precisione le fasi iniziali delle infestazioni (LONGO, 2008). Non meno problematici si sono rilevati gli interventi curativi su piante già attaccate che richiedono utilizzo di insetticidi sistemici per controllare i vari stadi di sviluppo di questa peste. Infatti, sebbene siano stati individuati pesticidi efficaci (BARRANCO *et al.*, 1998; LLÁCER *et al.*, 2010; DEMBILIO *et al.*, 2010), non è tuttavia semplice raggiungere gli insetti target all'interno della pianta con i prodotti prescelti che, inoltre, possono presentare effetti dannosi alla salute umana. La tendenza attuale nella lotta al punteruolo rosso è mirata quindi alla ricerca di nemici naturali per attuare azioni di controllo biologico (vedi MAZZA *et al.* questo volume) o di lotta integrata; ma le conoscenze sui nemici naturali di questa specie sono al momento insufficienti per poter mettere in atto azioni di questo tipo.

Le misure attualmente utilizzate per il monitoraggio e la cattura massiva degli adulti sono basate sull'utilizzo di trappole innescate con il feromone di aggregazione sintetico; il composto è stato individuato da HALLETT e collaboratori (1993) ed è una miscela di due picchi principali: il 4-methyl-5-nonanolo e il 4-methyl-5-nonanone. Queste trappole si basano sullo sfruttamento di un tratto del comportamento della specie e permettono di catturare con successo adulti di entrambi i sessi, soprattutto femmine giovani, fertili o gravide. La loro attrattività viene amplificata dall'azione sinergica dei prodotti della fermentazione di origine vegetale (FALEIRO, 2006).

Come risulta evidente da quanto sopra esposto, i metodi di prevenzione e di eradicazione attuali

risultano per lo più inefficaci o non sufficientemente adeguati per contrastare questo flagello che continua a diffondersi inesorabilmente nonostante la mobilitazione messa in atto per contrastarlo. A nostro avviso, è quindi di primaria importanza fare un passo indietro, cioè aumentare le conoscenze sulla biologia e sul comportamento di questa specie per individuare nuovi aspetti su cui intervenire. In particolare, è importante esplorare aspetti legati alla sua riproduzione dato che tali conoscenze sono alla base dei possibili interventi per cercare di limitarne la diffusione.

Sebbene siano numerosissimi gli studi fatti recentemente su questa specie, essi riguardano essenzialmente i sistemi per il suo controllo, mentre poca attenzione è stata dedicata alla sua biologia. In particolare il sistema nuziale e le interazioni sessuali nel punteruolo rosso delle palme sono scarsamente studiati (AL-AYEDH & RASOOL, 2010).

Quello che è noto sull'accoppiamento deriva da studi condotti in condizioni di laboratorio dove questi animali vengono tenuti in coppie. In natura, nelle aree di nuova introduzione, gli individui di questa specie vivono in gruppi molto numerosi all'interno della palma e l'accoppiamento avviene in un ambiente promiscuo che contrasta con l'abituale allevamento degli animali in laboratorio. Abbiamo quindi voluto condurre delle osservazioni su aggregati promiscui di animali, in condizioni di laboratorio per simulare il più possibile le condizioni in cui gli animali si ritrovano in natura. Le osservazioni sono state condotte su gruppi di 40 animali (20 femmine e 20 maschi posti in una teca di vetro (45x25x27 cm) immediatamente prima dell'osservazione) per un'ora consecutiva immediatamente dopo aver creato il gruppo promiscuo, dopo 4 giorni e dopo 10 giorni. Quello che emerso è un elevato tasso di interazioni (per lo più accoppiamenti e tentativi di accoppiamento) immediatamente dopo che gli animali venivano messi insieme per poi calare nel corso del tempo (668 interazioni sessuali nella prima osservazione, 244 nella seconda e 240 nella terza; esiste una significativa differenza tra i dati della prima e della seconda osservazione ( $t=6.686$ ,  $df=17$ ,  $p<0.001$ ) e tra quelli della prima e della terza ( $t=6.013$ ,  $df=17$ ,  $p<0.001$ ); mentre non c'è differenza significativa fra i dati della seconda e della terza ( $t=0.150$ ,  $df=17$ ,  $p=0.882$ )). Questi risultati indicherebbero una certa «frenesia» di accoppiamento in aggregati appena costituiti, molto probabilmente per effetto dell'emissione del feromone d'aggregazione. Il calo della frequenza delle interazioni registrate nel corso del tempo sembrerebbe indicare che la formazione di connessioni fra i membri del gruppo rappresenta una condizione necessaria fra gli indi-

vidui di questa specie. Una volta che il gruppo si è “conosciuto”, le interazioni si stabilizzano e si riducono numericamente. Le nostre condizioni sperimentali potrebbero quindi simulare il momento di colonizzazione di una pianta ospite da parte del punteruolo rosso quando, grazie al feromone rilasciato dai maschi, avviene una aggregazione di individui di entrambi i sessi su una pianta. Possiamo quindi immaginarci relazioni molto intense nelle prime fasi della colonizzazione che poi calano e si stabilizzano al passare del tempo. Seppur la frequenza delle interazioni cali nelle tre osservazioni effettuate, è emerso che gli animali continuano ad essere altamente connessi, continuando ad interagire tra di loro. Risulta evidente che sono i maschi ad iniziare le interazioni, in particolare gli accoppiamenti, e cercano attivamente le femmine, mentre queste ultime sono passive.

Questi studi evidenziano che il sistema sessuale del punteruolo, quando osservato in condizioni analoghe a quelle che si trovano all'interno di una palma, è altamente promiscuo e che le interazioni tra individui permangono nel tempo e gli individui sono ampiamente interconnessi. Queste osservazioni possono essere di interesse per strategie di lotte basate sull'utilizzo di patogeni che devono diffondersi all'interno della popolazione. Infatti abbiamo visto che gli animali sono altamente interconnessi e questo permetterebbe ai patogeni di diffondersi rapidamente nella popolazione.

Altro aspetto di cui ci stiamo occupando che risulta essere centrale per la lotta a questo flagello riguarda l'attività di deposizione, dato che le femmine depongono un elevato numero di uova (da qualche decina a molte centinaia per femmina). Osservando le coppie allevate in laboratorio abbiamo osservato una certa preferenza delle femmine ad utilizzare per la deposizione un substrato già utilizzato a questo scopo. Semplici saggi di scelta binaria condotti in laboratorio, hanno mostrato molto chiaramente che le femmine preferiscono deporre su un substrato già utilizzato per la deposizione (MAZZA *et al.*, in prep.). A prima vista, questo risultato potrebbe non sembrare biologicamente vantaggioso, in quanto deporre le uova in uno stesso sito può portare ad un aumento della competizione per le risorse trofiche tra le larve che ne nasceranno. In realtà, abbiamo recentemente mostrato che le larve di questa specie (come pure gli individui adulti) presentano sulla loro cuticola delle sostanze antimicrobiche attive contro svariati microorganismi (MAZZA *et al.*, 2011). Analisi chimiche hanno inoltre permesso di evidenziare che le molecole responsabili di questa attività antimicrobica sarebbero dei composti polari di medio peso molecolare (MAZZA *et al.*,

2011). Quindi, utilizzare per la deposizione delle uova un substrato già utilizzato da altri individui assicurerebbe alla prole una certa protezione nei confronti di patogeni. Ulteriori esperimenti saranno necessari per chiarire se questa preferenza sia indotta come semplice “by-product” dell'azione di aggregazione del maschio o se uno dei composti che costituiscono il feromone di aggregazione abbia un ruolo nella deposizione. Naturalmente, l'individuazione di un composto a valenza feromonale che induca le femmine a deporre le uova in un particolare substrato potrebbe avere un possibile interesse applicativo.

In conclusione, possiamo affermare che la biologia di questa specie è caratterizzata dalla presenza di fenomeni di aggregazione, nei quali l'alta densità di popolazione all'interno della palma determina continue e diffuse interazioni sociali tra i vari membri del gruppo. Questo porta ad un comportamento sessuale altamente promiscuo, di cui è necessario tener conto quando si sviluppano ed attuano strategie di lotta. Inoltre, stimoli di natura chimica mediano la scelta del substrato di deposizione che porta le femmine a prediligere siti già utilizzati portando gli stadi immaturi a svilupparsi a stretto contatto gli uni con gli altri. Tale situazione, probabilmente, protegge maggiormente gli stadi immaturi dall'attacco di patogeni e crea un microclima favorevole (ad esempio aumento della temperatura) che ne favorisce lo sviluppo. È quindi fondamentale aumentare le conoscenze biologiche ed eto-ecologiche di questa specie, le quali sembrano molto promettenti per lo sviluppo e la messa a punto di efficaci strategie per la gestione di questa specie.

#### RINGRAZIAMENTI

Grazie a C. Baldacci, I. Pepiciello, S. Mattioli, D. Baracchi, F. Calori, N.V. Asaro e L. Pizzocaro per il loro aiuto durante lo svolgimento degli esperimenti e al Prof. S. Longo per il costante supporto fornito durante le ricerche.

#### RIASSUNTO

I numerosi metodi di prevenzione e di controllo del Punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus*, attualmente utilizzati, risultano per lo più inefficaci o non sufficientemente adeguati per contrastare questo flagello che continua a diffondersi inesorabilmente. È quindi di primaria importanza aumentare le conoscenze sulla biologia e sul comportamento di questa specie sia per migliorare i metodi di controllo e di lotta attuali che per individuare nuovi aspetti su cui basare futuri interventi. Studi condotti su aspetti legati alla sua riproduzione hanno

messo in evidenza che la biologia di questa specie è caratterizzata dall'aggregazione; ovvero l'alta densità di popolazione all'interno della palma regola le interazioni sociali continue e diffuse tra i membri del gruppo. Questo porta ad un comportamento sessuale altamente promiscuo di cui è necessario tener conto quando si attuano strategie di lotta. Inoltre, stimoli di natura chimica mediano la scelta del substrato di deposizione che porta le femmine a prediligere siti già utilizzati. Gli studi condotti fino ad ora sottolineano l'importanza di ampliare le conoscenze biologiche ed eto-ecologiche, essenziali per poter mettere a punto efficaci strategie per la gestione di questa specie.

## BIBLIOGRAFIA

- AL-AYEDH H., 2008 – *Evaluation of date palm cultivars for rearing the red date palm weevil*, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). - Flo. Entomol., 91 (3): 353-358.
- AL-AYEDH H. Y., RASOOL K.G., 2010 – *Sex ratio and the role of mild relative humidity in mating behaviour of red date palm weevil Rhynchophorus ferrugineus Oliv. (Coleoptera: Curculionidae) gamma-irradiated adults*. - J. Appl. Entomol., 134 (2): 157-162.
- BARRANCO P., DE LA PENA J., MARTIN M.M., CABELLO T. 1998 – *Efficiency of chemical control of the new palm pest Rhynchophorus ferrugineus*. - Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 24, 301-306 (in Spanish).
- DEMBILIO O., LLÁCER E., MARTÍNEZ DE ALTUBE M. M., JACAS J.A., 2010 – *Field efficacy of imidacloprid and Steinernema carpocapsae in a chitosan formulation against the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) in Phoenix canariensis*. - Pest Manag. Sci., 66:365-370.
- ESTEBAN-DURAN J., YELA J.L., BEITIA CRESPO F., JIMENEZ ALVAREZ A., 1998 – *Biology of red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae: Rhynchophorinae), in the laboratory and field, life cycle, biological characteristics in its zone of introduction in Spain, biological method of detection and possible control*. - Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 24: 737-748.
- FALEIRO J.R., 2006 – *A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years*. - Int. J. Trop. Insect Science, 26: 135-154.
- FIABOE, K.K.M., MANKIN, R.W., RODA, A.L., KAIRO, M.T.K., JOHANNIS C., 2011 – *Pheromone-food-bait trap and acoustic surveys of Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) in Curacao*. - Flo. Entomol., 94: 766-773.
- HALLET R.H., GRIES G., GRIES R., BORDEN J.H., CZYZEWSKA E., OEHLISCHLAGER A.C., PIERCE H.D. JR., ANGERILLI N.P.D., RAUF A., 1993 – *Aggregation pheromone of two Asian palm weevils, Rhynchophorus ferrugineus and R. vulneratus*. - Naturwissenschaften, 80: 328-331.
- HERRICK N. J., MANKIN, R. W. 2012 – *Acoustical Detection of Early Instar Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) in Canary Island Date Palm, Phoenix canariensis (Arecales: Arecaceae)*. - Flo. Entomol., 95(4): 983-990.
- LLÁCER E., DEMBILIO O., JACAS J. A., 2009 – *Evaluation of the efficacy of an insecticidal paint based on chlorpyrifos and pyriproxyfen in a microencapsulated formulation against Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae)*. - J. Econ. Entomol., 103: 402-408.
- LONGO S., 2008 – *Biologia del Punteruolo rosso delle palme e prove di lotta in Sicilia*. - Dies Palmarum Sanremo 12.
- MANKIN R. W., 2011 – *Recent developments in the use of acoustic sensors and signal processing tools to target early infestations of red palm weevil in agricultural environments*. - Flo. Entomol., 94: 761-765.
- MANKIN R.W., HAGSTRUM D.W., SMITH M.T., RODA A., KAIRO M.T.K., 2011 – *Perspective and promise: a century of insect acoustic detection and monitoring*. - American Entomol., 57: 30-44.
- MAZZA G., ARIZZA V., BARACCHI D., BARZANTI G.P., BENVENUTI C., FRANCARDI V., FRANDI A., GHERARDI F., LONGO S., MANACHINI B., PERITO B., RUMINE P., SCHILLACI D., TURILLAZZI S., CERVO R., 2011 – *Antimicrobial activity of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus*. - Bull. Insectology, 64 (1): 33-41.
- MURPHY S.T., BRISCOE B.R., 1999 – *The red palm weevil as an alien invasive: biology and prospects for biological control as a component of IPM*. - BioControl, 20: 35-45.
- SACCHETTI P., CAMÈRA A., GRANCHIETTI A., ROSI M.C., MARZIALETTI P., 2005 – *Prima segnalazione in Italia del curculionide delle palme, Rhynchophorus ferrugineus*. - A cura del Ce.Spe.Vi.Pistoia, 7 pp.
- THOMAS M.C., 2010 – *Giant palm weevils of the genus Rhynchophorus (Coleoptera: Curculionidae) and their threat to Florida palms*. - Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. DACS-P-01682: 1-2.
- WATTANAPONGSIRI A. L., 1966 – *Revision of the genera Rhynchophorus and Dynamis (Coleoptera: Curculionidae)*. Bulletin 1, Department of Agriculture Science, Bangkok, Thailand, pp. 328.
- YUEZHONG L., ZENG-RONG Z., RUITING J., LIAN-SHENG W., 2009 – *The red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera, Curculionidae) newly reported from Zhejiang, China and update of geographical distribution*. - Flo. Entomol., 92 (2): 386-387.
- ZHANG R.Z., REN L., SUN J.H., WU J., ZENG R., 2003 – *Morphological differences of the coconut pest insect, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier), and its related species (Coleoptera: Curculionidae)*. - China Forest Insect Pests and Diseases, 22 (2): 3-6.

## PRELIMINARY ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY AND DIFFERENTIATION OF ASIAN AND MEDITERRANEAN POPULATIONS OF RED PALM WEEVIL

ALESSIO DE BIASE (\*) - SILVIA BELVEDERE (\*) - GABRIELE SENIA (\*) - VERONICA MARCARI (\*)  
ALESSANDRA LA MARCA (\*\*) - LIEN VAN VU (\*\*\*) - MASSIMO CRISTOFARO (\*\*\*\*)

(\*) *Dip.to di Biologia e Biotecnologie "C. Darwin", Viale dell'Università 32, 00185 Rome, Italy; alessio.debiase@uniroma1.it*

(\*\*) *BBCA-onlus, Via del Bosco 10, 00060, Sacrofano (RM), Italy.*

(\*\*\*) *Vietnam National Museum of Nature, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam.*

(\*\*\*\*) *ENEA C.R.Casaccia UTAGRI-ECO, Via Anguillarese 301, 00123 S. Maria di Galeria (Rome), Italy.*

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico".  
Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *Preliminary analysis of genetic variability and differentiation of Asian and Mediterranean populations of Red Palm Weevil*

The Red Palm Weevil (RPW) is a pest beetle belonging to the family Dryophoridae (Curculionoidea) associated with more than twenty species of palms in the family Arecaceae. RPW is the main pest of the date palm *Phoenix dactylifera*, one of the most common and widely grown palm. Native to Southeast Asia and Melanesia, where it is responsible for serious damage to plantations of the coconut palm, currently RPW has expanded its distribution range eastwards to China and Japan and westwards to the Middle East, the Mediterranean Basin and the Caribbean. This paper provides a brief summary of the preliminary analyses performed to estimate the degree of genetic variation in natural populations of RPW sampled from the primary and secondary distribution areas, by using SSR loci and a mtDNA marker. Our findings show that the Mediterranean Basin is the area of lowest genetic variability, characterized by a very homogeneous population, followed by the Asian region, that is the area of primary distribution. The Middle East is currently the area with the higher genetic variation likely due to multiple invasion events. The Arab Peninsula in fact has likely played a role as bridgehead towards the Mediterranean Basin. Our data confirm also that southeastern Asia is the area of origin of dispersal events eastwards and westwards.

KEY WORDS: Red Palm Weevil, invasive species, pyrosequencing 454, microsatellites, mtDNA, genetic variability.

### INTRODUCTION

The Red Palm Weevil (RPW) *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), 1790, is a large beetle, generally more than 25 mm in length, belonging to the family Dryophoridae (Curculionoidea). It is a pest species with a wide trophic ecology associated with more than twenty species of palms in the family Arecaceae, including several species of economic interest such as the Canary Island palm (*Phoenix canariensis*), the date palm (*Phoenix dactylifera*), the coconut palm (*Cocos nucifera*) and the oil palm (*Elaeis guineensis*) (MURPHY & BRISCOE, 1999; EL-MERGAWY & AL-AJLAN, 2011). Damages are due to larval stages that burrow into the trunk (or into the basal shoots) of the host plants, causing the falling of the leaves, permanent damages of the apical bud, and the death when reaching the main meristem (FALEIRO, 2006; EL-MERGAWY & AL-AJLAN, 2011).

RPW is included in the EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) A2 list for quarantine pests (EPPO, 2008) because it

is the main pest of the date palm *Phoenix dactylifera*, one of the most common and widely grown, both for food and ornamental purposes, in arid regions of the Middle East and North Africa. This palm is exported to many countries of the Mediterranean basin, including Italy, where it is widely used as an ornamental plant in the urban centers and along the coastal roads.

RPW is native to Southeast Asia and Melanesia, where it is responsible for serious damage to plantations of the coconut palm; it reached in the eighties the United Arab Emirates as a result of trade in specimens of infected palms (GUSH, 1997; ABRAHAM *et al.*, 1998; FERRY & GOMEZ, 2002), and from there it spread to the Middle East (FAGHIH, 1996) and in almost all the countries of the southern Mediterranean Basin since the early 90s (COX, 1993; BARRANCO *et al.*, 1996; KEHAT, 1999; FERRY & GOMEZ, 2002). Currently, it has expanded its distribution range eastwards to China and Japan and westwards to the Middle East, the Mediterranean Basin and the Caribbean. The record for USA (Laguna Beach, California)

must be referred to the strictly related species *R. vulneratus* (Panzer), 1798 (RUGMAN-JONES *et al.*, 2013). The first record for Italy dates back to 2004, near Pistoia; in the following year it was found in Sicily and quickly spread to the north of the peninsula. It is estimated that, to date, the weevil has already caused the death of several thousands palm trees in Sicily, Campania, Lazio, Basilicata, Puglia and many other regions. Outbreaks are also present in Sardinia, Calabria, Liguria and Marche (LONGO & COLAZZA, 2009).

During the last decade many studies were focused on the genetic variation and differentiation of RPW populations. These studies were based upon RAPD or mtDNA markers (SALAMA & SAKER, 2002; AL-AYIED *et al.*, 2006; EL-MERGAWY *et al.*, 2011); one of them was a contribution to set up SSR loci (CAPDEVIELLE-DULAC *et al.*, 2012). However, all these studies have used small data-sets, including specimens mainly from the invaded areas of the current distribution range. A more accurate study was recently reported by RUGMAN-JONES and colleagues (2013) that sampled many populations from the primary and secondary distribution range. These authors have resurrected *R. vulneratus*, previously synonymized with *R. ferrugineus* by HALLETT and colleagues (2004), and made an interesting account of the invasion dynamics of RPW based upon mtDNA *coxI* marker.

This paper is intended to provide a brief summary of the preliminary analyses aimed at estimating the degree of genetic variation in natural populations of RPW sampled from both the primary and secondary (invaded) distribution areas. The analyses were carried out during the development of microsatellite loci to study the reproductive biology and the process of invasion of RPW. We briefly describe the methodological approach used for the development of the microsatellite markers, based on Next Generation Sequencing, and then we report the estimates of genetic variability and few demographic parameters useful for the understanding of the invasion process.

## MATERIALS AND METHODS

The samples used in this study were collected by our research team or provided by kind collaborators who collected specimens from circummediterranean areas, the Middle East and regions of Southeast Asia. A total of 58 specimens were analysed: 14 were collected from several

Italian regions, 5 from Greece, 15 from the Arabian Peninsula, 4 from China, 10 from Vietnam and 10 from Malaysia.

DNA extraction was performed starting from two legs removed from each sampled individual using a phenol/chloroform protocol as in CRISTOFARO *et al.* (2013).

### Development of SSR loci

Microsatellites loci (SSR) have always been widely used in studies of genetic variability of natural populations, particularly in the reconstructions of migratory routes and demographic phenomena of invasive alien species. They are in fact codominant genetic markers showing high resolving power owing to large variability and a relative ease of use. However, *de novo* isolation of SSR loci is often required because of very low efficiency in cross amplification even between closely related species. The classical method, always rather time- and money-consuming, is grounded on the construction of genomic libraries by cloning; the selection of clones with hybridization of specific probes bearing the repeats of interest; the Sanger sequencing of the clone inserts and the design of primers for subsequent amplifications of the regions that include the identified microsatellite (ZANE *et al.*, 2002). In recent years a more efficient approach has been developed that makes use of bioinformatics techniques to search and identify microsatellite repeats in large assemblages of nucleotide sequences. The advent of next-generation sequencing techniques, allowing to get huge amount of DNA sequences, even entire genomes, with high accuracy and in a very short time, fostered this approach. It is a very innovative strategy, efficient, fast, and fairly cheap (ABDELKRIM *et al.*, 2009), which is a tremendous step forward, especially in the case of non-model organisms (such as the Red Palm Weevil) for which genomic data are almost not available. The first studies that have employed this approach have highlighted the high success rate and the number of advantages over classical techniques (ALLENTOFT *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2009; CASTOE *et al.*, 2010; PERRY & ROWE, 2011), thus foreseeing that it will be the primary choice in the future for the development of microsatellite markers.

By means of the Roche 454 GS FLX platform with Titanium chemistry available at the BMR Genomics facility (Padua, Italy), we performed a pyrosequencing run (1/8 of a PicoTiterPlate) on the total genomic DNA extracted from a single RPW specimen. The next bioinformatic analyses were performed under user-defined criteria (DE BIASE *et al.*, in prep.) with specific software tools (QDD

program by MEGLÉCZ *et al.*, 2010; PRIMER 3 program by ROZEN & SKALETSKY, 1999) to identify reads and contigs containing microsatellites with simple perfect repeats, and to design the PCR primers to allow for *in vitro* amplification. Then, we set up the PCR protocols for 37 SSR loci and tested for the presence of multiple alleles by performing PCR reactions on a set of specimens sampled from the Mediterranean Basin, the Middle East, Vietnam and Malaysia. The PCR products were scored by polyacrylamide and agarose electrophoresis; then the selected loci (19) were amplified with fluorescent primers for the set of 58 specimens. All specimens were genotyped by means of an ABI 3730XL capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and GENESCAN software at the Macrogen Inc. (Korea) facility. The scoring of the alleles was done by using the MICRO-SATELIGHT (PALERO *et al.*, 2011) and PEAK SCANNER (Applied Biosystems, 2006) software tools. Genotyping errors, null alleles and large allele dropout evidences were tested with MICRO-CHECKER v. 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

#### *Mitochondrial marker sequencing*

The total genomic DNA was used as template to amplify, for each of the 58 sampled specimens, a fragment of the mitochondrial genome coding for the cytochrome c oxidase subunit I (*coxI*). The Folmer's primers LC01490 and HC02198 (FOLMER *et al.*, 1994) were used to amplify the 5' upstream region of the *coxI* gene or the primer TY-J-1460 (SIMON *et al.*, 1994) with the cited reverse one (HC02198). Complete details of the laboratory procedure are reported in RECTOR *et al.* (2010). The obtained sequences were screened by a blast search over the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank nucleotide collection using the Mega BLAST procedure (WHEELER *et al.*, 2007) available at its website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Retained sequences were edited and aligned using the STADEN PACKAGE ver 2006.1.7.0 software (STADEN *et al.*, 2000). All peaks were checked for wrong base calls and noise and were cleaned when required. The alignment was visually assessed without requiring any insertion–deletion (indel) typing.

#### *Statistical analyses*

Standard descriptive statistics (e.g. number and size range of alleles, number of repetitions, etc.) for the 19 selected SSR loci were computed by using the package MICROSATELLITE ANALYZER (MSA) ver. 4.05 (DIERINGER & SCHLÖTTERER, 2003). Further statistical analyses were performed

in GENEPOP ver. 4.2.1 (ROUSSET, 2008) to perform tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and to estimate main indices of diversity within and between populations as the observed and expected heterozygosity, the allelic richness index ( $A_r$ ) and the Wright's  $F_{ST}$  (WRIGHT, 1951; 1969) to assess the structure and the level of differentiation among populations. The software package MEGA ver. 5.2 (TAMURA *et al.*, 2011) was used to perform the statistical analyses to describe the variability of the *coxI* nucleotide sequences; the number of variable sites and parsimony informative sites were computed along with the number of haplotypes observed for each sampled population. The indices of haplotype ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were computed with the program DNASP ver. 5.10 (LIBRADO *et al.*, 2009).

A Bayesian analysis was performed using MRBAYES ver. 3.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001; RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) under the substitution model selected by reversible-jump MCMC. The analysis was carried out using random starting trees and running 6 millions of generations with Markov chains sampled every 500 generations. To ensure sampling of topologies after chains convergence, we discarded the first 25% of trees as burn-in. The remaining trees were combined into a 50% majority rule consensus tree; the percentage of samples recovering a given clade reflects the posterior probability of the clade.

The Tajima's D test (TAJIMA, 1989) and the Fu's  $F_s$  test (FU, 1997) were carried out, on *coxI* data, with the software DNASP ver. 5.10 (LIBRADO *et al.*, 2009) to test for demographic trends (expansion or contraction) of sampled populations that showed non zero variability values. Both D and  $F_s$  statistics assume negative values when populations had likely undergone demographic expansion, or positive values whether they have recently faced a bottleneck or a gradual decline. Finally, the hypothesis that the invasive populations have undergone recent bottlenecks was tested by analysing the microsatellite data using the software BOTTLENECK ver. 2.1.02 (CORNUET & LUIKART, 1996; PIRY *et al.*, 1999), which estimates the excess of heterozygosity in all the populations sampled over several evolutionary models.

## RESULTS

### *SSR loci and mitochondrial *coxI* sequences*

The next-generation 454 sequencing technology produced more than 70 000 reads with average length of 269bp. Among these, 98 unique candidate sequences were identified that

contained SSR simple motifs satisfying our selection criteria. Thirty-seven sequences including repeats flanked by suitable priming sites were chosen for conversion into SSR loci. We were able to amplify 22 loci out of 37 in a specific and reproducible way. Two loci were discarded because we failed to align the obtained Sanger sequences to the reference 454 reads, thus suggesting the presence of not specific PCR amplicons. Four loci showed no polymorphic pattern by means of agarose and polyacrylamide electrophoresis assays and were no further considered. The final 16 selected loci were amplified and analysed in order to score specimens genotypes; they showed the expected polymorphic pattern with the number of alleles per locus ( $N_a$ ) that ranged between 2 and 13 and a mean allele number per locus of 4.47. No evidences of large allele dropout or genotyping errors due to stutter peaks were scored, albeit homozygosity excess suggests the presence of null alleles at 4 loci in some populations.

Regarding the *coxI* mitochondrial gene, a fragment of 632bp was obtained from each of the 58 specimens. Thirty-four variable sites (5.5% of total) were scored and 29 of these (4.6% of the total) are informative for parsimony. As expected for a mitochondrial gene, the base composition is biased towards a higher proportion of A-T (60.7%); transversions were completely absent.

#### Statistical analyses

Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), both over the whole data-set and by geographical area, showed significant variation from equilibrium at 8 loci. No evidence of linkage disequilibrium (GENEPOP:  $p$  values for each pairwise population comparison  $> 0.05$ ) was revealed.

Comparisons between the estimates of observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity computed over the SSR loci, overall show levels of observed heterozygosity lower than expected, with a more pronounced divergence in the Asian region ( $H_e = 0.51$ ;  $H_o = 0.31$ ). Allelic richness ( $A_r$ ) is the highest in Asia ( $A_r = 3.79$ ) compared to that of the Mediterranean Basin ( $A_r = 3.00$ ), with the highest values in Vietnam ( $A_r = 3.26$ ) followed by the Arab region ( $A_r = 2.63$ ).

Regarding the estimates of genetic variability computed over *coxI* sequence data, the Mediterranean Basin exhibits lower variability than Asia, having a smaller number of haplotypes ( $k$ ) and the lowest indices of haplotype ( $h$ ) and nucleotide ( $\pi$ ) diversity (Mediterranean Basin:  $k = 4$ ,  $h = 0.572$ ,  $\pi = 0.0042$ ; Asia:  $k = 7$ ,  $h = 0.797$ ,  $\pi = 0.0171$ ). Within the secondary distribution

range, the region with the highest variability was found to be the Arab peninsula showing the largest number of haplotypes ( $k = 4$ ) and the largest number of polymorphic sites along the alignment ( $S = 23$ ). Individuals from Italian, Greek and Chinese regions display a single haplotype per region.

The test of Tajima's  $D$  suggested, with good statistical confidence ( $p < 0.05$ ), a demographic expansion of the populations in the Arab and Malaysian regions (Arab region:  $D = -1.765$ ; Malaysia:  $D = -1.944$ ); although with less statistical support, the same trend is scored for the populations in Vietnam ( $D = -0.521$ ). Similarly, the  $F_s$  test of Fu is negative ( $p < 0.001$ ) for the populations in Arab region and for the populations in Vietnam and Malaysia (Arab region:  $F_s = -13.691$ ; Vietnam:  $F_s = -13.714$ ; Malaysia:  $F_s = -10.011$ ), indicating that the populations sampled in these areas have undergone, or are still undergoing, recent phenomena of expansion. The analysis performed with the software BOTTLENECK of microsatellite data revealed evidence of recent bottlenecks for the populations in Malaysia and in the Italian and Arab regions ( $p < 0.05$ ).

The tree produced by the Bayesian analysis shows two clusters (marked as 1 and 2; Fig. 1) with good statistical support. The cluster #1 ( $pp = 0.9996$ ) includes the populations from the Mediterranean Basin and from Malaysia, while the cluster #2 ( $pp = 0.9996$ ) includes the populations from China, Vietnam and a single specimen from the Arab region. Genetic distances  $p$  were computed within and between the two main clusters (within: cluster #1  $p \approx 0.4\%$ ; cluster #2  $p \approx 1.3\%$ ; between clusters #1-2  $p \approx 1.7\%$ ), indicating a greater genetic differentiation among individuals sampled in China and Vietnam than among those from the Mediterranean Basin, the Middle East and Malaysia.

Estimates of  $F_{ST}$  calculated over the SSR loci, show a greater genetic relationship between the Arab region and Malaysia than between the former and Vietnam, corroborating the evidence from the phylogenetic analyses previously reported. The  $F_{ST}$  values also show small differentiation between the Arab region and the Mediterranean Basin's sampled regions (Italy and Greece), suggesting that the RPW specimens introduced to Italy and Greece likely dispersed not directly from the primary distribution range, but from the former region, probably acting as bridgehead area. Within the primary distribution area, Vietnam and Malaysia show a moderate differentiation, while the Chinese region exhibits a pronounced genetic differentiation from the other sampled areas.

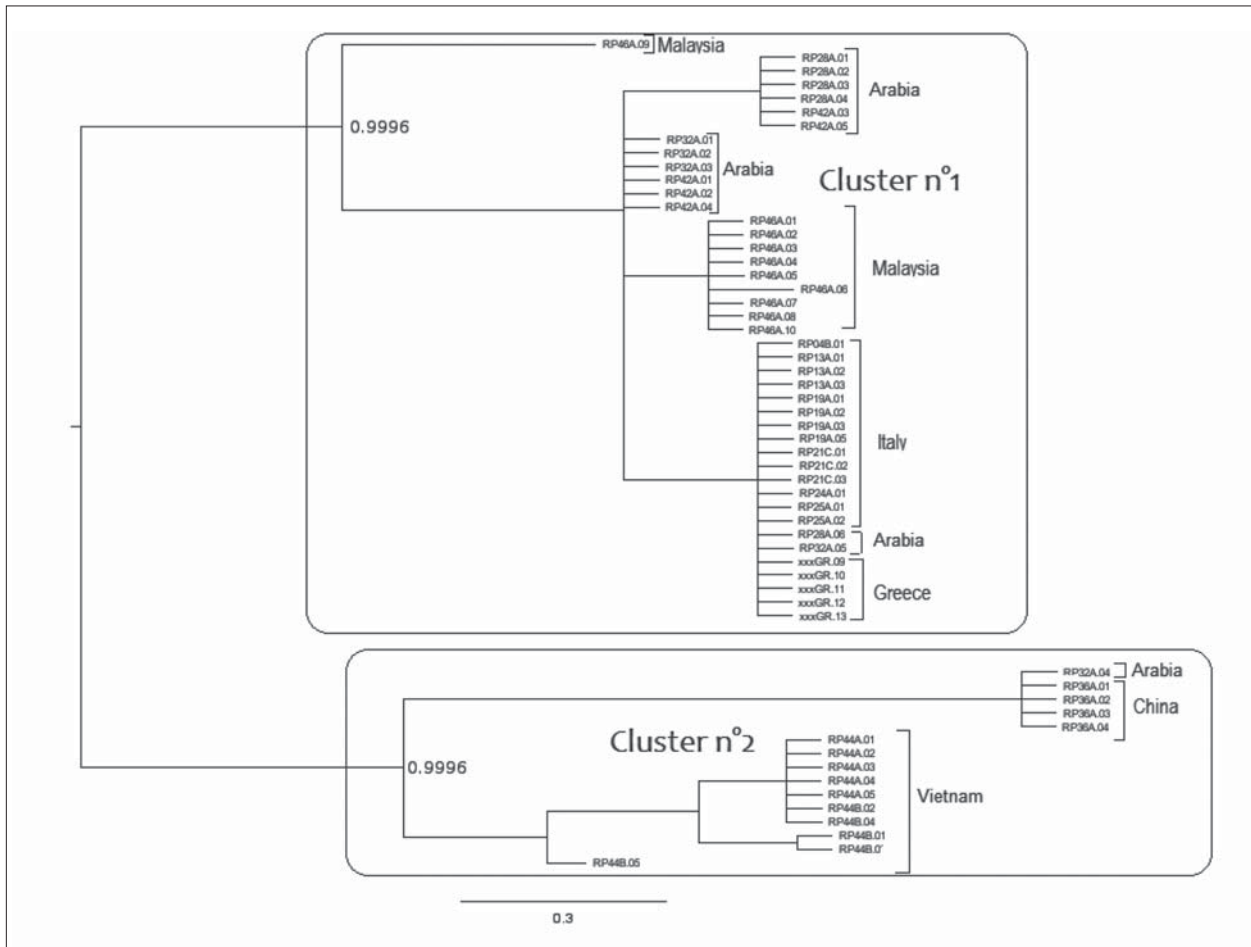


Fig. 1

Bayesian phylogenetic tree based upon *coxI* sequence data; node figures refer to posterior probability support.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The use of the 454 pyrosequencing technology along with a bioinformatic mining strategy has proven to be a very efficient approach in the development of a completely new panel of microsatellite markers for a non-model organism such as the Red Palm Weevil. The methodology allowed to develop in a very time- and money-reduced way, 16 new SSR polymorphic loci, that in turn allowed for the estimation, albeit preliminary, of the levels of genetic variability of several RPW populations in the primary and secondary distribution range, and to formulate some hypotheses regarding the invasion dynamics of this harmful pest species.

Regarding the genetic variability, the populations sampled from the invaded areas exhibit an overall reduced genetic variability compared to the populations from the primary distribution area. This finding is in agreement with what is expected for an invasive species because of the bottleneck events that frequently characterize the

colonization of new geographical areas. The results of the analysis of the genetic differentiation among the sampled areas is of particular interest. Both the genetic markers (SSR and *coxI*) indicate a more strict relationship between Malaysia, among the sampled Asian regions, and the areas of the Mediterranean Basin and the Middle East. This result seems to suggest that Malaysia has played an important role in the invasion dynamics of the RPW, and that it is the area of origin (based on the currently available data) of the population that invaded the Middle East and the Mediterranean Basin. The Arab region seems to be of particular interest because it appears to have had a bridgehead role for the dispersal of the RPW populations towards the Mediterranean Basin and because exhibited several evidences fostering the hypothesis that multiple introduction events have occurred to this geographical area. The demographic analysis also suggest that the RPW population of this region is currently growing, thus recommending to strengthen the monitoring actions of the trades between the

Middle East and the other western geographical areas.

Our results represent a very preliminary contribution to the study of the demography and of the invasion process of RPW, based upon both nuclear and mitochondrial genetic markers. Our sampling is very narrow and the results here discussed must be interpreted with some caution, mainly to plan a more accurate effort in order to tackle the study of the invasion of the Red Palm Weevil.

Our findings show that the Mediterranean Basin is the area of lowest genetic variability, characterized by a very homogeneous population, followed by Asian region, that is the area of primary distribution. The Middle East is currently the area with the highest genetic variation likely due to multiple invasion events that reached the Arab Peninsula, which likely played a role as bridgehead towards the Mediterranean Basin. Our data confirm also that southeastern Asia is the area of origin of dispersal events eastwards and westwards.

In the future, a deeper sampling will allow for a more accurate reconstruction of the invasion routes, the demography and the evolutionary dynamics that are currently shaping the Red Palm Weevil populations, both from the primary and secondary distribution range.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to all colleagues and friends that helped in some way our effort; many of them by collecting samples to be analysed and many others in supporting our activities in various way. They are: S.A. Aldosari (King Saud University, Saudi Arabia), S. Arnone (Enea Casaccia, Rome), L. Bartolozzi (University of Florence), R. Cervo (University of Florence), A. Cline (California Department of Food & Agriculture, Sacramento, USA), E. Colonnelli (Rome), F. Di Cristina (BBCA Onlus, Rome), M. Di Giovanni (Bioparco, Rome), M. Guedj (BBCA Onlus, Rome), J. Jones (Flowers of Crete, Greece), S. Longo (University of Catania), G. Mazza (CRA, Florence), S. Musmeci (Enea Casaccia, Rome), A. Paolini (BBCA Onlus, Rome), P. Roversi (CRA, Florence), R. Sasso (Enea Casaccia, Rome), M. Montagna (University of Milan), J. Ng (Kota Baru, Malaysia), L. Ren (Chinese Academy of Sciences, China), P.S.P.V. Vidyasagar (King Saud University, Saudi Arabia).

This work was carried out with the financial support of Sapienza University of Rome within the Project FARI 2010 prot. C26I10SBMC "Bioinformatica, ecologia molecolare e specie invasive: in

silico mining di librerie genomiche da pirosequenziamento 454 per l'individuazione di loci microsatelliti" and the University Project 2012 prot. C26A12KRHP "Tagged Next Generation Sequencing e in silico mining di polimorfismi nucleotidici (SNP) nello studio delle invasioni biologiche".

#### REFERENCES

- ABDELKRIM J., ROBERTSON B.C., STANTON J.A.L., GEMMELL N.J., 2009 – *Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing*. - *Biotechniques*, 46(3): 185.
- ABRAHAM V.A., AL SHUAIBI M.A., FALEIRO J.R., ABUZUHAIH R.A., VIDYASAGAR P.S.P.V., 1998 – *An integrated management approach for red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Oliv., a key pest of date palm in the Middle East*. - Sultan Qabus Univ. J. Scientific Res. Agric. Sci., 3: 77-84.
- AL-AYIED H.Y., ALSWAILEM A.M., SHAIR O., AL JABR A.M., 2006 – *Evaluation of phylogenetic relationship between three phenotypically different forms of Red date palm weevil Rhynchophorus ferrugineus Oliv. using PCR-based RAPD technique*. - *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(4): 303-309.
- ALLENTOFF M.E., SCHUSTER S., HOLDAWAY R., HALE M., MCLAY E., OSKAM C. L., GILBERT M.T.P., SPENCER P., WILLERSLEV E., BUNCE M., 2009 – *Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data*. - *Biotechniques*, 46(3): 195-200.
- APPLIED BIOSYSTEMS, 2006 – *Peak Scanner Software, Version 1.0. Reference Guide*. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4381867>
- BARRANCO P., DELAPENA J., CABELO T., 1996 – *El picudo rojo de las palmeras, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier): nueva plaga en Europa*. - *Phytoma Espana*, 76: 36-40.
- CAPDEVIELLE-DULAC C., EL-MERGAWY R.A.A.M., AVAND-FAGHIH A., ROCHAT D., SILVAIN J.-F., 2012 – *Rhynchophorus ferrugineus*. In: *Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2011–30 September 2011*. - *Molecular Ecology Resources*, 12(1):185-189.
- CASTOE T.A., POOLE A.W., GU W., JASON DE KONING A.P., DAZA J.M., SMITH E.N., POLLOCK D.D., 2010 – *Rapid identification of thousands of copperhead snake (Agkistrodon contortrix) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence*. - *Molecular Ecology Resources*, 10 (2): 341-347.
- CORNUET J.M., LUIKART G., 1996 – *Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data*. - *Genetics*, 144(4): 2001-2014.
- COX M.L., 1993 – *Red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus, in Egypt*. - *FAO Plant Protection Bulletin*, 41(1): 30-31.
- CRISTOFARO M., DE BIASI A., SMITH L., 2013 – *Field release of a prospective biological control agent of weeds, Ceratopogon basicorne, to evaluate potential risk to a nontarget crop*. - *Biological Control*, 64: 305-314.
- DIERINGER D., SCHLÖTTERER C., 2003 – *Microsatellite*

- analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. - *Molecular Ecology Notes*, 3 (1): 167-169.
- EL-MERGAWY R.A.A.M., AL-AJLAN A.M., 2011 – *Red palm weevil*, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier): *Economic importance, biology, biogeography and integrated pest management*. - *J. Agric. Sci. Technol. A*, 1: 1-23.
- EL-MERGAWY R.A.A.M., AL AJLAN A.M., ABDALLAH N.A., NASR M.I., SILVAIN J.F., 2011 – *Determination of different geographical populations of Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) using RAPD-PCR. - *International Journal of Agriculture and Biology*, 13 (2): 227-232.
- EPPO, 2008 – *Rhynchophorus ferrugineus*. - *EPPO Bulletin*, 38: 55-59.
- FAGHIH A.A., 1996 – *The biology of red palm weevil*, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera, Curculionidae) in Saravan region (Sistan & Balouchistan province, Iran). - *Applied Entomology and Phytopathology*, 63(1/2): 16-18.
- FALEIRO J.R., 2006 – *A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years. - *International Journal of Tropical Insect Science*, 26 (03): 135-154.
- FERRY M., GOMEZ S., 2002 – *The red palm weevil in the Mediterranean area*. - *PALMS*, 46 (4), 172-178.
- FOLMER O., BLACK M., HOEH W., LUTZ R., VRIJENHOEK R., 1994 – *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. *Molecular - Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5): 294-299.
- FU Y.X., 1997 – *Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection*. - *Genetics*, 147 (2): 915-925.
- GUSH H., 1997 – *Date with disaster*. - *The Gulf Today*, September 29: 16.
- HALLETT R.H., CRESPI, B.J., BORDEN J.H., 2004 – *Synonymy of Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), 1790 and *R. vulneratus* (Panzer), 1798 (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). - *Journal of Natural History*, 38(22): 2863-2882.
- HUELSENBECK J.P., & RONQUIST F., 2001 – *MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees*. - *Bioinformatics*, 17 (8): 754-755.
- KEHAT M., 1999 – *Threat to date palms in Israel, Jordan and the Palestinian Authority by the red palm weevil*, *Rhynchophorus ferrugineus*. - *Phytoparasitica*, 27(3): 241-242.
- LIBRADO P., ROZAS J., 2009 – *DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. - *Bioinformatics*, 25(11):1451-1452.
- LONGO S., COLAZZA S., 2009 – *Il Punteruolo rosso e il Castnide delle palme..* In: Colazza S. & Filardo G. (Eds.), *La ricerca scientifica sul Punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia*. Vol. 1, pp. 7-11; Regione Siciliana, Assessorato Agricoltura e Foreste. ISBN: Pal0217180.
- MEGLÉCZ E., COSTEDOAT C., DUBUTV., GILLES A., MALAUSA T., PECH N., MARTIN J.F., 2010 – *QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects*. - *Bioinformatics*, 26(3): 403-404.
- MULLIS K.B., FALOONA F.A., SCHARF S.J., SAIKI R.K., HORN G.T., ERLICH H., 1986 (January) – *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. - *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, Vol. 51, No. Pt 1, pp. 263-273.
- MURPHY S.T., BRISCOE B.R., 1999 – *The red palm weevil as an alien invasive: biology and the prospects for biological control as a component of IPM*. - *Biocontrol news and information*, 20: 35N-46N.
- PALERO F., GONZÁLEZ-CANDELAS F., PASCUAL M., 2011 – *MICROSATELIGHT- Pipeline to Expedite Microsatellite Analysis*. - *Journal of Heredity*, 102 (2): 247-249.
- PERRY J.C., ROWE L., 2011 – *Rapid microsatellite development for water striders by next-generation sequencing*. - *Journal of Heredity*, 102 (1): 125-129.
- PIRY S., LUIKART G., CORNUET J.M., 1999 – *Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data*. - *Journal of Heredity*, 90(4): 502-503.
- RECTOR B.G., DE BIASE A., CRISTOFARO M., PRIMERANO S., BELVEDERE S., ANTONINI G., SOBHIAN R., 2010 – *DNA fingerprinting to improve data collection efficiency and yield in an open-field host-specificity test of a weed biological control candidate*. - *Invasive Plant Science and Management*, 3(4): 429-439.
- RONQUIST F., HUELSENBECK J.P., 2003 – *MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models*. - *Bioinformatics*, 19 (12): 1572-1574.
- ROUSSET F., 2008 – *Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux*. - *Molecular Ecology Resources*, 8 (1): 103-106.
- ROZEN S., SKALETSKY H., 1999 – *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. - *Bioinformatics methods and protocols, Methods in Molecular Biology*, 132: 365-386, Humana Press.
- RUGMAN-JONES P.F., HODDLE C.D., HODDLE M.S., STOUTHAMER R., 2013 – *The Lesser of Two Weevils: Molecular-Genetics of Pest Palm Weevil Populations Confirm Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a Valid Species Distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and Reveal the Global Extent of Both. - *PloS one*, 8 (10): e78379.
- SALAMA H.S., SAKER M.M., 2002 – *DNA fingerprints of three different forms of the red palm weevil collected from Egyptian date palm orchards*. - *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 35 (4): 299-306.
- SANTANA Q.C., COETZEE M.P., STEENKAMP E.T., MLONYENI O.X., HAMMOND G.N., WINGFIELD M.J., WINGFIELD B.D., 2009 – *Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries*. - *Biotechniques*, 46 (3): 217.
- SIMON C., FRATI F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H., FLOORS P., 1994 – *Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers*. - *Annals of the Entomological Society of America*, 87 (6): 651-701.
- STADEN R., BEAL K.F., BONFIELD J.K., 2000 – *The staden package*, 1998.- *Methods Mol. Biol.*, 132: 115-130.
- TAJIMA F., 1989 – *The effect of change in population size on DNA polymorphism*. - *Genetics*, 123 (3): 597-601.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON G., NEI M., KUMAR S., 2011 – *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. - *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731-2739.
- VAN OOSTERHOUT C., HUTCHINSON W.F., WILLS D.P., SHIPLEY P., 2004 – *Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in*

- microsatellite data*. - Molecular Ecology Notes, 4 (3): 535-538.
- WHEELER D.L., BARRETT T., BENSON D.A., BRYANT S.H., CANESE K., CHETVERNIN V., CHURCH D.M., DiCUCCIO M., EDGAR R., FEDERHEN S., GEER L.Y., KAPUSTIN Y., KHOVAYKO O., LANDSMAN D., LIPMAN D. J., MADDEN T.L., MAGLOTT D.R., OSTELL J., MILLER V., PRUITT K.D., SCHULER G.D., SEQUEIRA E., SHERRY S.T., SIROTKIN K., SOUVOROV A., STARCHENKO G., TATUSOV R.L., TATUSOVA T.A., WAGNER L., YASCHENKO E., 2007 – *Database resources of the National Center for Biotechnology Information*. - Nucleic Acids Research, 35: D5-D12.
- WRIGHT S., 1951 – *The genetical structure of populations*. - Annals of Eugenics, 15: 323-354.
- WRIGHT S., 1969 – *The Theory of Gene Frequencies*. - *Evolution and the Genetics of Populations*, 2, University of Chicago Press, Chicago, III.
- ZANE L., BARGELLONI L., PATARNELLO T., 2002 – *Strategies for microsatellite isolation: a review*. - Molecular Ecology, 11(1): 1-16.

## IL MICROBIOMA ASSOCIATO A *RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS* (COLEOPTERA: DRYOPHTHORIDAE)

MATTEO MONTAGNA (\*) - BESSEM CHOUAIA (\*\*) - GIUSEPPE MAZZA (\*\*\*)  
ERICA MARIA PROSDOCIMI (\*\*) - ELENA CROTTI (\*\*) - ANNAMARIA GIORGI (\*)  
LUCIANO SACCHI (\*\*\*\*) - SANTI LONGO (°) - GIUSEPPE LOZZIA (\*) - ALESSIO DE BIASE (°°)  
CLAUDIO BANDI (°°°) - RITA CERVO (°°°°) - DANIELE DAFFONCHIO (\*\*)

(\*) Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia (DiSAA), Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2 - 20133 Milano, Italia; e-mail: matteo.montagna@unimi.it

(\*\*) Dipartimento di Scienze agrarie e ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia (DeFENS), Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2 - 20133 Milano, Italia; e-mail: bessem.chouaia@unimi.it, daniele.daffonchio@unimi.it

(\*\*\*) Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia, Via di Lanciola 12/a-50125 Cascine del Riccio, Firenze, Italia.

(\*\*\*\*) Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani" (DBB), Università degli Studi di Pavia, Via Ferrata 927100 Pavia, Italia;

(°) Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali, Università di Catania, Via S. Sofia 100 - 95123 Catania, Italia.

(°°) Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin (BBCD), Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Piazzale Aldo Moro 5 - 00185 Roma, Italia.

(°°°) Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DiVET), Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10 - 20133 Milano, Italia.

(°°°°) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Via Madonna del Piano 6 - 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italia.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *Microbial community associated with the Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Dryophthoridae)*

The Red Palm Weevil (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), is considered today the worst pest of palm species. This pest has recently invaded countries of southern Europe causing heavy economic damage on the cultivations of many ornamental palms. Due to the threats RPW poses to human economy, several studies have been carried out to manage this species. Nonetheless current control methods are still mainly based on a massive use of insecticides addressed to limit the infestation in treated palms. Even if these procedures have been improved during the latest decade to enhance efficacy and to reduce application costs and toxicity, nowadays researches are mainly focusing on long-term sustainable and environmentally friendly control strategies. Few studies in the new biological control strategies are performed at increasing the knowledge on microbiota of this pest. Considering the ecology of the red palm weevil, the presence of symbionts that could help the insect development, by the degradation of cellulose or the supply of amino acids or other nutrients, is instead to be considered with particular attention. In the present work culture dependent and independent methods (i.e. isolation on cultural media and 454 pyrotag sequencing targeting a fragment of the variable V1-V3 regions of the bacterial 16S rRNA) were adopted to characterize the bacterial community associated with specimens belonging to two populations of RPW (wild specimens and specimens reared in laboratory and feeding on high-rich sugar resource). Cultivable bacteria isolated from RPW tissues belong to the genus *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Staphylococcus*. In addition, bacteria of the family Acetobacteraceae, demonstrated to be associated with insect feeding on food source rich in sugar have been isolated. Within this taxon the dominant isolated bacteria are *Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp., and *Gluconacetobacter* spp.. Results obtained by culture independent methods confirm the previously obtained results. Furthermore, 16S rRNA pyrotag analysis evidenced that the most abundant bacterial phylum associated with RPW is Proteobacteria. Lab reared samples harbour a second dominant phylum, Firmicutes. The dominant bacteria associated with wild RPW are Xantomonadaceae and Rhodobacteraceae, while in the lab reared population are Leuconostocaceae and Acetobacteraceae.

KEY WORDS: symbiosis, commensal bacteria, microbiota.

Il punteruolo rosso della palma (di seguito indicato con RPW, dall'inglese Red Palm Weevil), *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), attacca specie di palma appartenenti a 15 generi diversi ed è considerato ad oggi il principale parassita delle palme (DEMBILIO & JACAS, 2011). Il RPW è originario

dell'Asia tropicale, e a causa dello scambio internazionale di materiale vegetale infestato, a partire dal 1980 si è diffuso dalle regioni di provenienza al bacino del Mediterraneo e nel Medio Oriente (FALEIRO, 2006). Nel 1992 il RPW è stato individuato in Egitto (EPPO, 2008) e, da allora, ha iniziato la sua diffusione attraverso il bacino nord del

Mediterraneo ove attacca principalmente le palme ornamentali della specie *Phoenix canariensis* (DEMBILIO *et al.*, 2009).

Considerando l'impatto economico e sociale di RPW, l'interesse scientifico su questo parassita è notevolmente aumentato negli ultimi decenni. La maggior parte degli studi si è finora concentrata sull'efficacia delle diverse strategie di lotta chimica e di biocontrollo (e.g. LLÁCER *et al.*, 2012). Nell'ottica delle recenti strategie di controllo simbiotico, poca attenzione è stata invece rivolta alla caratterizzazione della comunità microbica associata a RPW. Infatti, numerosi studi condotti su varie specie di insetti hanno ben documentato il ruolo svolto dai consorzi di batteri mutualistici a sostegno del loro insetto ospite, al quale forniscono nutrienti essenziali mancanti nella dieta, come ad esempio amminoacidi, vitamine e cofattori (DOUGLAS, 1998; MORAN, 2006; MC CUTCHEON *et al.*, 2009). Considerando l'ecologia del punteruolo rosso, è ragionevole ipotizzare la presenza di simbionti in grado di aiutare lo sviluppo dell'insetto, contribuendo, ad esempio, alla degradazione della cellulosa o fornendo amminoacidi o altri nutrienti. Questi simbionti, in grado di svolgere ruoli essenziali per la sopravvivenza e la riproduzione dell'insetto, potrebbero essere pertanto sfruttati in strategie che mirano al controllo della diffusione del curculionide.

In questo lavoro ci siamo proposti di caratterizzare, con metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti, le comunità batteriche associate a popolazioni naturali di RPW (campionate nelle vicinanze di Catania) e di allevamento (alimentate su mela per quattro settimane), al fine di individuare quei batteri potenzialmente utili in strategie di controllo simbiotico e di verificare la presenza di una comunità batterica o di gruppi microbici condivisi tra insetto e pianta ospite (*Phoenix canariensis*).

Lo studio della comunità microbica è stato condotto, in una prima fase, tramite metodi dipendenti dalla coltivazione. L'isolamento è stato realizzato inoculando in diversi terreni di coltura (i.e. LB, R2A, TSA, PDA, ABEM) un omogenato ricavato da diversi organi (i.e. gonadi, intestino) e da emolinfa provenienti da esemplari di laboratorio. Questa procedura ha permesso di isolare 98 ceppi batterici. La frazione coltivabile del microbiota associata a RPW è in gran parte dominata da batteri appartenenti ai generi *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Staphylococcus*. Questi tre generi sono presenti rispettivamente al 15,3%, 12,24% e 8,16%. Altri batteri noti per essere associati con gli insetti che hanno una dieta zuccherina sono i membri della famiglia *Acetobacteraceae*, come ad esempio

*Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp., e *Gluconacetobacter* spp., i quali sono stati isolati con una frequenza del 5,1%, 2% e 1%, rispettivamente.

Utilizzando metodi indipendenti dalla coltivazione, ossia analisi di 16S rRNA barcoding si è potuto osservare che i taxa più abbondanti, condivisi tra i membri dei due gruppi di insetti (popolazioni naturali e di allevamento), appartengono al phylum dei Proteobacteria. I campioni delle popolazioni da allevamento hanno, inoltre, un secondo gruppo dominante, rappresentato dai *Firmicutes* (in media 39,1%), il quale, invece, risulta scarsamente rappresentato nel microbiota degli insetti catturati in natura (0,3%). Altri gruppi batterici presenti (in parentesi sono indicate le abbondanze relative) sono membri degli *Actinobacteria* (catturati in natura: 17,1% e allevamento: 1,2%) e dei *Bacteroidetes* (catturati in natura: 8,2% e allevamento: 3,6%). Per quanto concerne i campioni di RPW prelevati in natura i taxa più abbondanti appartengono alle *Xantomonadaceae* (13,2%) e *Rhodobacteraceae* (11,9%). Altri gruppi interessanti sono rappresentati dalle *Cellulomonadaceae*, dalle *Rhodobacteraceae* e dai *Rhizobiales*. Al contrario, il genere più abbondante nella comunità batterica associata agli esemplari da allevamento è *Leuconostoc* (17,8%), che invece risulta assente nel microbiota degli esemplari catturati in natura. Altri componenti dominanti nei RPW da allevamento sono i batteri dei generi *Acetobacter* (14,47%) e *Lactococcus* (9,25%), mentre componenti minoritari risultano i membri delle famiglie *Enterobacteraceae* (con i generi *Escherichia*, *Serratia* e *Trabulsiella*), *Lactobacillaceae* e *Pseudomonadaceae*. I batteri dei generi *Lactobacillus* e *Entomoplasma* sono presenti in tutti gli esemplari di RPW allevati, ma non sono associati con RPW prelevati in natura.

Un'analisi comparativa condotta sui batteri associati sia ai campioni di punteruolo che alle palme è stata eseguita sulle OTU individuate a livello di genere, al fine di rilevare eventuali taxa comuni. È interessante notare che, dei 13 generi di batteri identificati nei tessuti della palma, solo *Klebsiella* è esclusivo di questi tessuti, mentre gli altri 12 sono associati, con un diverso grado di prevalenza e abbondanza, anche al microbiota del punteruolo. Il genere *Brevibacillus*, dominante nel microbiota della palma, è associato a due campioni di punteruolo, anche se con un basso livello di abbondanza. Inoltre, i batteri associati con la palma e il punteruolo possono essere divisi in due gruppi, ossia batteri diffusi in tutti i gruppi di insetti e batteri presenti, con diverso grado di specificità, solo con uno o con entrambi i gruppi di insetti analizzati. All'interno del primo gruppo troviamo *Paracoccus*,

*Trabulsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*. All'interno del secondo gruppo vengono invece riscontrati: *i*) batteri esclusivamente associati con i campioni di RPW dalla popolazione prelevata in natura, con i generi *Demequina*, *Aeromicrobium*, *Pimelobacter* e *Devosia*; *ii*) batteri associati con RPW dalla popolazione di laboratorio, genere *Lactococcus*.

In conclusione, l'isolamento dei batteri ha permesso di ottenere un'ampia collezione di specie associate a *Rhynchophorus ferrugineus*. All'interno di essa i generi più rappresentati sono *Citrobacter* e *Enterobacter*, isolati in prevalenza dall'intestino. Sono stati rinvenuti anche generi associati selettivamente con un organo, ad esempio *Streptococcus* (emolinfa), *Xenophilus* (intestino) o *Microbacterium* (intestino). Questo studio ha dimostrato che: *i*) la composizione della comunità batterica associata ai due gruppi di punteruolo differisce nettamente; *ii*) i membri della comunità batterica associata con i tessuti di palma, da cui sono stati raccolti i campioni di RPW da campo, sono anche presenti negli insetti.

#### RINGRAZIAMENTI

Le ricerche che hanno portato alla realizzazione di questo studio sono state sostenute dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR-PRIN 2009L27YC8\_003) e da "Accordo di Programma, affermazione in Edolo del Centro di Eccellenza Università della Montagna" (MIUR-Università degli Studi di Milano, prot. n. 1293 05/08/2011).

#### RIASSUNTO

*Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), originario dell'Asia tropicale e dagli anni '80 presente nell'area mediterranea, è considerato il principale parassita di diverse specie di palma tra cui la palma ornamentale *Phoenix canariensis*. L'interesse scientifico su questo parassita è notevolmente aumentato negli ultimi decenni ma poca attenzione è stata finora rivolta alla caratterizzazione della comunità microbica associata all'insetto in un'ottica volta a sviluppare strategie di controllo simbiotico. Nel presente lavoro, utilizzando metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti, vengono caratterizzate le comunità batteriche associate a popolazioni naturali (campionate nelle vicinanze di Catania) e di allevamento (alimentate su mela per quattro settimane) di *R. ferrugineus*, al fine di individuare batteri potenzialmente utili in strategie di controllo simbiotico e di verificare la presenza di gruppi microbici condivisi tra insetto e pianta ospite (*Phoenix canariensis*). Dai risultati ottenuti sui campioni di laboratorio emerge che la frazione coltivabile del microbiota è in gran parte dominata da batteri appartenenti ai generi *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Staphylococcus* ai quali si aggiungono taxa batterici membri della famiglia *Acetobacteraceae* noti per essere associati a insetti che pre-

sentano una dieta zuccherina (e.g. *Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp., e *Gluconacetobacter* spp.). Utilizzando metodi coltura-indipendenti (16S rRNA barcoding) si è potuto osservare che i taxa più abbondanti, condivisi tra i membri dei due gruppi di insetti (popolazioni naturali e di allevamento), appartengono al phylum dei Proteobacteria. I campioni delle popolazioni di laboratorio possiedono, inoltre, un secondo gruppo dominante rappresentato dai Firmicutes. Nei campioni di *R. ferrugineus* prelevati in natura i taxa più abbondanti appartengono alle *Xantomonadaceae* e *Rhodobacteraceae* mentre con abbondanze minori sono presenti anche *Cellulomonadaceae*, *Rhodobacteraceae* e *Rhizobiales*. *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Entomoplasma* sono presenti in tutti gli esemplari allevati ma risultano assenti nel microbiota degli esemplari catturati in natura. Altri taxa dominanti nei campioni di *R. ferrugineus* allevati sono i batteri dei generi *Acetobacter* e *Lactococcus*. Da un'analisi comparativa condotta sui batteri associati sia a campioni di punteruolo che alle palme, dei 13 generi di batteri identificati nei tessuti della palma 12 sono associati con un diverso grado di prevalenza e abbondanza anche ai diversi campioni di punteruolo. I generi batterici associati ai campioni di palma e di *R. ferrugineus* sono *Brevibacillus*, *Paracoccus*, *Trabulsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Demequina*, *Aeromicrobium*, *Pimelobacter* e *Devosia*. In conclusione lo studio ha dimostrato che la composizione della comunità batterica associata ai due gruppi di punteruolo differisce nettamente e che i campioni di palma sono caratterizzati da una comunità batterica la cui presenza viene riscontrata anche in *R. ferrugineus*.

#### BIBLIOGRAFIA

- DEMBILIO O., JACAS J.A., LLACER E. 2009 – *Are the palms Washingtonia filifera and Chamaerops humilis suitable hosts for the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera:Curculionidae)?* - J. Appl. Entomol., 133: 565-567
- DEMBILIO O., JACAS J.A., 2011 – *Basic bio-ecological parameters of the invasive Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae), in Phoenix canariensis under Mediterranean climate.* - Bull. Entomol. Res., 101: 153-163.
- DOUGLAS, A. E., 1998 – *Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria* Buchnera. - Annu. Rev. Entomol., 43: 17-37.
- EPPO (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION), 2008 – *Data sheets on quarantine pests. Rhynchophorus ferrugineus.* - EPPO Bulletin, 38: 55-59
- FALEIRO J.R., 2006 – *A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years.* - Int. J. Trop. Insect Science, 26: 135-154.
- LLACER E., NEGRE M., JACAS J.A., 2012 – *Evaluation of an oil dispersion formulation of imidacloprid as a drench against Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera, Curculionidae) in young palm trees.* - Pest Manag. Sci., 68 (6): 878-82
- MC CUTCHEON J.P., McDONALD B.R., MORAN N.A., 2009 – *Convergent evolution of metabolic roles in bacterial symbionts of insects.* - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 15394-15399
- MORAN N.A., 2006 – *Symbiosis.* - Curr. Biol., 16: R866-871



## CONTROLLO MICROBIOLOGICO DI *RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS* (OLIVIER) (COLEOPTERA CURCULIONIDAE) MEDIANTE IMPIEGO DI UNA TRAPPOLA “ATTRACT, INFECT AND RELEASE”

VALERIA FRANCARDI (\*) - CLAUDIA BENVENUTI (\*) - GIAN PAOLO BARZANTI (\*)  
PIO FEDERICO ROVERSI (\*)

(\*) *Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura - Centro di ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia (CRA-ABP), via Lanciola 12/A, 50125 Firenze (Italia); valeria.francardi@entecra.it*  
Lettura tenuta durante la Tavola rotonda “Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico”.  
Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *Microbiological control of Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera Curculionidae) with an experimental “attract, infect and release” trap*

An experimental autocontamination trap was devised to infect *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), the Red Palm Weevil, with cereal substrata inoculated with indigenous strains of *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. Laboratory tests carried out with experimental traps showed that *M. anisopliae* (M.08/I05) was the more virulent pathogen and that infective efficacy was not affected by different contaminated cereal substrata. *M. anisopliae* (M.08/I05) conidial concentration and germinability on rice inoculated substratum were examined in field conditions inside traps located in sunny and shady positions in spring, summer and autumn. The results showed that fungal inoculum stability was preserved longer in spring and summer than in autumn. No significant difference in *M. anisopliae* (M.08/I05) conidial concentration was found between sunny and shady traps during the various seasons.

KEY WORDS: Red Palm Weevil, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, virulence, contamination trap.

### INTRODUZIONE

Un nuovo approccio nella lotta microbiologica per il controllo di insetti di interesse agro-forestale è rappresentato dall'impiego di trappole dotate di substrati che agiscono come “focus” di microrganismi entomopatogeni per infettare le specie target (VEGA *et al.*, 2007). Questa tecnica offre alcuni vantaggi fra i quali, in particolare, la selettività dell'infezione, la possibilità di contaminare molti individui e la prospettiva di diffondere l'inoculo all'interno della popolazione del fitofago tramite il contatto fra individui infettati e sani. Per quanto riguarda i funghi entomopatogeni, fattori importanti nel raggiungimento di questi obiettivi sono, *intra alia*, la disponibilità di isolati virulenti, e l'individuazione di substrati di crescita idonei a favorire lo sviluppo del micelio e un'abbondante produzione di conidi, a mantenere nel tempo la stabilità dell'inoculo in campo e a consentire un'efficiente contaminazione degli insetti (IBRAHIM *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2011; FURLONG & PELL, 2001; KREUTZ *et al.*, 2004; QUESADA-MORAGA *et al.*, 2004, 2008). A tal fine sono state studiate diverse tipologie di trappole e substrati d'infezione a seconda delle specie target attratte

in risposta a stimoli ambientali, semiochimici o di alimento (VEGA *et al.*, 1995, 2007; KLEIN & LACEY, 1999; MANIANIA, 2002; DOWD & VEGA, 2003; EL-SUFTY *et al.*, 2011).

In questi ultimi anni, il controllo biologico del Punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), ha avuto un nuovo impulso a seguito dell'individuazione di ceppi virulenti di *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin e di *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolati da varie matrici (GAZAVI & AVAND-FAGHIH, 2002; SHAJU *et al.*, 2003; EL-SUFTY *et al.*, 2007; GINDIN *et al.*, 2006; TARASCO *et al.*, 2007; EL-SUFTY *et al.*, 2009; SEWIFY *et al.*, 2009; DEMBILIO *et al.*, 2010; SHAWIR & AL-JABR, 2010); in particolare un ceppo di *B. bassiana*, ottenuto da *R. ferrugineus* in Egitto è stato brevettato per il controllo della specie (SEWIFY, 2007; SEWIFY *et al.*, 2009). Anche in Italia sono stati isolati, da adulti del curculionide raccolti in campo, ceppi di *M. anisopliae* (M.08/I05) e *B. bassiana* (B.09/I01) virulenti nei confronti di stadi di sviluppo diversi del fitofago (FRANCARDI *et al.*, 2012, 2013) prospettando la possibilità di un loro impiego nell'ambito di programmi di lotta integrata. A tal fine sono stati condotti studi volti alla messa a punto di uno stru-

mento biotecnico che coniugasse substrati di contaminazione efficaci a trasmettere l'inoculo fungino e a mantenere nel tempo la sua capacità infettiva con una trappola sperimentale "attract, infect and release" che assicurasse il passaggio/permanenza temporanea degli adulti sul substrato inoculato.

Come substrati di crescita e di sporulazione degli isolati fungini sono state utilizzate cariossidi di grano ed riso, preparati secondo il protocollo di GINDIN *et al.* (2006) e FRANCARDI *et al.* (2013). La concentrazione conidica è stata calcolata con un ematocimetro (Thoma-Zeiss counting chamber) su un campione di cariossidi prelevato a caso dai substrati di accrescimento mentre la germinabilità è stata valutata secondo il protocollo adattato di LIU *et al.*, 2003 (in: FRANCARDI *et al.*, 2013).

La trappola sperimentale "attract, infect and release", costituita di materiale plastico, è composta da un corpo conico rovesciato (larghezza 22,5 cm, altezza 21,0 cm,) che poggia ad incastro su di una base circolare (River Systems, Italy) sulla quale è stato trasferito il substrato di grano/riso contaminato. Sulle pareti del cono in prossimità della base sono state realizzate due ampie aperture rettangolari (4x9 cm) contrapposte per favorire il passaggio degli adulti sul mezzo contaminante. La superficie esterna del cono è stata dipinta con uno spray di vernice acrilica di colore nero (DelBono Aerosol, Assago, Milano, Italy) per aumentare l'attrattività nei confronti di *R. ferrugineus* (AL-SAOUD *et al.*, 2010; ABUAGLA & AL-DEEB, 2012). All'interno del cono è stato sospeso un bicchiere di plastica (150 ml), dotato di tappo a vite, sulle cui pareti sono state procurate due aperture ovoidali (3x3,5 cm) contrapposte, chiuse con una fitta rete di nylon. All'interno del bicchiere è stato posto un blend di attrattivi costituito dal feromone di aggregazione di *R. ferrugineus* Rhyfer 220 (Intrachem Bio, Italy), acetato di etile 10% e uno spicchio di mela in decomposizione, efficace per richiamare gli adulti (GIBLIN-DAVIS *et al.*, 1996; ABDALLAH & AL-KHATRI, 2005; FALEIRO & SATARKAR, 2005; OEHLISCHLAGER, 2005; GUARINO *et al.*, 2010).

Il prototipo di trappola è stato utilizzato in prove di laboratorio per confrontare l'entomopatogenicità degli isolati fungini di *M. anisopliae* (M.08/I05) e *B. bassiana* (B.09/I01) su substrati di crescita fungini diversi (grano e riso) nei confronti di adulti di *R. ferrugineus* e per valutare la stabilità (persistenza e germinabilità) dell'inoculo fungino in condizioni di campo.

Nelle prove di laboratorio gli adulti di *R. ferrugineus* impiegati sono stati forniti dalla Dr.ssa Silvia Arnone del Laboratorio Gestione

Sostenibile degli Agroecosistemi UTAGRI ECO ENEA CR Roma (Italy). Le trappole, con i substrati inoculati, sono state poste in gabbie (1x1x1m) costruite con un telaio in legno chiuso ai lati con una fitta rete metallica all'interno delle quali sono stati lasciati liberi adulti di *R. ferrugineus* per 24 ore.

Dalle osservazioni effettuate anche grazie all'ausilio di una cinepresa, si è potuto accertare che, nelle prime 6 ore dall'inizio delle prove, la trappola sperimentale è risultata idonea ad attrarre e a trattenere temporaneamente gli adulti del Punteruolo rosso sui substrati inoculati e poi a consentirne l'allontanamento spontaneo dalla trappola.

Il riso e il grano inoculati con i funghi entomopatogeni si sono dimostrati buoni substrati di contaminazione nei confronti di *R. ferrugineus* anche in considerazione dell'attività di scavo che il curculionide ha manifestato all'interno di questi come osservato anche da altri Autori (GINDIN *et al.*, 2006; FRANCARDI *et al.*, 2012, 2013). A questo riguardo è verosimile che il blend attrattivo impiegato abbia avuto un ruolo nel prolungare il contatto degli adulti sui substrati inoculati stimolando la ricerca di cibo e/o il comportamento criptico dell'insetto (GINDIN *et al.*, 2006). Questo aspetto ha dimostrato, inoltre, l'assenza di un effetto repellente del riso e grano colonizzati da micelio fungino ed in presenza di una abbondante produzione conidica nei confronti del curculionide.

Al termine delle 24 ore gli adulti sono stati prelevati dalle gabbie e posti singolarmente in contenitori di plastica e allevati su mela in ambiente climatizzato a 27°C, 60% RH e 12:12 h (L:D) per 28 giorni.

#### ENTOMOPATOGENICITÀ DEGLI ISOLATI INDIGENI DI *M. ANISOPLIAE* E *B. BASSIANA* SU DIVERSI SUBSTRATI DI COLTURA

L'entomopatogenicità degli isolati di *M. anisopliae* (M.08/I05) e di *B. bassiana* (B.09/I01), è stata valutata utilizzando il grano inoculato posto separatamente in due trappole all'interno di gabbie, in ciascuna delle quali sono stati liberati 20 adulti (10 M e 10 F). Altrettanti individui sono stati liberati in un'altra gabbia con una trappola contenente il grano non contaminato. I risultati hanno evidenziato la maggiore virulenza di *M. anisopliae* (M.08/I05) che dopo 28 gg., ha registrato il 75% di mortalità cumulativa degli adulti, con livelli significativamente superiori (Survival analysis; Wilcoxon -Gehan test) a quelli ottenuti

su grano inoculato con *B. bassiana* (B.09/I01) (45%). L'efficacia del trattamento con *M. anisopliae* (M.08/I05) (Abbott %) è stato del 67% e l' $LT_{50}$  è stato registrato in 3. Nel controllo la mortalità cumulativa è stata del 25%. (FRANCARDI *et al.*, 2013).

La capacità infettiva del ceppo fungino risultato più virulento, *M. anisopliae* (M.08/I05), è stata quindi confrontata utilizzando, come substrati di contaminazione, riso e grano posti separatamente in due trappole all'interno di gabbie in ciascuna delle quali sono stati liberati 40 adulti (20 M e 20 F) del Punteruolo rosso. Altrettanti adulti sono stati liberati in altre due gabbie con trappole contenenti, rispettivamente, riso e grano non inoculato. I risultati ottenuti non hanno evidenziato differenze nei valori di mortalità cumulativa di *R. ferrugineus* (95%) e di efficacia del trattamento (Abbott = 95%) fra i due substrati ed anche  $LT_{50}$  è stato raggiunto in circa lo stesso periodo di tempo (in 12 giorni su grano inoculato e in 15 giorni su riso). La mortalità cumulativa del controllo è stata del 5%. L'analisi della Sopravvivenza (Wilcoxon-Gehan test) non ha evidenziato differenze significative fra i livelli di mortalità di *R. ferrugineus* contaminati sui due substrati e che invece sono risultati significativamente diversi dal controllo (FRANCARDI *et al.*, 2013).

#### STABILITÀ DELL'INOCULO FUNGINO IN CONDIZIONI DI CAMPO

Nella prova di campo, la concentrazione e la germinabilità conidica di *M. anisopliae* (M.08/I05) è stata valutata su riso inoculato posto in 2 trappole, una in posizione soleggiata e un'altra in ombra, appese su piante di latifoglie nel parco del nostro Centro di ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia in località Cascine del Riccio (FI). Come testimone è stato utilizzata un'identica quantità di riso inoculato mantenuto in una beuta in cella a 26°C, about 60% RH e 12:12 (L:D).

Le prove sono state condotte, nell'arco di 4 settimane, in periodi dell'anno con maggiore presenza del Punteruolo rosso in campo (CALDARELLA *et al.*, 2008): in primavera, in estate ed in autunno (FRANCARDI *et al.*, 2013). I dati meteorologici locali sono stati presi dal sito web: 3Bmeteo ([http://www.3bmeteo.com/meteo\\_regione-toscana.htm](http://www.3bmeteo.com/meteo_regione-toscana.htm)) (<http://www.3bmeteo.com/>). All'inizio della prova la concentrazione di *M. anisopliae* (M.08/I05) su riso inoculato era di  $1 \times 10^7$  conidi per ml in primavera,  $3 \times 10^7$  conidi per ml in estate e  $1 \times 10^7$  conidi per ml in autunno con una germinabilità del 95,28%, 59,25% e 58,50% rispettiva-

mente. I dati sulla stabilità dell'inoculo sul substrato sono stati rilevati una volta a settimana per tutte le 4 settimane di osservazione.

I risultati hanno evidenziato che nel controllo la concentrazione media dei conidi è stata significativamente maggiore di quella rilevata nelle trappole in campo in primavera ( $2,5 \times 10^7$  ed estate ( $3,5 \times 10^7$ ). Inoltre, in tutti i periodi considerati, non sono emerse differenze significative nei livelli di presenza dei conidi sul substrato di riso fra le due trappole in campo (FRANCARDI *et al.*, 2013).

In primavera, con temperature locali comprese fra 20 e 25°C e una RH del 50%, la presenza dei conidi di *M. anisopliae* (M.08/I05) è stata rilevata fino alla terza settimana con livelli numerici che sono variati da un minimo di  $1-3 \times 10^6$  a un massimo di  $1,55-2,6 \times 10^7$  conidi per ml nella trappola, rispettivamente, in posizione soleggiata e in ombra.

In estate, con temperature di circa 25°C e una RH del 60%, la presenza dei conidi *M. anisopliae* (M.08/I05) ha persistito fino alla quarta settimana in entrambe le trappole, variando da una concentrazione minima di  $7,1-8 \times 10^6$  conidi per ml nella trappola, rispettivamente, in posizione soleggiata e in ombra a un massimo di  $3,1 \times 10^7$  conidi per ml.

In autunno durante la prima settimana, con temperatura di circa 15°C e una RH 55%, la presenza dei conidi di *M. anisopliae* su riso inoculato ha registrato un picco di  $2,1 \times 10^7$  nella trappola al sole mentre dalla seconda settimana, con temperature sotto 15°C, i livelli numerici dei conidi sono crollati rapidamente a  $1,6 \times 10^6$  conidi/ml nella trappola al sole e a  $2,7 \times 10^6$  conidi/ml in quella in ombra.

La germinabilità dei conidi di *M. anisopliae* (M.08/I05) ha mostrato un andamento simile nelle trappole in campo in primavera ed in estate. In particolare, la germinabilità in primavera, è rimasta alta nella trappola al sole variando dal 95,28% al 81,17% durante le prime 3 settimane per crollare al disotto del 40% nell'ultima settimana. Nella trappola all'ombra la germinabilità è variata da 87,92% nella prima settimana al 70,42% nella quarta settimana.

In estate, nelle 4 settimane di prova, la germinabilità dei conidi è rimasta relativamente costante variando dal 59,25% al 59,58% e 60,67% nella trappola rispettivamente al sole e in ombra. In autunno, la germinabilità dei conidi nella trappola in ombra è diminuita progressivamente nel corso delle 4 settimane dal 58,50% al 25,83%, mentre in quella al sole la germinabilità ha mostrato un incremento (67,75%) durante la prima settimana per poi crollare al 21,58% nell'ultima settimana. In ciascuna settimana dei

periodi considerati non sono emerse differenze significative fra la germinabilità dei conidi di *M. anisopliae* (M.08/I05) nelle due trappole in campo (FRANCARDI *et al.*, 2013).

In conclusione le prove di laboratorio hanno permesso di individuare nell'isolato *M. anisopliae* (M.08/I05) l'agente fungino più virulento nei confronti degli adulti di *R. ferrugineus* e di evidenziare l'elevata capacità infettiva dei substrati inoculati a base di grano e riso. Le prove di campo hanno fornito indicazioni positive sul mantenimento della stabilità dell'inoculo di *M. anisopliae* (M.08/I05) per almeno 3-4 settimane nel periodo primaverile ed estivo. Lo studio apre quindi prospettive di impiego di tale tipo di trappola nel controllo microbiologico del fitofago. Ulteriori studi si rendono necessari per valutare l'efficacia di questo strumento bio-tecnico nel contenimento delle popolazioni del fitofago in campo.

#### RINGRAZIAMENTI

Ricerche svolte nell'ambito del progetto Finalizzato Nazionale MIPAAF "PROPALMA - Protezione delle Palme ornamentali e spontanee dall'invasione biologica del Punteruolo rosso *Rhynchophorus ferrugineus*", D.M. 25618/7301/11.

#### RIASSUNTO

Una trappola sperimentale "attract, infect and release", contenente substrati di riso e grano inoculati con ceppi indigeni di *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, ottenuti da adulti di *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), è stata messa a punto per valutare la sua efficacia nel controllo microbiologico degli adulti del curculionide. Le prove di laboratorio hanno evidenziato la maggiore virulenza del ceppo *M. anisopliae* (M.08/I05) e una capacità infettiva non influenzata dal substrato di crescita del fungo. La persistenza e la germinabilità dei conidi dell'isolato di *M. anisopliae* (M.08/I05) su substrato di riso è stata infine esaminata, in condizioni di campo, in trappole situate in posizione soleggiata ed in ombra in primavera, estate ed autunno. I risultati hanno mostrato che l'inoculo fungino di *M. anisopliae* (M.08/I05) è rimasto più stabile in primavera e in estate che in autunno. Nessuna differenza significativa nella concentrazione dei conidi è stata rilevata fra il substrato di riso nella trappola al sole e all'ombra durante i periodi di osservazione in campo.

#### BIBLIOGRAFIA

ABBOTT W.S., 1925 – *A method of computing the effectiveness of an insecticide*. - J. Econom. Entomol., 18: 265-267.  
ABDALLAH F.F., AL-KHATRI S.A., 2005 – *The effect of pheromone, kairomone and food bait on attracting males and females of red palm weevil*. - Egypt. J. Agric. Res., 83: 169-177.

ABUAGLA A.M., AL-DEEB M.A., 2012 – *Effect of bait quantity and trap color on the trapping efficacy of the pheromone trap for the red palm weevil*, *Rhynchophorus ferrugineus*. - J. Insect Sci., 12.120. Available online: <http://www.insectscience.org/12.120>.  
AL-SAOUD A.H., AL-DEEB M.A., MURCHIE A.K., 2010 – *Effect of color on the trapping effectiveness of Red Palm Weevil pheromone traps*. - J. Entomol., 7 (1): 54-59.  
CALDARELLA C.G., GRECO C., LO VERDE G., 2008 – *Monitoraggio del Punteruolo rosso nella città di Palermo con l'uso di trappole*. In: La ricerca scientifica sul Punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Report 2008 Regione Siciliana. Assessorato Agricoltura e Foreste. Dipartimento interventi infrastrutturali. 1: 65-68.  
DEMBILIO O., QUESADA-MORAGA E., SANTIAGO-ALVAREZ C., JACAS J.A., 2010 – *Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana as a biological control agent against the Red Palm Weevil*, *Rhynchophorus ferrugineus*. - J. Invertebr. Pathol., 104: 214-221.  
DOWD P.F., VEGA F.E., 2003 – *Autodissemination of Beauveria bassiana by sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) to overwinter sites*. - Biocontrol Sci. Techn., 13: 65-75.  
EL-SUFTY R., AL-AWASH S.A., AL ALMIRI A., SHAHDAD A., AL BATHRA A., MUSA S.A., 2007 – *Biological control of the Red Palm Weevil*, *Rhynchophorus ferrugineus* (Col.:Curculionidae) by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana in United Arab Emirates. - Proc. 3rd International Date Palm Conference, Abu Dhabi, UAE, ISHS Acta Hort., 736: 399-404.  
EL-SUFTY R., AL-AWASH S.A., BIGHAM S.AL, SHAHDAD A.S., BATHRA A.H.AL., 2009 – *Pathogenicity of the fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuill to the Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.) (Col.: Curculionidae) under laboratory and field conditions*. - Egypt. J. Biol. Pest Co., 19, 1: 81-85.  
EL-SUFTY R., AL-AWASH S.A., BIGHAM S.AL, SHAHDAD A.S., BATHRA A.H.AL., 2011 – *A trap for autodissemination of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana by Red Palm Weevil adults in date palm plantations*. - Egypt. J. Biol. Pest Co., 21(2): 271-276.  
FALEIRO, J.R. , SATARKAR V.R., 2005 – *Attraction of food baits for use in Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) pheromone trap*. - Indian J. Plant Protection., 33 (1): 23-25.  
FRANCARDI V., BENVENUTI C., ROVERSI P.F., RUMINE P., BARZANTI G., 2012 – *Entomopathogenicity of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. and Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin isolated from different sources in the control of Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera Curculionidae)*. - Redia, 95: 49-55.  
FRANCARDI V., BENVENUTI C., BARZANTI G., ROVERSI P.F., 2013 – *Autocontamination trap with entomopathogenic fungi: a possible strategy in the control of Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera Curculionidae)*. - Redia, 96: 57-67.  
FURLONG, M.J., PELL J.K., 2001 – *Horizontal transmission of entomopathogenic fungi by the diamondback moth*. - Biol. Control., 22: 288-299.  
GAZAVI M., AVAND-FAGHIH A., 2002 – *Isolation of two entomopathogenic fungi on the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Col.: Curculionidae) in Iran*. - Appl. Entomol. Phytopathol. 9: 44-45.  
GIBLIN-DAVIS R.M., OEHLISCHLAGER A.C., PEREZ A., GRIES G., GRIES R., WEISSLING T.J., CHINCHILLA C.M.,

- PEÑA J.E., HALLETT R.H., PIERCE H.D.JR., GONZALEZ L.M., 1996 – *Chemical and behavioural ecology of palm weevils (Curculionidae: Rhynchophorinae)*. - Fla. Entomol., 79 (2) :153-167.
- GINDIN G., LEVSKI S., GLAZER I., SOROKER V., 2006 – *Evaluation of the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana against the Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus*. - Phytoparasitica, 34 (4): 370-379.
- GUARINO S., LO BUE P., PERI E., COLAZZA S., 2011 – *Responses of Rhynchophorus ferrugineus adults to selected synthetic palm esters: electroantennographic studies and trap catches in an urban environment*. - Pest Manag. Sci., 67: 77-81.
- IBRAHIM L., BUTT T.M., BECKETT A., CLARK S.J., 1999 – *The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, Metarhizium anisopliae*. - Mycol. Res., 103: 901-907.
- KLEIN M.G., LACEY A.L., 1999 – *An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the Japanese beetle Popillia japonica (Coleoptera: Scarabaeidae)*. - Biocontrol Sci. Techn., 9: 151-158.
- KREUTZ J., ZIMMERMANN G., VAUPEL O., 2004 – *Horizontal transmission of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana among the Spruce Bark Beetle, Ips typographus (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions*. - Biocontrol Sci. Techn., 14 (8): 837-848.
- LIU H., SKINNER M., BROWNBRIDGE M., PARKER B.L., 2003 – *Characterization of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae isolates for management of tarnished plant bug, Lygus lineolaris (Hemiptera: Miridae)*. - J. Invertebr. Pathol., 82: 139-147.
- MANIANIA N.K., 2002 – *A low-cost contamination device for infecting adult tsetse flies, Glossina spp., with the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae in the field*. - Biocontrol Sci. Techn., 12: 59-66.
- OEHLSCHLAGER C., 2005 – *Current status of trapping palm weevils and beetles*. - Planters., 81 (947): 123-143.
- QUESADA-MORAGA E., SANTOS-QUIRÓS R., VALVERDEGARCÍA P., SANTIAGO-ÁLVAREZ C., 2004 – *Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of Metarhizium anisopliae (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae)*. - J. Invertebr. Pathol., 87: 51-58.
- QUESADA-MORAGA E., MARTIN-CARBALLO I., GARRIDOJURADO I., SANTIAGO-ÁLVAREZ C., 2008 – *Horizontal transmission of Metarhizium anisopliae among laboratory populations of Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)*. - Biol. Control., 47: 115-124.
- SEWIFY G.H., 2007 – *Egyptian strain of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana (WO/2007/087813)*. - WIPO Service, World intellectual Property Organization: URL: [http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Egyptia n-strain-entomopathogenic-fungus-Beauveria/ WO 2007087813A2.pdf](http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Egyptia%20n-strain-entomopathogenic-fungus-Beauveria/WO%2007087813A2.pdf)
- SEWIFY G.H., BELAL M.H., AL-AWASH S.A., 2009 – *Use of entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana for the biological control of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Olivier*. - Egypt. J. Biol. Pest Co. 19: 157-163.
- SHAJU S., KUMAR R.K., GOKULAPALM C., 2003 – *Occurrence of Beauveria sp. on red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.) of coconut*. - Insect Environ., 9: 66-67.
- SHAWIR M.S., AL-JABR A.M., 2010 – *The infectivity of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae to Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) stages under laboratory conditions*. - Proc. 4th International. Date Palm Conference, Acta Hort. 882, ISHS: 431-436.
- TARASCO E., PORCELLI F., POLISENO M., QUESADA MORAGA E., SANTIAGO ALVAREZ C., TRIGGIANI O., 2007 – *Natural occurrence of entomopathogenic fungi infecting the Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae) in Southern Italy*. - Proc. 11th European Meeting from Laboratory to Field Key Points. Allés, Gard, France, June 3-7, 2007, p.127. (IOBC/WPRS Bulletin 2008, 31).
- VEGA F.E., DOWD P.F., BARTELT R.J., 1995 – *Dissemination of microbial agents using an autoinoculating device and several insect species as vectors*. - Biol. Control., 5: 545-552.
- VEGA F.E., DOWD P.F., LACEY L.A., PELL J.K., JACKSON D.M., KLEIN M.G., 2007 – *Dissemination of beneficial microbial agents by insects*. In: Lacey L. A. and Kaya H.K., Eds., Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 127-146.
- ZHANG L.-W., LIU Y.-J., YAO J., WANG B., HUANG B., LI Z.-Z., FAN M.-Z., SUN J.-H., 2011 – *Evaluation of Beauveria bassiana (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of Dendroctonus valens*. - Insect Science, 18: 209-216.



## CONTROLLO BIOLOGICO DEL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME *RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS* (OLIVIER)

GIUSEPPE MAZZA (\*) - VALERIA FRANCARDI (\*) - SANTI LONGO (\*\*) - ROBERTO NANNELLI (\*)  
EUSTACHIO TARASCO (\*\*\*) - RITA CERVO (\*\*\*\*) - CLAUDIA BENVENUTI (\*)  
PIO FEDERICO ROVERSI (\*)

(\*) *Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia, via di Lanciola 12/a, Cascine del Riccio, 50125 – Firenze; Italia; e-mail: giuseppe.mazza@entecra.it (corresponding author)*

(\*\*) *Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali, Università di Catania, via S. Sofia 100, 95123 – Catania; Italia*

(\*\*\*) *Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (DISSPA), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, via Amendola 165/a, 70126 - Bari; Italia*

(\*\*\*\*) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Via Madonna del Piano 6, 50019 - Sesto Fiorentino (Firenze); Italia*  
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico”.  
Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *Biological control of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)*

The Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), is considered today the worst pest of palm species. Knowledge of both its natural enemies and its defensive mechanisms against predators and microorganisms is crucial to develop efficacious methods for an integrated pest control. In this paper, we assess the potential biological control of this taxon by reviewing studies on natural enemies of *R. ferrugineus* from both its native and introduced regions. Our literature surveys revealed that more than 40 biological control agents were reported attacking *R. ferrugineus*, without however limiting its spread. Fungi, bacteria and entomopathogenic nematodes are the more promising ones for integrated pest management programs, but more in depth studies are necessary to increase the knowledge of natural enemies related to this species, to isolate more virulent strains and to determine the optimum conditions for the biocontrol agents.

KEY WORDS: *Rhynchophorus ferrugineus*, palm weevil, palm pest, natural enemies, biological control.

### INTRODUZIONE

Il punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), è una specie originaria dell'Asia tropicale il cui areale naturale si estende dal Pakistan alla Melanesia (WATTANAPONGSIRI, 1966; MURPHY & BRISCOE, 1999). Nelle aree di origine, sia in ambienti forestali che in aree rurali, *R. ferrugineus* è di norma un insetto raro e localizzato. Il commercio delle palme e lo sviluppo delle monoculture hanno facilitato l'espansione dell'areale di questo insetto reperito negli anni '80 negli Emirati Arabi e successivamente in Medio Oriente. La sua diffusione attuale, favorita dal commercio di piante infestate, interessa pressoché tutte le aree ove si coltivano palme (FALEIRO, 2006).

Data la difficoltà di rilevare i primi segni delle infestazioni di *R. ferrugineus* per le abitudini criptiche delle larve e le conseguenti difficoltà di eradicazione dei focolai iniziali d'infestazione, l'attenzione in merito alle strategie di controllo è stata focalizzata in modo prioritario su interventi di lotta integrata (IPM), cercando di coniugare

attività di sensibilizzazione del pubblico, misure di prevenzione e interventi diretti di diverso tipo (MURPHY & BRISCOE, 1999; FALEIRO, 2006).

In merito alle metodologie di lotta sono stati testati singolarmente o in combinazione tra loro trattamenti con biocidi per aspersione alle chiome e per endoterapia, metodi biotecnici basati sull'impiego di trappole innescate con semiochimici, strategie d'impiego di maschi sterili e tecniche di lotta biologica con utilizzo di antagonisti naturali e agenti di epizoozie (WATTANAPONGSIRI, 1966; MURPHY & BRISCOE, 1999; FALEIRO, 2006). A seguito delle problematiche sollevate dal massiccio utilizzo di prodotti chimici di sintesi e delle conseguenti implicazioni in merito alle ricadute ambientali, l'attenzione è stata incentrata sulle potenzialità del controllo biologico. Al riguardo non molte sono le informazioni disponibili sui nemici naturali di questo fitofago e in gran parte riguardano specie ad elevata polifagia capaci di svolgere un ruolo limitato nel contenimento delle popolazioni del curculionide (REGINALD, 1973). Si tenga peraltro presente che l'utilizzo di “generalist” pone con forza la necessità di studi appro-

fonditi sui rischi di danni a spese di specie autotone prima della loro liberazione in natura (DE CLERCQ *et al.*, 2011).

Nel presente lavoro viene presentata un'analisi dettagliata di quanto finora acquisito sui nemici naturali del punteruolo rosso delle palme, e ne vengono esaminate potenzialità e limiti, con particolare riferimento a quanto noto per l'area mediterranea.

#### VIRUS

Il virus della poliedrosi citoplasmatica è l'unico virus isolato dal punteruolo rosso delle palme. Attacca tutti gli stadi di sviluppo dell'insetto ed è stato trovato in India (GOPINADHAN *et al.*, 1990) e in Egitto (EL-MINSHAWY *et al.*, 2005). Per un controllo integrato particolare attenzione deve essere posta nell'utilizzo di questo virus, essendo in grado di influenzare negativamente la sopravvivenza dei nematodi entomopatogeni (SALAMA & ABD-ELGAWAD, 2002).

#### BATTERI

DANGAR & BANERJEE (1993) hanno isolato *Bacillus* sp., *Serratia* sp. e batteri del gruppo dei corineformi sia da larve che da esemplari adulti di punteruolo rosso in India, mentre ALFAZARIY *et al.* (2003) e ALFAZARIY (2004) *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* da larve e adulti in Egitto. ALFAZARIY (2004) riporta un discreto successo dell'utilizzo di *B. thuringiensis* sottospecie *kurstaki*, contro il punteruolo rosso in Egitto. Al contrario, altri autori mostrano una differente suscettibilità del *B. thuringiensis* su esemplari di rincoforo di popolazioni italiane (MANACHINI *et al.*, 2008a, b, 2009), dovuta probabilmente anche ai peptidi antimicrobici individuati sulla cuticola di individui raccolti in Italia (MAZZA *et al.*, 2011a). *Pseudomonas aeruginosa* è stata isolata da larve in Kerala (India) e saggi di laboratorio hanno evidenziato una sua elevata patogenicità, in particolare per le giovani larve (BANERJEE & DANGAR, 1995), che non sembrano possedere i peptidi cuticolari antimicrobici sopra menzionati (MAZZA *et al.*, 2011a). SALAMA *et al.* (2004) hanno isolato da larve in Egitto tre specie appartenenti al genere *Bacillus*: *B. sphaericus*, *B. megaterium* e *B. laterosporus*, che hanno causato in laboratorio una mortalità larvale tra il 40 e 60%. In Italia, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* e *B. megaterium* sono stati isolati da punteruoli trovati morti in Sicilia, ma saggi preliminari sulle uova hanno messo in evidenza una loro bassa

patogenicità, almeno su questo stadio di sviluppo (FRANCESCA *et al.*, 2008).

#### FUNGH

*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sono le due specie di funghi entomopatogeni più conosciute e quelle che offrono i risultati più incoraggianti nel controllo di alcuni insetti dannosi (JARONSKI, 2010). EL-SUFTY e collaboratori (2009) hanno studiato la patogenicità di un ceppo di *B. bassiana*, isolato da pupe e adulti del punteruolo rosso raccolti negli Emirati Arabi, provandone l'efficacia nei confronti di adulti e giovani larve con saggi di laboratorio. Lo stesso ceppo è stato utilizzato anche nei dattileti, utilizzando trappole per l'autodisseminazione (EL-SUFTY *et al.*, 2011). Ottimi risultati sono stati ottenuti, sia in laboratorio che in condizioni seminaturali, utilizzando anche un ceppo di *B. bassiana* isolato da pupe raccolte in Spagna (DEMBILIO *et al.*, 2010a). Risultati interessanti con l'utilizzo di *B. bassiana* sono anche stati riportati da SEWIFI e collaboratori (2009) e da BESSE e collaboratori (2011). L'utilizzo di questo fungo in pieno campo è stato criticato solamente da ABDEL-SAMAD *et al.* (2011), a causa soprattutto del suo costo elevato.

Prove condotte in laboratorio, utilizzando un ceppo di *M. anisopliae* isolato da un individuo morto in Sicilia hanno mostrato un'elevata efficacia di questo fungo nei confronti di larve e adulti (FRANCARDI *et al.*, 2012). *Metarhizium anisopliae* è stato isolato anche in Egitto e, almeno in laboratorio, ha causato un'alta mortalità sia nei confronti di larve che adulti (MERGHEM, 2011). Anche se altri funghi come *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Trichothecium* sp. sono stati isolati da diversi stadi del punteruolo rosso raccolti in Sicilia (TORTA *et al.*, 2009), mancano ad oggi studi mirati per dimostrarne la patogenicità.

#### NEMATODI

Solo i nematodi associati a *Rhynchophorus palmarum*, un'altra specie appartenente al genere *Rhynchophorus* di origine americana, sono stati studiati con attenzione, principalmente per l'importanza della malattia nota come cuore rosso della palma, trasmessa da *Bursaphelenchus cocoophilus*. Tra le specie di nematodi parassiti, *Praecocilenchus ferruginophorus* è stato isolato da esemplari di punteruolo rosso raccolti in India (RAO & REDDY, 1980). Questa specie è stata ritrovata nelle trachee, nell'intestino e nei corpi grassi

delle larve, e nell'utero e nell'emocele degli esemplari adulti. Gli ovai delle femmine parassitizzate risultano danneggiati con conseguenze negative nella produzione di uova (TRIGGIANI & CRAVEDI, 2011).

I nematodi entomopatogeni sono parassiti obbligati degli insetti, sono ubiquitari e sono raggruppati nelle famiglie Heterorhabditidae e Steinernematidae. All'interno di questi nematodi, vivono batteri appartenenti al genere *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, che vengono rilasciati nell'emocele dell'insetto provocando la morte di quest'ultimo.

*Steinernema* sp. è stato estratto da un adulto raccolto in Arabia Saudita (SALEH *et al.*, 2011). Saggi condotti in laboratorio e in condizioni seminaturali hanno mostrato un'alta virulenza di questo nematode nei confronti di esemplari adulti del punteruolo ed hanno messo in evidenza come la temperatura possa influenzarne l'efficacia (SALEH *et al.*, 2011): i nematodi sono infatti sensibili alle elevate temperature, alle radiazioni ultraviolette e alla bassa umidità. Come suggerito da LLÁCER e collaboratori (2009) e DEMBILIO e collaboratori (2010b), l'uso del chitosano (un polisaccaride lineare) come coadiuvante può proteggere i nematodi da condizioni ambientali estreme. Interessanti risultati sono stati ottenuti anche con un altro ceppo di *Steinernema* sp. isolato da pupe e adulti di punteruolo raccolti in Egitto (SHAMSELDEAN & ATWA, 2004). Anche la predazione da parte dell'acaro *Centrouropoda almerodai*, strettamente associato al punteruolo, almeno in Italia (MAZZA *et al.*, 2011b), può ridurre l'efficacia del nematode *S. carpocapsae* (MORTON & GARCIA-DEL-PINO, 2011). Differenze significative sono state osservate nella mortalità dei vari stadi del punteruolo a seconda della specie e della concentrazione di nematodi utilizzati (TRIGGIANI & TARASCO, 2011). *Heterorhabditis bacteriophora*, ad esempio, è risultata essere la specie più virulenta in prove di laboratorio nei confronti di larve e adulti di punteruolo e l'unica capace di riprodursi all'interno dell'ospite (TRIGGIANI & TARASCO, 2011). Ulteriori studi sono dunque necessari per chiarire quali siano i fattori capaci di bloccare la riproduzione dei nematodi nelle larve e negli adulti di punteruolo rosso.

#### ACARI

Nel 1966, WATTANAPONGSIRI ha revisionato lo stato delle conoscenze sugli acari associati ai punteruoli dei generi *Dynamis* e *Rhynchophorus*. Questi acari appartengono a diverse

famiglie tra cui Acaridae, Anoetidae, Blattisociidae, Diplogyniidae, Macrochelidae e Uropodidae. Dopo la recente colonizzazione del punteruolo, particolarmente nel Mediterraneo, molti autori riportano la presenza di acari appartenenti a diverse famiglie su esemplari di punteruolo raccolti in Egitto (EL-SHARABASY, 2010; HASSAN *et al.*, 2011), Italia (LONGO & RAGUSA, 2006), Malta (PORCELLI *et al.*, 2009), Arabia Saudita (AL-DHAFAR & AL-QAHTANI, 2012), Turchia (ATAKAN *et al.*, 2009) e Emirati Arabi Uniti (AL DEEB *et al.*, 2011). Gli acari più comuni sono specie foretiche appartenenti agli Uropodina (WATTANAPONGSIRI, 1966; LONGO & RAGUSA, 2006; ATAKAN *et al.*, 2009; PORCELLI *et al.*, 2009; EL-SHARABASY, 2010; AL DEEB *et al.*, 2011). Numerosi autori ipotizzano che questi acari non siano semplicemente foretici e che la loro presenza possa influenzare la *fitness* del fitofago, riducendone la durata della vita (MAZZA *et al.*, 2011b) o impedendone l'attività di volo (ATAKAN *et al.*, 2009b).

Acari ectoparassiti si ritrovano invece nella famiglia dei Podapolidae (revisionati da HUSBAND & OCONNOR, 1999), come *Rhynchopolipus swifatae* su *R. ferrugineus*. *Hypoaspis* sp. e *R. rhynchophori* sono stati osservati in associazione con *R. ferrugineus*, ma il rapporto di queste specie con il punteruolo rimane ancora incerto (R. Nannelli, oss. pers.). Al contrario, ABDULLAH (2009) riporta un successo nell'utilizzo di *R. rhynchophori* come agente di biocontrollo nei confronti del punteruolo rosso.

#### INSETTI

Insetti parassitoidi o predatori dei curculionidi del genere *Rhynchophorus* includono diverse specie appartenenti ai Dermaptera, Heteroptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera (MURPHY & BRISCOE, 1999). Tra le forficule o dermatteri, *Chelisoche morio* viene riportata come comune predatore delle uova e delle larve del punteruolo in India (ABRAHAM & KURIAN, 1973), mentre l'anisoplide *Euborellia annulipes* è stata trovata in palme infestate della Sicilia (MASSA & LO VERDE, 2008; LONGO *et al.*, 2009). Osservazioni condotte in laboratorio su questa specie cosmopolita, predatrice e generalista mostrano che è capace di predare le uova del punteruolo (G. Mazza, oss. pers.). Tra gli emitteri, REGINALD (1927) riporta la predazione casuale di *Platyeris laevicollis* sul punteruolo. Tra i ditteri, poche specie di Sarcophagidae e Tachinidae utilizzano le specie del genere *Rhynchophorus* come ospite (MURPHY

& BRISCOE, 1999). *Sarcophaga fuscicauda* attacca gli adulti del punteruolo in India (IYER, 1940). LO VERDE & MASSA (2007) hanno osservato, in Sicilia, su pupe del punteruolo la presenza del Tachinidae *Billaea maritima*, un parassitoide autoctono di cetonidi, ma, al momento, nessuno studio è stato effettuato per valutarne l'efficacia come possibile agente di controllo. Recente è anche la scoperta del foride *Megaselia scalaris*, specie tropicale invasiva, nelle pupe delle punteruoli in Sicilia (G. Mazza, oss. pers.), anche se il suo possibile utilizzo è sicuramente da scoraggiare visti gli effetti negativi che questa specie ha sulla salute umana (DISNEY, 2008). Tra gli Hymenoptera, solo *Scolia erratica* è stata trovata in Malesia come parassitoide del punteruolo (BURKILL, 1917), ma la sua efficacia come mezzo di controllo è ancora da valutare. Infine, il coleottero carabide *Laemostenus complanatus* è frequente nel terreno e negli stipiti di palme infestate o morte dove preda limacce; spesso viene catturato nelle trappole innescate con il feromone di aggregazione di *R. ferrugineus*; in laboratorio il carabide si alimenta anche di uova e di larve di prima e seconda età del rincoforo (S. Longo, oss. pers.).

#### VERTEBRATI

Il punteruolo rosso può essere predato anche da alcuni vertebrati. Tra gli uccelli, KRISHNAKUMAR & SUDHA (2002) hanno osservato, in Asia, il corvide indiano *Dendrocitta vagabunda parvula* e l'opportunista cuculo fagiano *Centropus sinensis* predare esemplari adulti di rincoforo, mentre, in Italia oltre alla gazza *Pica pica* (LO VERDE *et al.*, 2008) il colombo *Columba livia* preda sia larve che pupe presenti nelle camere pupali cadute al suolo (S. Longo, oss. pers.). Tra i mammiferi, il ratto comune *Rattus rattus* e il topo selvatico *Apodemus sylvaticus*, nidificano sulla chioma e predano pupe e adulti nelle palme infestate della Sicilia (LO VERDE & MASSA, 2007; S. Longo, oss. pers.). Il ruolo di questi predatori occasionali è comunque quasi nullo, considerato anche l'elevato potenziale riproduttivo del punteruolo.

#### CONCLUSIONI

Le indagini sul punteruolo rosso delle palme hanno permesso di identificare numerosi nemici naturali, senza però consentire di individuare delle specie chiave. Ulteriori ricerche devono essere effettuate, sia nelle aree native che di nuova introduzione, per migliorare le conoscenze sugli

antagonisti naturali e gli agenti di malattia di questo fitofago altamente invasivo. È necessaria una maggior conoscenza in merito agli agenti di virus, soprattutto nell'ottica di realizzare un controllo integrato evitando fenomeni di interferenza con altri agenti di biocontrollo. I risultati contrastanti ottenuti in prove di laboratorio con batteri si ritiene siano da attribuire agli effetti di particolari meccanismi di difesa del fitofago. L'utilizzo di funghi entomopatogeni, come *B. bassiana* e *M. anisopliae*, isolati direttamente dai punteruoli, costituisce un interessante filone di indagine, soprattutto per gli effetti sub-letali che questi funghi provocano nell'insetto e per la possibilità di un utilizzo integrato, come suggerito da LLÁCER *et al.* (2013). Ulteriori ricerche sono comunque necessarie per isolare ceppi con maggiore virulenza e per determinarne le condizioni ottimali di sviluppo. Con riferimento all'impiego di nematodi entomopatogeni, le cui potenzialità presentano un forte interesse, è necessario tenere presente che vari fattori costituiscono elementi di problematicità, come ad esempio la necessità di frequenti applicazioni e l'elevato costo. Meritevoli di approfondimenti sono gli aspetti inerenti le implicazioni degli studi riguardanti i meccanismi capaci di determinare il blocco della riproduzione di alcune specie di nematodi entomopatogeni all'interno del curculionide. Il ruolo degli acari è ancora poco conosciuto e sono necessari ulteriori studi per la corretta determinazione delle differenti specie. Tra gli insetti parassitoidi e predatori, solo i ditteri sembrano al momento meritevoli di particolare attenzione, come dimostrato nel contenimento di *R. palmarum* con il tachinide *Billaea menezesi* (MOURA *et al.*, 1993). E' evidente la necessità di studi mirati alla corretta identificazione delle specie di ditteri risultate associate al punteruolo nelle aree di indigenato e in quelle di nuova introduzione e l'esigenza di disporre di maggiori informazioni sulla biologia di questi antagonisti, anche con riferimento alle possibilità di un loro allevamento intensivo per l'utilizzo in programmi di lotta con lanci in natura di individui prodotti in biofabbriche.

In conclusione si ritiene di fondamentale importanza richiamare l'attenzione sia sulla necessità di acquisire ulteriori dati sugli agenti di biocontrollo del punteruolo rosso nelle aree di indigenato che sulla esigenza di realizzare studi preliminari di "Pre-release risk assessment", al momento realizzati nel nostro Paese nell'ambito di interventi di lotta biologica classica solo per un ooparassitoide dell'Eterottero Neartico *Leptoglossus occidentalis* (ROVERSI *et al.*, 2013).

## RINGRAZIAMENTI

Ricerche svolte nell'ambito del progetto Finalizzato Nazionale MIPAAF "PROPALMA - Protezione delle Palme ornamentali e spontanee dall'invasione biologica del Punteruolo rosso *Rhynchophorus ferrugineus*", D.M. 25618/7301/11.

Grazie a Elena Tricarico (Dipartimento di Biologia, Università di Firenze), Jose R Faleiro (FAO of the UN, Date Palm Research Centre, Saudi Arabia) e Elena Llacer (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología Agrícola, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Spain) per i suggerimenti e la revisione critica del manoscritto. Grazie a Mauro Gori (Museo di Storia Naturale, Università di Firenze) per l'identificazione dei ditteri associati al punteruolo.

## RIASSUNTO

Il Punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier 1790), è considerato ad oggi il principale parassita delle palme. La conoscenza dei nemici naturali e dei suoi meccanismi di difesa è di fondamentale importanza per sviluppare e migliorare i metodi di lotta integrata verso questa specie. In questa revisione, abbiamo valutato il potenziale controllo biologico di questo fitofago esaminando i nemici naturali di *R. ferrugineus* sia nelle aree native che di nuova introduzione. La nostra disamina ha rivelato la segnalazione di più di 40 nemici naturali in grado di attaccare *R. ferrugineus*, senza tuttavia limitarne la sua diffusione. Funghi, batteri e nematodi entomopatogeni sono quelli più promettenti per i programmi di lotta integrata, ma studi più approfonditi sono necessari per aumentare la conoscenza dei nemici naturali, per isolare i ceppi più virulenti e per determinare le condizioni ottimali degli agenti di biocontrollo.

## BIBLIOGRAFIA

- ABDEL-SAMAD S.S.M., MAHMOUD B.A., ABBAS M.S.T., 2011 - *Evaluation of the fungus, Beauveria bassiana (Bals.) Vuill as a bio-control agent against the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.) (Coleoptera: Curculionidae)*. - Egypt. J. Biol. Pest Co., 21: 125-129.
- ABDULLAH M.A.R., 2009 - *Biological control of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) by the parasitoid mite, Rhynchopolipus rhynchophori (Ewing) (Acarina: Podapolipidae)*. - J. Egypt Soc. Parasitol., 39 (2): 679-686.
- ABRAHAM V.A., KURIAN C., 1973 - *Chelisoches morio F. (Forficulidae: Dermaptera), a predator on eggs and early instar grubs of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Curculionidae: Coleoptera)*. - J. Plant. Crops, 1: 147-152.
- AL-DEEB M., MUZAFFAR S.B., ABUAGLA A.M., SHARIF E.M., 2012 - *Distribution and abundance of phoretic mites (Astigmata, Mesostigmata) on Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae)*. - Floa. Entomol., 94 (4): 748-755.
- AL-DHAFAR Z.M., AL-QAHTANI A.M., 2012 - *Mites associated with the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Oliver in Saudi Arabia with a description of a new species*. - Acarines, 6: 3-6.
- ALFAZAIRY A.A., 2004 - *Notes on the survival capacity of two naturally occurring entomopathogens on the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae)*. - Egypt. J. Biol. Pest Co., 14: 423.
- ALFAZAIRY A.A., HENDI R., EL-MINSHAWY A.M., KARAM H.H., 2003 - *Entomopathogenic agents isolated from 19 coleopteran insect pests in Egypt*. - Egypt. J. Biol. Pest Co., 13: 125.
- ATAKAN E., ÇOBANOĞLU S., YÜSEL O., ALI BAL D., 2009 - *Kirmizipalmyeböceği [Rhynchophorus ferrugineus (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae)] üzerindeki üropodid akarlar (Acarina: Uropodidae)*. - Turk. J. Entomol., 33: 93-105.
- BANERJEE A., DANGAR T.K., 1995 - *Pseudomonas aeruginosa a facultative pathogen of red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus*. - World J. Microb. Biot., 11: 618-620.
- BESSE S., CRABOS L., PANCHAUD K., 2011 - *Efficacité de 2 souches de Beauveria bassiana sur le charançon rouge du palmier, Rhynchophorus ferrugineus*. In: AFPP-Neuvième Conférence Internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier, France, pp. 404-409.
- BURKILL I.H., 1917 - *Scolia erratica Smith, a parasite of the red coconut weevil, Rhynchophorus ferrugineus*. - Straits Settlements Garden Bulletin, 1 (11-12): 399-400.
- DANGAR T.K., BANERJEE A., 1993 - *Infection of red palm weevil by microbial pathogens*. In: Advances in Coconut Research and Development, Nair, M.K., Khan, H.H., Gopalasundaram P. & Bhaskara Rao E.V.V. Eds., Oxford IBM Publishing Co., New Delhi, pp. 531-533.
- DE CLERCQ P., MASON P.G., BABENDREIER D., 2011 - *Benefits and risks of exotic biological control agents*. - BioControl, 56: 681-698.
- DEMBILIO Ó., QUESADA-MORAGA E., SANTIAGO-ÁLVAREZ C., JACAS J.A., 2010a - *Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana as a biological control agent against the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus*. - J. Invertebr Pathol., 104: 214-221.
- DEMBILIO Ó., LLÁCER E., MARTÍNEZ DE ALTUBE M.M., JACAS J.A., 2010b - *Field efficacy of imidacloprid and Steinernema carpocapsae in a chitosan formulation against the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) in Phoenix canariensis*. - Pest Manag. Sci., 66: 365-370.
- DISNEY R.H.L., 2008 - *Natural History of the Scuttle Fly, Megaselia scalaris*. - Annu. Rev. Entomol., 53: 39-60.
- EL-SUFTY R., AL-AWASH S.A., AL BUGHAM S., SHAHDAD A.S., AL BATHRA A.H., 2009 - *Pathogenicity of the fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuill to the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.) (Col. Curculionidae) under laboratory and field conditions*. - Egypt. J. Biol. Pest Co., 19: 81-85.
- EL-SUFTY R., AL BUGHAM S., AL-AWASH S., SHAHDAD A., AL BATHRA A., 2011 - *A Trap for auto-dissemination of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana by red palm weevil adults in date palm plantations*. - Egypt. J. Biol. Pest Co., 21: 271-276.
- EL-MINSHAWY A.M., HENDI R.A., GADELHAK G.G., 2005 - *Viability of stored polyhedrosis virus of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae)*. In: FAO/IAEA International Conference on Area-Wide Control of

- Insect Pests: Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques, Vienna, Austria, pp. 241-242.
- EL-SHARABASY H.M., 2010 – *A survey of mite species associated with the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Oliver in Egypt.* - Egypt. J. Biol. Pest Co., 20 (1): 67-70.
- FALEIRO J.R., 2006 – *A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years.* - Int. J. Trop. Insect Science, 26: 135-154.
- FRANCESCO N., CALDARELLA C.G., MOSCHETTI G., 2008 – *Indagini preliminari su bacilli sporigeni associati ad adulti di Punteruolo rosso e loro possibili impieghi in lotta biologica.* In: La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Regione Siciliana-Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Servizi allo Sviluppo Eds., Vol. I, pp. 69-72.
- FRANCARDI V., BENVENUTI C., ROVERSI P.F., RUMINE P., BARZANTI G., 2012 – *Entomopathogenicity of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. And Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin isolated from different sources in the control of Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera Curculionidae).* - Redia, 95: 49-55.
- GOPINADHAN P.B., MOHANDAS N., NAIR K.P.V., 1990 – *Cytoplasmic polyhedrosis virus infecting red palm weevil of coconut.* - Curr. Sci. India, 59: 577-580.
- HASSAN M.F., NASR A.K., ALLAM S.F., TAHA H.A., MAHMOUD R.A., 2011 – *Biodiversity and seasonal fluctuation of mite families associated with the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) in Egypt.* - Egypt. J. Biol. Pest Co., 21 (2): 317-323.
- HUSBAND R.W., OCONNOR B.M., 1999 – *Two new ectoparasitic mites (Acari: Podapolipidae) of Rhynchophorus spp. (Coleoptera: Curculionidae) from Indonesia, Malaysia, the Philippines and West Africa.* - Int. J. Acarol., 25 (2): 101-110.
- IYER C.S.V., 1940 – *Two interesting and unrecorded enemies of the palm beetle, Rhynchophorus ferrugineus.* - Indian J. Entomol., 2: 98.
- JARONSKI S.T., 2010 – *Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens.* - BioControl 55: 159-185.
- KRISHNAKUMAR R., SUDHA G., 2002 – *Indian tree pie Dendrocitta vagabunda parvula (Whistler and Kinnear) (Corvidae). A predatory bird of red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.).* - Insect Environ., 8: 133.
- LLÁCER E., MARTÍNEZ DE ALTUBE M.M., JACAS J.A., 2009 – *Evaluation of the efficacy of Steinernema carpocapsae in a chitosan formulation against the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus, in Phoenix canariensis.* - BioControl, 54: 559-565.
- LLÁCER E., SANTIAGO-ÁLVAREZ C., JACAS J.A., 2013 – *Could sterile males be used to vector a microbiological control agent? The case of Rhynchophorus ferrugineus and Beauveria bassiana.* - B. Entomol. Res., doi:10.1017/S0007485312000582
- LONGO S., RAGUSA S., 2006 – *Presenza e diffusione in Italia dell'acaro Centrouropoda almerodai (Uroactiniinae Uropodina).* - Boll. zool. agr. Bachic., 38: 265-269.
- LONGO S., SUMA P., BELLA S., LA PERGOLA A. 2009 – *Artropodi associati al Punteruolo rosso delle palme.* In: Regione Siciliana - Assessorato Agricoltura e Foreste. La ricerca scientifica sul Punteruolo rosso delle palme e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Vol. I: 61-64.
- LO VERDE G., MASSA B., 2007 – *Note sul Punteruolo della palma Rhynchophorus ferrugineus (Olivier, 1970) in Sicilia (Coleoptera Curculionidae).* - Boll. zool. agr. Bachic., 39 (2): 131-149.
- LO VERDE G., CALDARELLA C.G., LA MANTIA G., SAURO G., 2008 – *Punteruolo rosso delle palme, l'emergenza continua.* - Informatore Agrario, 64 (10): 74-77.
- MANACHINI B., MANSUETO V., ARIZZA V., PARRINELLO N., 2008a – *Preliminary results on the interaction between Bacillus thuringiensis and Red palm weevil.* In: 41st Annual Meeting of Society for Invertebrate pathology and 9th international Conference on Bacillus thuringiensis, Warwick, UK, p. 45.
- MANACHINI B., ARIZZA V., PARRINELLO N., 2008b – *Sistema immunitario del Punteruolo Rosso (Rhynchophorus ferrugineus).* In: La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Regione Siciliana-Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Servizi allo Sviluppo Eds., Vol. I, pp. 133-136.
- MANACHINI B., LO BUE P., PERI E., COLAZZA S., 2009 – *Potential effects of Bacillus thuringiensis against adults and older larvae of Rhynchophorus ferrugineus.* - IOBC/WPRS Bulletin, 45: 239-242.
- MASSA B., LO VERDE G., 2008 – *Gli antagonisti naturali del Punteruolo rosso delle palme.* In: La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Regione Siciliana-Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Servizi allo Sviluppo Eds., Vol. I, pp. 73-78.
- MAZZA G., ARIZZA V., BARACCHI D., BARZANTI G.P., BENVENUTI C., FRANCARDI V., FRANDI A., GHERARDI F., LONGO S., MANACHINI B., PERITO B., RUMINE P., SCHILLACI D., TURILLAZZI S., CERVO R., 2011a – *Antimicrobial activity of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus.* - Bull. Insectology, 64 (1): 33-41.
- MAZZA G., CINI A., CERVO R., LONGO S., 2011b – *Just phoresy? Reduced lifespan in red palm weevils Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) infested by the mite Centrouropoda almerodai (Uroactiniinae: Uropodina).* - Ital. J. Zool., 78 (1): 101-105.
- MERGHEM A., 2011 – *Susceptibility of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) to the green muscardine fungus, Metarhizium anisopliae (Metsch.) in the laboratory and in palm trees orchards.* - Egypt. J. Biol. Pest Co., 21 (2): 179-183.
- MORTON A., GARCIA-DEL-PINO F., 2011 – *Possible interaction of the phoretic mite Centrouropoda almerodai on the control of Rhynchophorus ferrugineus by entomopathogenic nematodes.* - IOBC / WPRS Bulletin, 66: 363-366.
- MOURA J.I.L., MARIAU D., DELABIE J.H.C., 1993 – *Efficacy of Paratheresia menezesi Townsend (Diptera: Tachinidae) for natural biological control of Rhynchophorus palmarum L. (Coleoptera: Curculionidae).* - Oleagineux, 48: 219-223.
- MURPHY S.T., BRISCOE B.R., 1999 – *The red palm weevil as an alien invasive: biology and prospects for biological control as a component of IPM.* - BioControl, 20: 35-45.
- PORCELLI F., RAGUSA E., D'ONGHIA A.M., MIZZI S., MIFSUD D., 2009 – *Occurrence of Centrouropoda almerodai and Uroobovella marginata (Acari:*

- Uropodina*) phoretic on the Red Palm Weevil in Malta. - Bulletin of Entomological Society of Malta, 2: 61-66.
- RAO P.N., REDDY Y.N., 1980 – *Description of a new nematode Praecocilenchus ferruginophorus n. sp. from weevil pests (Coleoptera) of coconut palms in South India.* - Rivista di Parassitologia, XLI (1): 93-98
- REGINALD C., 1973 – *Principal insect pests.* In: Coconuts, Tropical Agriculture Series, Longmans, London (GB).
- ROVERSI P.F., SABBATINI PEVERIERI G., MALTESE M., FURLAN P., STRONG W.B., CALECA V., 2013 – *Pre-release risk assessment of the egg-parasitoid Gryon pennsylvanicum for classical biological control of Leptoglossus occidentalis.* - J. Appl. Entomol., doi: 10.1111/jen.12062.
- SALAMA H.S., ABD-ELGAWAD M., 2002 – *Activity of heterorhabditid nematodes at high temperature and in combination with cytoplasmic polyhedrosis virus.* - J. Pest Sci., 75: 78-80.
- SALAMA H.S., FODA M.S., EL-BENDARY M.A., ABDEL-RAZEK A., 2004 – *Infection of red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus, by spore-forming bacilli indigenous to its natural habitat in Egypt.* - J. Pest Sci., 77: 27-31.
- SALEH M.M.E., ALHEJI M.A., ALKHAZAL M.H., ALFERDAN H., DARWISH A., 2011 – *Evaluation of Steinernema sp. SA a Native Isolate from Saudi Arabia for Controlling Adults of the Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus (Oliver).* - Egypt. J. Biol. Pest Co., 21 (2): 277-282.
- SEWIFY G.H., BELAL M.H., AL-AWASH S.A., 2009 – *Use of the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana for the biological control of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Olivier.* - Egypt. J. Biol. Pest Co., 19 (2): 157-163.
- SHAMSELDEAN M.M., ATWA A.A., 2004 – *Virulence of Egyptian Steinernema tidnematodes used against the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.).* - Egypt. J. Biol. Pest Co., 14 (1): 135-140.
- TORTA L., LEONE V., CALDARELLA G., LO VERDE G., BURRUANO S., 2009 – *Microrganismi fungini associati a Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) in Sicilia e valutazione dell'efficacia entomopatogena di un isolato di Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Ossezioni preliminari.* - Micologia Italiana, 2: 49-56.
- TRIGGIANI O., TARASCO E., 2011 – *Evaluation of the autochthonous and commercial isolates of Steinernematidae and Heterorhabditidae on Rhynchophorus ferrugineus.* - B. Insectol., 64 (2): 175-180.
- TRIGGIANI O., CRAVEDI P., 2011 – *Entomopathogenic nematodes.* - Redia, 94: 119-122.
- WATTANAPONGSIRI A.L., 1966 – *Revision of the genera Rhynchophorus and Dynamis (Coleoptera: Curculionidae).* - Bulletin 1, Department of Agriculture Science, Bangkok, Thailand, pp. 328.



## INDIVIDUAZIONE E APPLICAZIONE DI COMPOSTI VOLATILI REPELLENTI PER IL CONTROLLO DELLE POPOLAZIONI DEL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME

SALVATORE GUARINO (\*) - PAOLO LO BUE (\*) - EZIO PERI (\*)  
VICTORIA SOROKER (\*\*) - STEFANO COLAZZA (\*)

(\*) Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze edificio 5, 90128 Palermo, Italy.

(\*\*) Volcani Center, ARO, Bet Dagan 50250, Israele

Letture tenuta durante la Tavola Rotonda "Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico"  
Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *Individuation and application of repellent volatile compounds for red palm weevil population control*

The red palm weevil (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Curculionidae), is one of the most severe pests of ornamental palm species in urban areas of Mediterranean countries. The cryptic nature of the weevil, and the gaps in our knowledge of its biology and ecology, hamper the development of efficient and sustainable strategies to limit its diffusion. Control strategies based on semiochemicals can be considered a suitable alternative for RPW population management, particularly in urban areas. Nevertheless these strategies might be improved by broadening our knowledge of behavior-modifying stimuli suitable for adult manipulation, such as repellent chemical compounds. A first study about the possibility to use repellent compounds for the control of *Rhynchophorus* species was carried out in Central America using  $\alpha$ -pinene and other undisclosed compounds. More recently, in Italy, in laboratory and field experiments were tested seventeen non-host volatiles as possible repellents against the RPW, selected for their repellent skills towards other arthropods. These studies showed promising results in term of repellency elicited from  $\alpha$ -pinene, methyl salicylate, 1-octen-3-ol and geraniol that elicited: 1) Significant disruption of pheromone trap attraction; 2) reduction of female's egg deposition activity; 3) antifeedant properties. The possibilities to use candidate repellent compounds in a "Push and Pull" or "stimulo-deterrent diversionary" strategies are discussed.

KEY WORDS: Coleoptera, non-host volatiles, "Push and Pull",  $\alpha$ -pinene, methyl salicylate, 1-octen-3-ol, geraniol

### INTRODUZIONE

Il Punteruolo rosso delle palme *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Curculionidae) è un coleottero curculionide originario del sud-est asiatico che, nell'ultimo decennio, si è diffuso in tutti i Paesi che si affacciano sul Bacino del Mediterraneo (OEPP/EPPO, 2008). Le specie di palme (Arecaceae) attaccate dal Punteruolo rosso delle palme riportate in letteratura sono numerose (DEMBILIO *et al.*, 2009; EPPO 2008; GIBLIN-DAVIS 2001; RAHALKAR *et al.*, 1978; WATTANAPONGSIRI 1966), tuttavia questo fitofago si è dimostrato particolarmente esiziale nei confronti della palma delle Canarie, *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud, particolarmente diffusa nelle aree urbane come pianta ornamentale. L'attività trofica delle larve di Punteruolo rosso delle palme a carico dei tessuti fogliari, vascolari e meristemati della palma porta generalmente la pianta a morte.

In Europa, nel corso dell'ultimo decennio, l'invasione del Punteruolo rosso delle palme ha

determinato la morte di decine di migliaia di palme con ripercussioni particolarmente gravi dal punto di vista paesaggistico, soprattutto in quelle aree urbane dove le palme hanno storicamente assunto grande importanza ornamentale (LO VERDE *et al.*, 2009; MANACHINI *et al.*, 2013). La natura criptica del Punteruolo rosso delle palme e la mancanza di adeguate conoscenze sulla biologia ed ecologia di questa specie da un lato hanno reso difficile eseguire una diagnosi precoce, essendo la sintomatologia del danno poco evidente nei primi stadi d'infestazione, dall'altro hanno compromesso lo sviluppo di strategie di controllo efficaci e sostenibili (BLUMBERG 2008; SOROKER *et al.*, 2005). Dalla prima comparsa del Punteruolo rosso delle palme in Europa, le strategie di controllo hanno mirato al taglio e alla successiva triturazione del materiale vegetale nel tentativo di contenerne le popolazioni (FALEIRO *et al.*, 2002; LONGO *et al.*, 2008). L'utilizzo di insetticidi a largo spettro in ambiente urbano, spesso attuato in modo irrazionale, è risultato poco sostenibile a causa dei gravi effetti che ne derivano in termini

di inquinamento ambientale. Inoltre il regolamento 2009/128/ CE, recepito in Italia dal DL150 del 14/08/12, determinerà nei prossimi anni drastiche restrizioni nell'applicazione di mezzi chimici in aree urbane. Proprio in questi ambienti è quindi opportuno vagliare nuove e sostenibili strategie di contenimento delle popolazioni del fitofago. Gli strumenti di controllo basati sulla manipolazione del comportamento attraverso l'utilizzo di composti semiochimici si candidano, in questo senso, come valide strategie alternative sia per il loro basso impatto ambientale, sia perché i semiochimici assumono un ruolo particolarmente importante nell'individuazione dell'ospite da parte di questo fitofago (WITZGALL *et al.*, 2010). Molte specie appartenenti al genere *Rhynchophorus* utilizzano feromoni di aggregazione che facilitano l'incontro tra i sessi e l'accoppiamento (GIBLIN-DAVIS *et al.*, 1996; GUNAWARDENA *et al.*, 1998; ROCHAT *et al.*, 1991). Trappole innescate con questi feromoni, spesso in associazione con sostanze a funzione caïromonale (come ad esempio, esteri delle palme e sostanze zuccherine) sono oggi utilizzate in molti paesi per il monitoraggio e la cattura massale di alcune specie di rincofori in ambienti agricoli ed urbani (GUARINO *et al.*, 2011; HALLETT *et al.*, 1999; OEHLISCHLAGER 2007; SOROKER *et al.*, 2005).

Tuttavia le scarse conoscenze sulle capacità di diffusione e sulla selezione dell'ospite da parte del Punteruolo rosso delle palme hanno suscitato perplessità e preoccupazioni sull'utilizzo delle trappole a feromone, dovute al fatto che queste possano determinare un richiamo del fitofago anche in areali ancora indenni. Infatti non si può escludere che la distribuzione di trappole innescate con attrattivi in aree ancora indenni possa mettere in pericolo le piante presenti in prossimità delle trappole stesse (GUARINO *et al.*, 2013).

Le strategie che mirano al controllo del Punteruolo rosso delle palme basate su attrattivi semiochimici presenti nelle trappole potrebbero venire ottimizzate attraverso l'utilizzo contemporaneo di altri composti che agiscano come stimoli repellenti nei confronti del fitofago, da applicare a protezione delle palme stesse.

#### COMPOSTI AD AZIONE REPELLENTE NEI CONFRONTI DEI COLEOTTERI

Nel corso degli ultimi cinquanta anni numerosi oli essenziali di piante sono state valutati per le loro proprietà repellenti nei confronti degli insetti (SUKUMAR *et al.* 1991). In particolare contro i coleotteri, oli essenziali con proprietà repellenti,

estratti da substrati vegetali, sono stati usati spesso come una valida alternativa all'impiego di insetticidi di sintesi (DETHIER, 1956; HUANG & HO, 1998; SHIMIZU & HORI, 2009). Molti studi sono stati condotti sull'uso di sostanze repellenti per la difesa delle derrate alimentari da *Lasioderma serricorne* Fabricius, *Tribolium castaneum* Herbst, *Callosobruchus chinensis* L. e *Sythophilus oryzae* L., (HUANG & HO 1998; KIM *et al.*, 2003; ZAPATA & SMAGGHE, 2010). Spesso l'attività repellente e tossica degli oli essenziali è determinata dalla sinergia delle diverse sostanze presenti negli estratti, più raramente l'azione repellente è determinata da una o poche sostanze. Ad esempio nel caso di estratti di cannella *Cinnamomum aromaticum* Nees, che esercitano attività repellente nei confronti di *T. castaneum* e *Sythophilus zeamais* Motsch, è stato osservato che la molecola attiva all'interno del blend è principalmente la aldeide cinnamica (HUANG & HO, 1998).

Numerosi sono anche gli studi effettuati sui repellenti nei confronti di coleotteri di interesse forestale (PURESWARAN & BORDEN 2004; GILLETTE RAPPAPORT *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1999). Partendo dal presupposto che la selezione dell'ospite da parte del coleottero fitofago è determinata da segnali di origine chimica, questi studi hanno saggiato la capacità di composti volatili tipici di piante non ospiti nel "mascherare" i composti attrattivi (ZHANG *et al.*, 1999). Ad esempio alcuni alcoli a lunga catena, tipici di piante non ospiti dello scolitide dell'abete rosso, *Ips typographus* L., posti all'interno delle trappole a feromone determinano una riduzione delle catture dei maschi (ZHANG *et al.*, 1999). Per alcune specie come *Tomicus destruens* Wollastone è stato identificato uno specifico recettore olfattivo neuronale di molecole volatili di piante non ospiti che agiscono mascherando l'odore della pianta ospite (GUERRERO *et al.*, 1997). In altri casi, sostanze naturalmente prodotte per svolgere un ruolo di feromone di anti-aggregazione come il verbenone (una molecola con spiccata attività semiochimica di antiaggregazione delle specie appartenenti al genere *Dendroctonus*) posizionate all'interno di trappole a feromone determinano una significativa riduzione delle catture di *Dendroctonus pseudotsugae* Hopkins e *D. ponderosae* Hopkins (GILLETTE RAPPAPORT *et al.*, 2001; PURESWARAN & BORDEN, 2004). In uno studio recente condotto da GILLETTE *et al.*, (2012) è stato messo in luce che l'applicazione del verbenone direttamente sulle piante di *Pinus albicaulis* Engelm permette una significativa riduzione degli attacchi da parte di *D. ponderosae*.

STUDI SUI REPELLENTI NEI CONFRONTI  
DI *RHYNCHOPHORUS* SPP.

Il primo studio sull'attività di alcuni composti repellenti nei confronti di specie appartenenti al genere *Rhynchophorus* è stato effettuato da OEHLISCHLAGER & GONZALEZ (2001). Come osservato nelle prove effettuate su specie di interesse forestale, anche in questo caso i composti candidati repellenti, tra cui  $\alpha$ -pinene ed un altro composto non rivelato dagli autori, sono stati testati all'interno delle trappole innescate con feromoni ed attrattivi alimentari per valutarne la capacità nel ridurre le catture degli adulti di *R. palmarum* L. (OEHLISCHLAGER & GONZALEZ, 2001). Più recentemente GUARINO *et al.*, (2013) hanno dimostrato l'attività repellente nei confronti di *R. ferrugineus* di diversi composti sintetici appartenenti alle classi degli isoprenodi, dei fenilpropanoidi e dei derivati degli acidi grassi. Queste sostanze erano state prese in considerazione in quanto composti volatili di piante non ospiti del Punteruolo rosso delle palme con attività repellente già riportata in bibliografia su altri artropodi. In una prima fase è stata valutata la risposta elettroantennografica (EAG) del Punteruolo rosso delle palme ai vari composti per valutare la percezione di queste molecole da parte dell'insetto. In seguito alcune delle molecole EAG-attive sono state testate in campo, singolarmente o in combinazione tra loro, per saggiare la loro capacità di ridurre le catture degli adulti nelle trappole a feromone e caïromoni. I risultati osservati, riportati in tabella 1, hanno messo in luce una significativa capacità di abbattimento delle catture rispetto alle trappole controllo da parte di  $\alpha$ -pinene (meno 30%) o della combinazione  $\alpha$ -pinene e metilsalicilato (meno 40%)

(GUARINO *et al.*, 2013). Ulteriori prove hanno messo in luce che anche altri composti, come 1-octen-3-olo e geraniolo, determinano significative riduzioni del numero di adulti catturati nelle trappole (Guarino, osservazioni personali). Questi dati, da un lato molto incoraggianti, hanno tuttavia posto l'interrogativo sulla effettiva possibilità che queste sostanze siano dei veri e propri repellenti e possano quindi essere utilizzati per proteggere la palma stessa, o abbiano invece semplicemente un'azione inibente nei confronti del feromone di aggregazione.

Ulteriori studi sono attualmente in corso per valutare l'effettiva capacità repellente di questi composti sia in laboratorio, attraverso prove mirate a saggiare la capacità antifeedant e di deterrenza dell'ovideposizione, sia in prove di campo finalizzate a valutare l'efficacia di questi nel proteggere le palme dalle infestazioni del Punteruolo rosso delle palme (GUARINO, in corso di stampa).

POSSIBILI APPLICAZIONI: LE STRATEGIE  
“PUSH AND PULL”

L'impiego di composti repellenti nei confronti del Punteruolo rosso delle palme potrebbe risultare particolarmente efficace all'interno delle strategie di controllo basate sulla manipolazione del comportamento della specie dannosa. Infatti, se in alcuni casi è stato osservato che l'applicazione dei repellenti, posti direttamente sulle piante o negli areali da proteggere, è riuscita a determinare una significativa riduzione degli attacchi (GILLETTE *et al.*, 2012), in altri casi la componente repellente ha avuto successo solo se accompagnata dall'utilizzo delle trappole innescate con

Tabella 1 – Biosaggi su adulti di Punteruolo rosso delle palme. Prove di laboratorio: + = attività media; ++ = attività elevata; +++ = attività molto elevata. Prove di campo: percentuale di riduzione di adulti catturati nelle trappole rispetto al controllo; n.s = riduzione non significativa (GUARINO *et al.* 2013).

| COMPOSTI<br>BIOSAGGIATI            | PROVE DI LABORATORIO |             |                              | PROVE DI CAMPO<br>% riduzione catture |
|------------------------------------|----------------------|-------------|------------------------------|---------------------------------------|
|                                    | EAG                  | antifeedant | Deterrenza<br>ovideposizione |                                       |
| $\alpha$ -pinene                   | +                    | +           | +                            | -30%                                  |
| Mentone                            | ++                   |             |                              | n.s.                                  |
| Metilsalicilato                    | ++                   | ++          | ++                           | n.s.                                  |
| 1-octen-3-olo                      | +++                  | ++          | ++                           | -45%                                  |
| Geraniolo                          | ++                   | +           | +                            | -48%                                  |
| Citronellolo                       | ++                   |             |                              | n.s.                                  |
| Citrale                            | ++                   |             |                              | n.s.                                  |
| $\alpha$ -pinene + metilsalicilato |                      | ++          | ++                           | -50%                                  |
| $\alpha$ -pinene + mentone         |                      |             |                              | -30%                                  |

una componente attrattiva (ROSS & DATERMAN, 1995; LINDGREN & BORDEN 1993). Il controllo delle popolazioni di insetti attraverso il contemporaneo utilizzo di stimoli chimici che agiscono come attrattivi (da usare nelle trappole) e repellenti (da porre sulla pianta o nella zona da proteggere) viene definito come strategia “Push and Pull” (COOK *et al.*, 2007; HASSANALI *et al.*, 2008). In ambito agricolo questo tipo di strategie è stato impiegato con successo per il controllo di numerosi coleotteri fitofagi come *Sitona lineatus* L., *Leptinotarsa decemlineata* Say e *Meligethes aeneus* Fabricius (SMART *et al.*, 1994; MARTEL *et al.*, 2005; COOK *et al.*, 2006). Ad oggi tuttavia gli studi sulla possibilità di applicare queste strategie negli ambienti urbani sono scarsi e limitati a specie di insetti domestici come le blatte (NALYANYA *et al.*, 2000; SAKUMA & FUKAMI, 1993).

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'individuazione di composti repellenti efficaci è un primo passo importante verso l'applicazione del “Push and Pull” come strategia di controllo nei confronti del Punteruolo rosso delle palme. Tuttavia, al fine di attuare con successo questa tecnica all'interno di aree urbane, è opportuno approfondire le conoscenze su alcuni parametri chiave come la modalità di somministrazione del repellente, la densità delle trappole da utilizzare e la distanza delle trappole a feromone e cairomoni dalle palme. Tutti questi fattori sono al momento oggetto di specifiche prove in condizioni di campo in ambiente urbano al fine di ottimizzare la strategia del “Push and Pull” per contenere le infestazioni del Punteruolo rosso delle palme.

## RINGRAZIAMENTI

Il lavoro è stato eseguito con il contributo del progetto europeo “PALM PROTECT - Strategies for the eradication and containment of the invasive pests *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier and *Paysandisia archon* Burmeister”.

## RIASSUNTO

Il Punteruolo rosso delle palme *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Curculionidae), è uno dei più pericolosi fitofagi delle palme ornamentali nelle aree urbane dei Paesi che si affacciano sul Bacino del Mediterraneo. La natura criptica di questo insetto e la mancanza di adeguate conoscenze sulla sua biologia ed ecologia hanno impedito lo sviluppo di adeguate strategie efficienti e sostenibili per limitarne la diffusione. Le strategie di controllo basate su semiochimici possono essere considerate una valida alternativa per il contenimento delle popolazioni di que-

sto fitofago, in particolare nelle aree urbane. Al fine di perfezionare queste strategie, sono necessari tuttavia ulteriori studi comportamentali per identificare sostanze che agiscano come stimoli repellenti. Un primo studio condotto sulla possibilità di utilizzare repellenti contro specie appartenenti al genere *Rhynchophorus* è stato effettuato in America Centrale dove sono stati biosaggiati  $\alpha$ -pinene ed altri composti rimasti non svelati. Più recentemente, in Italia, è stato condotto uno studio di laboratorio e di campo nel quale sono stati testati diciassette composti volatili di piante non-ospiti del Punteruolo rosso delle palme, selezionati per la loro attività repellente già evidenziata verso altri artropodi. Promettenti risultati in termini di repellenza sono stati rilevati dalle molecole  $\alpha$ -pinene, metilsalicilato, 1-octen-3-olo e geraniolo che hanno determinato: 1) riduzione dell'attrattività degli adulti verso le trappole a feromone e cairomoni; 2) riduzione dell'attività di deposizione delle uova da parte delle femmine; 3) attività antifeedant. Viene discussa dagli autori la possibilità di utilizzare questi composti come stimoli repellenti all'interno di strategie “Push and Pull” o “stimulo-deterrent diversionary”.

## BIBLIOGRAFIA

- BLUMBERG D., 2008 – *Date palm arthropod pests and their management in Israel* - Phytoparasitica, 36: 411-448.
- COOK S.M., SMART L.E., MARTIN J.L., MURRAY D.A., WATTS N.P., WILLIAMS I.H., 2006 – *Exploitation of host plant preferences in pest management strategies for oilseed rape* (Brassica napus) - Entomol. Exp. Appl., 119: 221-29.
- DEMBILIO O., JACAS J.A., LLÁCER E., 2009 – *Are the palms Washingtonia filifera and Chamaerops humilis suitable hosts for the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus* (Col. Curculionidae)? - J. App. Entomol., 133: 565-567.
- DETHIER V.G., 1956 – *Repellents*. - Ann. Rev. Entomol. 1: 181-202.
- EPPO, 2008 – *Data sheet on quarantine pests. Fiches informatives sur les organismes de quarantaine*. Rhynchophorus ferrugineus. - EPPO Bulletin, 38: 55-59.
- FALEIRO J.R., ASHOK KUMAR J., RANGNEKAR P.A., 2002 – *Spatial distribution of red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus Oliv. (Coleoptera: Curculionidae) in coconut plantations*. - Crop Prot., 21: 171-176.
- GIBLIN-DAVIS R.M., 2001 – *Borers of palms*. In: F.W. Howard, D. Moore, R. M. Giblin-Davis, & R. G. Abad (Eds.), *Insects on palms*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 267-305.
- GIBLIN-DAVIS R.M., OEHLISCHLAGER A.C., PEREZ A., GRIES G., GRIES R., WEISSLING, T.J., CHINCHILLA C.M., PENA J.E., HALLETT R.H., PIERCE H.D., GONZALEZ L.M., 1996 *Chemical and behavioral ecology of palm weevils* (Curculionidae: Rhynchophorinae). - Fl. Entomol., 79: 153-167.
- GILLETTE RAPPAPORT N., OWEN D.R., STEIN J.D., 2001 – *Interruption of semiochemical-mediated attraction of Dendroctonus valens* (Coleoptera: Scolytidae) and selected non-target insects by verbenone. - Physiol. and Chem. Ecol., 3: 837-841.
- GILLETTE N.E., HANSEN E.M., MEHMEI C.J., MORI S.R., WEBSTER J.N., ERBILGIN N., WOOD D.L., 2012 – *Area-wide application of verbenone-releasing flakes reduces mortality of whitebark pine Pinus albicaulis caused by the mountain pine beetle Dendroctonus ponderosae*. Agric. Forest Entomol., 14: 367-375.

- GUARINO S., LO BUE P., PERI, E., COLAZZA S., 2011 – *Responses of Rhynchophorus ferrugineus adults to selected synthetic palm esters: electroantennographic studies and trap catches in an urban environment*. - Pest Man. Sci., 67: 77-81.
- GUARINO S., PERI E., LO BUE P., GERMANÀ M.P., COLAZZA S., ANSHELEVICH L., RAVID U., SOROKER V., 2013 – *Assessment of synthetic chemicals for disruption of Rhynchophorus ferrugineus response to attractant-baited traps in an urban environment*. - Phytoparasitica, 41: 79-88.
- GUERRERO, A., FEIXAS, J., PAJARES, J., WADHAMS, L.J., PICKETT, J.A., WOODCOCK, C.M., 1997 – *Semiochemically induced inhibition of behaviour of Tomicus destruens (Woll.) (Coleoptera: Scolytidae)*. - Naturwissenschaften, 84: 155-157.
- GUNAWARDENA N.E., KERN F., JANSSEN E., MEEGODA C., SCHÄFER D., VOSTROWSKY O., BESTMANN H.J., 1998 – *Host attractants for red weevil, Rhynchophorus ferrugineus: identification, electrophysiological activity, and laboratory bioassay*. - J. Chem. Ecol., 24, 425-437.
- HALLETT R.H., OEHLISCHLAGER A.C., BORDEN J.H., 1999 – *Pheromone trapping protocols for the Asian palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae)*. - Int. J. Pest Man., 45: 231-237.
- HASSANALI A., HERREN H., KHAN Z.R., PICKETT J.A., WOODCOCK C.M., 2008 – *Integrated pest management: the push-pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry*. - Ph. Trans. R. Soc. B., 363: 611-621
- HUANG Y., HO H.S., 1998 – *Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage Insects, Tribolium castaneum (Herbst) and Sitophilus zeamais Motsch.* - J. stored Prod. Res. Vol., 34: 1-17.
- KIM S.I., ROHA J.Y., KIM D.H., LEE H.S., AHN Y.J., 2003 – *Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against Sitophilus oryzae and Callosobruchus chinensis*. - J. Stor. Prod. Res., 39: 293-303.
- LINDGREN B.S., BORDEN J.H., 1993 – *Displacement and aggregation of mountain pine beetles, Dendroctonus ponderosae (Coleoptera: Scolytidae), in response to their antiaggregation and aggregation pheromones*. - Can. J. For. Res., 23 (2): 286-290.
- LO VERDE G., SPADAFORA A., SAURO G., LA MANTIA G., CALDARELLA C., 2009 – *Diffusione del Punteruolo rosso delle palme a Palermo a tre anni dalla sua introduzione*. In: La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia, 1: 49-52.
- LONGO S., COLAZZA S., CACCIOLA S. O., MAGNANO DI SAN LIO G., 2008 – *Il caso delle palme*. Supplemento a "I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili" Anno 2007 serie VIII, 4: 65–102.
- MANACHINI B., BILLECI N., PALLA F., 2013 – *Exotic insect pests: The impact of the Red Palm Weevil on natural and cultural heritage in Palermo (Italy)*. - J. Cul. Her. 14: 177-182
- MARTEL J.W., ALFORD A.R., DICKENS J.C., 2005 – *Synthetic host volatiles increase efficacy of trap cropping for management of Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say)*. - Agric. For. Entomol., 7: 79-86.
- NALYANYA G., MOORE C.B., SCHAL C., 2000 – *Integration of repellents, attractants, and insecticides in a "push-pull" strategy for managing German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) populations*. - J. Med. Entomol., 37:427-34
- NERIO L.S., OLIVERO-VERBEL J., STASHENKO E., 2010 *Repellent activity of essential oils: A review*. - Biores. Tech., 101: 372-378.
- OEHLISCHLAGER C., 2007 – *Optimizing trapping of palm weevils and beetles*. - Acta Horticulturae, 736: 347-368.
- OEHLISCHLAGER A.C., GONZALEZ L., 2001 – *Advances in trapping and repellency of palm weevils. in Proceedings of the Second International Conference on Date Palms (Al-Ain, UAE)*. www.pubhort.org/datepalm/datepalm2/datepalm2\_40.pdf.
- PURESWARAN D.S., BORDEN J.H., 2004 – *New repellent semiochemicals for three species of Dendroctonus (Coleoptera: Scolytidae)*. - Chemoecology, 14: 67-75
- RAHALKAR G.W., TAMHANKAR A.J., SHANTARAM K., 1978 – *An artificial diet for rearing red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv.), a serious pest of the coconut palm and other cultivated palms*. -J. Plant Crops., 6: 61-64.
- ROSS D.W., DATERMAN G.E., 1995 – *Efficacy of an antiaggregation pheromone for reducing Douglas-Pr beetle infestation in high risk stands*. Can. Entomol. 127: 805-811.
- ROCHAT D., MALOSSE C., LETTERE M., DUCROT P.H., ZAGATTI P., RENOU M., DESCOINS C., 1991 – *Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil, Rhynchophorus palmarum (L.) (Coleoptera: Curculionidae), collection, identification, electrophysiological activity and laboratory bioassay*. - J. Chem. Ecol., 17: 1221-1230.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1993 – *Aggregation arrestant pheromone of the German cockroach, Blattella germanica (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): isolation and structure elucidation of blattellastanoside-A and -B*. - J. Chem. Ecol., 19: 2521-41
- SHIMIZU C., HORI M., 2009. – *Repellency and toxicity of troponoid compounds against the adzuki bean beetle, Callosobruchus chinensis (L.) (Coleoptera: Bruchidae)*. - J. Stor. Prod. Res., 45: 49-53
- SMART L.E., BLIGHT M.M., PICKETT J.A., PYE B.J., 1994 – *Development of field strategies incorporating semiochemicals for the control of the pea and bean weevil, Sitona lineatus L.* - Crop Prot., 13:127-35
- SOROKER V., BLUMBERG D., HABERMAN A., HAMBURGER-RISHARD M., RENE S., TABELAEV S., ANCHELEVICH L., HARARI A., 2005 – *Current status of red palm weevil infestation in date palm plantations in Israel*. - Phytoparasitica, 33: 97-106.
- SUKUMAR K., PERICH M.J., BOOBAR L.R., 1991 – *Botanical derivatives in mosquito control: a review*. - J. Am. Mosq. Control Assoc., 7: 210-237.
- WATTANAPONGSIRI A., 1966 – *A revision of the genera Rhynchophorus and Dynamis (Coleoptera: Curculionidae)*. - Dept. of Agriculture Science Bulletin Bangkok, 1: 328.
- WITZGALL P., KIRSCH P., CORK A., 2010 – *Sex pheromones and their impact on pest management*. - J. Chem. Ecol., 36: 80–100.
- ZAPATA N., SMAGGHE G., 2010 – *Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of Laurelia sempervirens and Drimys winteri against Tribolium castaneum*. - Ind. Crop. Prod., 32: 405-410.
- ZHANG Q.H., SCHLYTER F., ANDERSON A., 1999 – *Green Leaf Volatiles Interrupt Pheromone Response of Spruce Bark Beetle, Ips typographus*. - J. Chem. Ecol., 25: 2847-61.



## METODI DI MONITORAGGIO DELLE INFESTAZIONI DEL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME

POMPEO SUMA (\*) - SANTI LONGO (\*) - ALESSANDRA LA PERGOLA (\*) - VICTORIA SOROKER (\*\*)

(\*) *Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agro-alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Catania, via S. Sofia 100, Catania; suma@unict.it*

(\*\*) *Volcani Center, ARO, Bet Dagan 50250, Israele.*

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Il punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico". Seduta Pubblica dell'Accademia - Firenze - 15 Novembre, 2013.

### *Monitoring strategies for the detection of *Rhynchophorus ferrugineus* infestations*

The detection of the Red Palm Weevil (RPW) *Rhynchophorus ferrugineus* infestations is important for the timely development of effective control methods. In relation to the ethology of the weevil, poorly reliable are the indications given by direct visual observations and then, in function of the availability of commercially equipment, the following preliminary tests were recently carried out: I) visual surveys II) thermographic measurements, III) remote visual inspections, IV) use of pheromone traps baited with the synthetic aggregation pheromone, V) chemical detection using sniffer dogs. The results obtained within the tests were not fully satisfactory; poor information were possible to achieved based on the visual observations of the infested palm trees as well as using the infrared cameras. Interesting were the results obtained with the trap monitoring system that, as well as the chemical detection by means of the sniffer dogs, seemed the most effective and reliable method to monitor and detect RPW infestations. Considering that the infested palms can recover only if treated at an early stage of infestation more efforts are needed to improve these monitoring strategies in order to achieve more consistent results in the management of the weevil infestations.

KEY WORDS: *Red palm weevil, visual detection, baited traps, chemical detection, sniffer dogs.*

### INTRODUZIONE

La globalizzazione del mercato con la conseguente movimentazione di palme adulte ospitanti stadi biologici di fitofagi e gli insufficienti controlli fitosanitari sono state le cause principali della recente introduzione e diffusione in Italia del Punteruolo rosso delle palme *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). Il coleottero, di origine asiatica, è stato introdotto nel bacino del Mediterraneo nei primi anni '90 (COX, 1993; KEHAT, 1999) e, a distanza di circa un decennio dalla sua prima segnalazione in Spagna (BARRANCO *et al.*, 1996), è stato rinvenuto in Italia, Francia, Turchia e in Grecia dove si è inizialmente insediato prevalentemente su piante adulte e di sesso maschile di *Phoenix canariensis* (Hortorm ex Chabaud). Il contenimento delle infestazioni del Punteruolo rosso presenta problemi di non facile soluzione, in particolare in ambito urbano. Il comportamento da endofita delle larve del coleottero e le notevoli dimensioni delle palme rendono poco efficace la lotta per l'impossibilità di individuare le fasi iniziali delle infestazioni quando gli adulti e le larve sono raggiungibili dagli insetticidi (LONGO, 2006). Diversi sono i sistemi di monitoraggio finora proposti e sperimentati per individuare tempestivamente la presenza degli adulti e soprattutto delle larve endofite

che però, ad oggi, non hanno fornito risultati attendibili e inequivocabili. Nelle palme delle Canarie, infestate dall'insetto, l'attacco non si manifesta per mesi, nel corso dei quali le larve si sviluppano nella parte sommitale dello stipite (LONGO *et al.*, 2009). La possibilità quindi di poter disporre di mezzi e metodologie di indagine utili a una corretta diagnosi delle infestazioni di *R. ferrugineus* il più possibile tempestiva e rapida, è certamente uno degli aspetti che, nell'ambito della ricerca, assume notevole interesse pratico applicativo. Pertanto, ai fini della definizione di metodologie idonee al monitoraggio delle infestazioni di *R. ferrugineus*, nell'ambito di specifici progetti di ricerca (FitoPalmIntro, DiProPalm, PalmProtect) nell'ultimo settennio, sono state effettuate prove sperimentali mirate a valutare l'applicabilità di diverse tecniche, note e meno note, opportunamente adattate allo scopo.

### MONITORAGGIO DEGLI ADULTI

#### *Trappole innescate con i feromoni sintetici di aggregazione*

Trappole attivate con i feromoni sintetici di aggregazione "Rhynchophorol" o "Ferrugineol" (4-methyl-5-nonanol) (HALLET *et al.*, 1993; GUNAWARDENA *et*

*al.*, 1995; FALEIRO *et al.*, 2000) addizionate con acetato di etile e melasso, sono state impiegate in Sicilia, per il monitoraggio degli adulti del Punteruolo rosso già a partire dal 2006. Le trappole, inizialmente costruite artigianalmente e via via sostituite con quelle disponibili in commercio, consistevano in contenitori in plastica di forma parallelepipedica o cilindrica della capacità di circa 5 litri, provvisti di aperture nelle zone laterali e in quella superiore per consentire l'ingresso degli adulti attratti. Inizialmente le trappole sono state installate sullo stipite delle palme a un'altezza di circa 3 m; negli anni successivi, considerate le basse catture effettuate e le conoscenze acquisite sull'etologia degli adulti, le trappole sono state parzialmente interrare (OEHLISCHLAGER *et al.*, 1993), a circa 10-20 m di distanza dalle palme da monitorare, sia asintomatiche che con sintomi di infestazione.

Le catture nelle trappole, registrate dal 2007 al 2013, in Sicilia (7.103 maschi e 12.312 femmine), hanno consentito di accertare che gli adulti di Rincoforo sono attivi nel corso dell'intero anno con brevi interruzioni dei voli nei periodi in cui le temperature giornaliere superano i  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  o sono inferiori a  $12 \pm 1^\circ\text{C}$  (Fig. 1). Inoltre, le trappole, che hanno catturato in prevalenza femmine (65%), il 90% delle quali fecondate, hanno permesso di intercettare la presenza di adulti del Punteruolo persino in un sito ricadente nel Parco dell'Etna, a quota 1.030 m s.l.m.m. e distante oltre 5 Km dalle palme più vicine.

Contestualmente, in 45 siti della Sicilia centro-

orientale, è stato predisposto un sistema di sorveglianza/monitoraggio degli adulti del Punteruolo rosso, impiegando un totale di 58 delle trappole descritte in precedenza (47 in provincia di Catania, 6 in provincia di Siracusa, 2 in quella di Ragusa e una rispettivamente in provincia di Caltanissetta, Enna e Messina). Nello specifico, le trappole, sono state installate in zone in cui erano presenti palme delle Canarie con sintomi evidenti di infestazione attiva, in areali in cui le palme presentavano una leggerissima asimmetria della chioma e in aree, apparentemente indenni, limitrofe ad altre con infestazioni conclamate. Obiettivo della sperimentazione è stato quello di ricavare dati significativi sull'impiego delle trappole come strumenti di accertamento tempestivo dell'arrivo dell'insetto nelle zone apparentemente indenni. Allo scopo, parametri di valutazione sono stati individuati nelle diverse risposte ottenute dall'analisi delle catture e suddivise in: a) *positive* relative a quelle registrate nelle trappole poste in aree in cui sussistevano infestazioni già appurate o relative all'assenza di catture in zone in cui le infestazioni non erano manifeste; b) *negative* relative a tutti quei casi in cui non sono state registrate catture nelle trappole benché le infestazioni fossero già visivamente accertate; c) *di allerta* relative ai casi in cui si registravano catture alle trappole laddove le palme monitorate non presentavano, al momento dell'attivazione delle trappole, infestazioni evidenti ma che solo successivamente hanno manifestato sintomi. I risultati ottenuti (Fig. 2 e 3), evidenziano

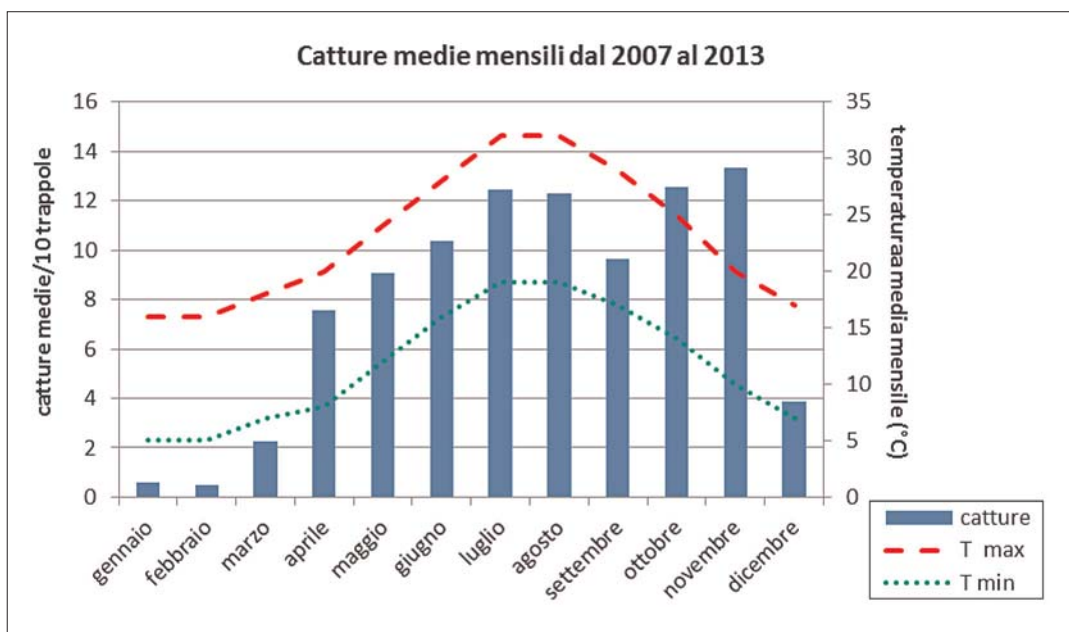


Fig. 1

Numero medio di adulti di RPW catturati mensilmente in 10 trappole dal 2007 al 2013 installate nel centro urbano di Catania e temperature medie mensili.

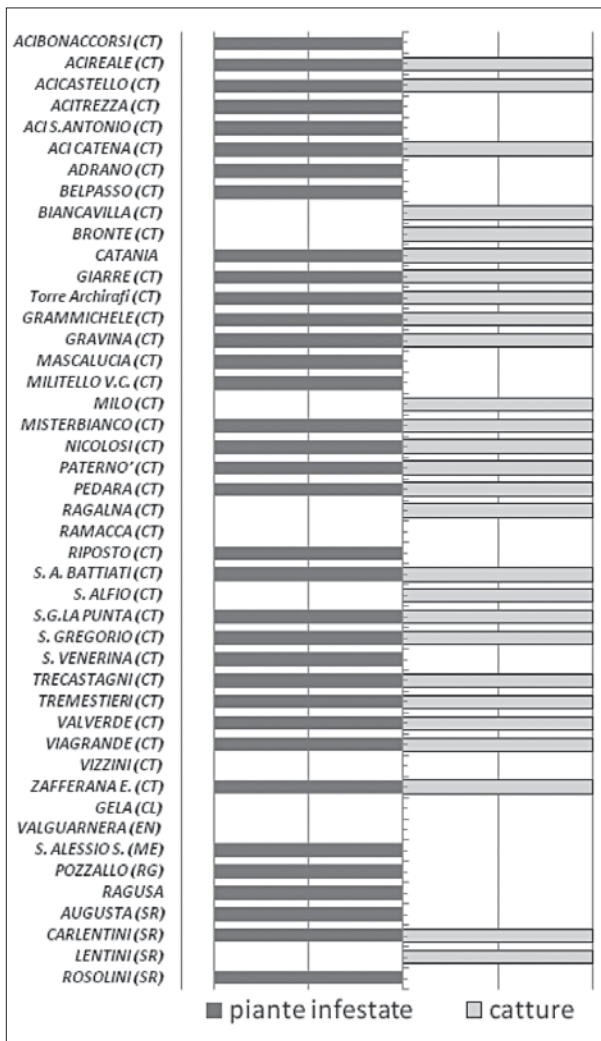


Fig. 2

Corrispondenza tra presenza di piante infestate e catture alle trappole effettuate nei 45 siti di indagine nel quadriennio 2006-09, in Sicilia centro-orientale.

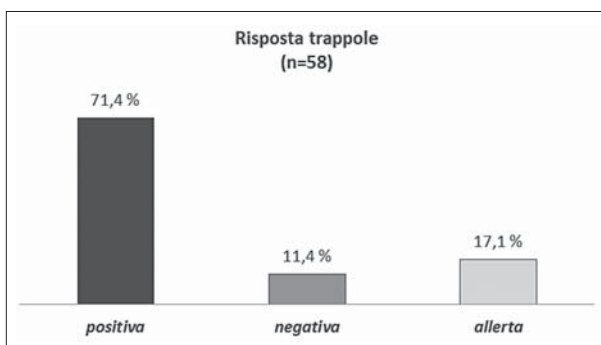


Fig. 3

Risposta delle trappole impiegate per la cattura degli adulti di *Rhynchophorus ferrugineus* e attivate con il feromone sintetico di aggregazione, mantenute in 45 siti della Sicilia centro-orientale nel quadriennio 2006-09. *Positive* sono le indicazioni relative alle catture registrate nelle trappole poste in aree con palme palesemente infestate o all'assenza di catture nelle zone in cui le infestazioni non erano manifeste; *negative* nei casi in cui non sono state registrate catture nelle trappole benché le infestazioni fossero già visivamente evidenti; *allerta* è riferita ai casi in cui sono state registrate catture nelle trappole benché le palme monitorate non presentavano infestazioni evidenti, manifestate solo in tempi successivi.

che più del 70% delle trappole impiegate ha dato risposte positive catturando gli adulti del coleottero laddove erano presenti infestazioni manifeste o non registrando catture nelle zone "indenni". Anche i dati relativi all'*allerta* non vanno sottovalutati; infatti diversi sono stati i casi in cui le trappole hanno catturato gli adulti del Punteruolo in zone le cui piante apparivano in buono stato fitosanitario e che solo successivamente, hanno manifestato i primi sintomi di attacco. In tale contesto dunque, il lasso di tempo intercorso tra catture alle trappole e manifestazione dei primi sintomi, potrebbe rappresentare un fattore di estrema importanza per effettuare tempestivi interventi di controllo del coleottero.

#### INDIVIDUAZIONE DEI SINTOMI DELL'INFESTAZIONE NELLE PALME

##### Indagine visiva diretta

L'esame visivo diretto delle palme, per l'individuazione tempestiva delle infestazioni, presenta notevoli difficoltà in relazione alla specie e all'altezza della palma e non sempre fornisce indicazioni affidabili. Per gli esemplari di notevole altezza è infatti necessario disporre di costose pedane elevatrici e occorre eseguire dei saggi per avere la certezza della presenza di stadi biologici attivi del Punteruolo.

L'infestazione nelle palme delle Canarie si rende manifesta solo in una fase avanzata, con dei caratteristici tagli nelle foglie apicali dovuti all'attività trofica delle larve a spese del meristema apicale cui segue un asimmetrico portamento della chioma che, successivamente, assume un caratteristico aspetto divaricato "ad ombrello aperto". Le foglie spesso cadono per cedimento del picciolo fogliare, per cui la pianta appare come "capitozzata".

##### Indagine visiva indiretta

Per la messa a punto di tale tecnica è stata utilizzata una microcamera wireless (risoluzione PAL di 628x582 pixel; frequenza operativa 1.2Ghz; messa a fuoco manuale da 30 mm a infinito e dimensioni di 33x42x33 mm.) montata su asta telescopica da 6 metri connessa a un computer portatile dotato di ingresso video per l'acquisizione, su supporto digitale, di immagini fisse e di filmati. Assicurata la microcamera alla sommità dell'asta telescopica e connesso il trasmettitore di segnale al computer, si procedeva all'ispezione della chioma delle palme selezionate allo scopo. La camera veniva diretta, ove possibile, alla base delle foglie e verso la zona centrale della chioma in cui maggiori erano le probabilità di intercetta-

re tracce delle infestazioni del Rincoforo. Le osservazioni effettuate, tutte memorizzate su supporto digitale, hanno avuto una durata media di 15 minuti/pianta. Dall'analisi del materiale collezionato nel corso delle *indagini visuali indirette*, non è stato possibile ricavare indicazioni affidabili circa l'inequivocabile presenza di stadi biologici del punteruolo nelle palme asintomatiche; infatti, il particolare assetto strutturale della porzione aerea delle palme oggetto di studio, ostacolava qualsiasi manovrabilità e l'adeguato posizionamento della microcamera sulla chioma delle stesse. Inoltre, le caratteristiche tecniche dello strumento impiegato, e il grado di risoluzione delle immagini, non sempre hanno permesso l'identificazione dei tessuti vegetali alterati soprattutto quando questi si trovavano nelle parti più interne della chioma delle piante. Non è da escludere tuttavia che, tale tecnica, disponendo di apparecchiature maggiormente sensibili, possa trovare un utile impiego nella ricerca delle tracce di infestazione su palme non eccessivamente alte in cui l'operatore può facilmente manovrare la microcamera stessa.

#### INDIVIDUAZIONE DEGLI STADI PREIMMAGINALI E DEGLI ADULTI NELLE PALME

Al fine di accertare tempestivamente la presenza dell'insetto nelle palme, sono state sperimentate tecniche diagnostiche basate su indagini termografiche, visive indirette (endoscopia), nonché sull'impiego di unità cinofile addestrate a tale scopo.

##### *Indagine termografica*

Rilievi termometrici, preliminarmente effettuati

nell'area urbana di Catania, utilizzando un termometro digitale (range  $-50\sim 200^{\circ}\text{C}/-58\sim 392^{\circ}\text{F}$ ) la cui sonda veniva posizionata in fori praticati alla base della corona sia di palme con evidenti segni di infestazione che asintomatiche, hanno evidenziato che i tessuti danneggiati dall'insetto raggiungono temperature superiori a  $51^{\circ}\text{C}$ . La successiva dissezione degli stipiti di palme infestate ha poi consentito di accertare che, le larve, si localizzano nelle zone in cui le temperature oscillano tra  $25$  e  $30^{\circ}\text{C}$ . Pertanto, considerato che la tecnica della termografia a raggi infrarossi permette di rilevare a distanza l'energia infrarossa (o termica) emessa da un corpo, di quantificarla con estrema precisione e, in alcuni casi, di renderla visibile sotto forma di immagini (FILARDO *et al.*, 2008), è stata verificata l'idoneità di due diversi modelli di termocamere a rilevare le variazioni termiche da ricondurre alla presenza del fitofago all'interno delle palme sospette. I rilievi termografici sono stati effettuati nel corso del 2007, impiegando una termocamera modello *ThermaCAM<sup>TM</sup> P65* (sensibilità termica @  $50/60$  Hz;  $0,08^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  e campo spettrale da  $7,5$  a  $13\text{ }\mu\text{m}$ ) e una modello *ThermaVision<sup>TM</sup> serie SC6000 HS* con sensibilità inferiore ai  $20\text{ mK}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ ), della FLIR Systems Inc. Sono state complessivamente sottoposte ad analisi termografica 14 palme delle Canarie di differente sesso ed età, dislocate in siti diversi della provincia di Catania; 10 di esse presentavano livelli variabili di infestazione apparente, le restanti 4 erano del tutto asintomatiche (Fig. 4).

Gli apparecchi impiegati nell'*indagine termometrica*, hanno permesso di acquisire solo parziali indicazioni sui delta termici registrati sulle diverse palme indagate; ciò è probabilmente relazionabile anche al fatto che le procedure di acquisizione dei dati sono state effettuate unicamente durante le



Fig. 4

Confronto tra un immagine in chiaro ed una all'infrarosso dello stipite di una *P. canariensis* asintomatica.

ore diurne dei giorni di indagine il che potrebbe avere influenzato la leggibilità e l'interpretabilità dei dati acquisiti (SUMA e LONGO, 2008).

In alcuni casi specifici, i valori di temperatura registrati in palme gravemente infestate, sensibilmente superiori a quelli ottenuti da piante asintomatiche, incoraggia l'approfondimento di tale tecnica diagnostica prendendo contestualmente in considerazione altri parametri bio-morfologici della pianta che potrebbero smentire o confermare la presenza di infestazione da Rincoforo.

#### *Ispezione endoscopica*

L'applicabilità del metodo video-endoscopico per la diagnosi delle fasi iniziali delle infestazioni di *R. ferrugineus* è stata valutata nel maggio del 2008 presso il "Parco del Faro" di Catania. Allo scopo, sono state impiegate due diverse tipologie di apparecchiature messe a disposizione dal settore *Industrial Endoscopy* della Olympus Italia. Nella fattispecie, l'impiego ha riguardato un fibroscopio di tipo industriale (serie IF5D4X1) e un videoscopio industriale (serie IPLEX FX). Nel parco dove erano presenti 83 palme delle Canarie di circa 25 anni di età, caratterizzate da sintomatologie di attacco di diversa entità, sono state individuate e selezionate 4 piante per l'indagine endoscopica catalogate, in base al livello di danno apparente, in classe 0= nessun sintomo; classe 1= tracce di erosione delle foglie centrali; classe 2= asimmetria evidente della chioma; classe 3= chioma collassata ad "ombrello". Il ridotto numero di piante saggiate è stato dettato dalla parziale invasività del mezzo diagnostico adottato. Infatti l'indagine endoscopica, può essere realizzata attraverso un foro del diametro poco superiore a quello della fibra ottica dell'apparecchio impiegato ( $\varnothing$  6 mm). Tale foro è stato effettuato con un trapano

a batteria montante una punta di lunghezza pari ad almeno il raggio dello stipite delle piante da saggiare i cui diametri in media misuravano 50/70 centimetri. Le informazioni raccolte, sotto forma di immagini e/o filmati digitali, sono state acquisite e archiviate.

L'ispezione endoscopica ha permesso di evidenziare la presenza di gallerie larvali a circa 30 cm di profondità alla base della chioma delle due palme ricadenti in classe 0 e 1 rispettivamente (Fig. 5). Tuttavia l'invasività dell'intervento, potrebbe favorire l'insediamento di patogeni e danneggiare la palma soprattutto se, prima di intercettare le gallerie, occorre effettuare numerosi fori. Per ovviare in parte a tali inconvenienti è opportuno stuccare accuratamente i fori con propoli o con mastice da innesti. In linea di massima, la tecnica endoscopica potrebbe trovare applicabilità per indagini di supporto all'identificazione delle infestazioni da punteruolo, prevalentemente come ultima risorsa da impiegare nei casi in cui le osservazioni visive dirette, e/o le altre metodologie a basso livello di invasività per la pianta non permettono di accertare la presenza del coleottero all'interno delle palme sospette.

#### *Impiego di unità cinofile*

È noto che i cani sono animali particolarmente adatti alle attività di ricerca di sostanze di varia natura (ALBONE, 1984) e possono essere addestrati a individuare odori provenienti da materiali sia biologici che inerti (BROWNE *et al.*, 2006) e a localizzarli anche in piccolissime quantità (OXLEY e WAGGONER, 2009). Le unità cinofile sono coinvolte nelle attività di sdoganamento di merci di svariata natura, nei porti e negli aeroporti anche per prevenire l'indesiderata introduzione di insetti esotici. È diffuso anche l'impiego dei cani nella

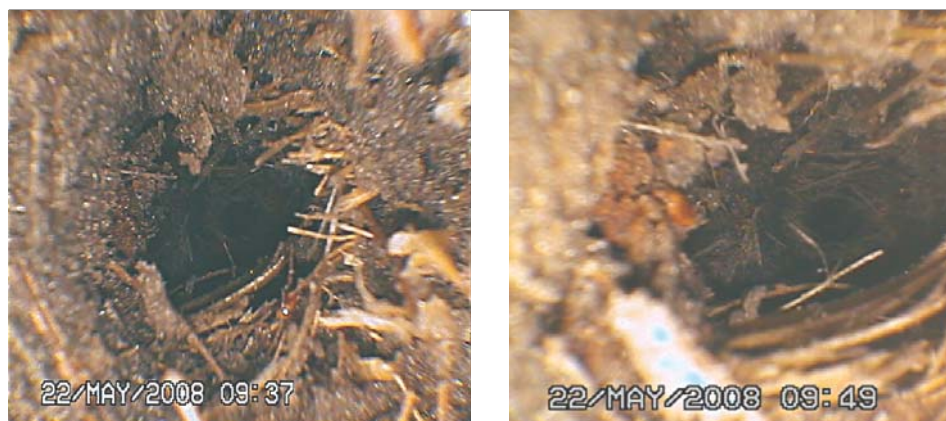


Fig. 5

Immagini endoscopiche ottenute dall'ispezione di una *P. canariensis* infestata dal Punteruolo rosso delle palme con, in evidenza, le gallerie larvali del Coleottero.

ricerca di esplosivi, contaminanti chimici, droghe illegali e nel ritrovamento di vittime di valanghe o sopravvissuti a disastri (FENTON, 1992; HEBARD, 1993). Ci sono, inoltre, numerose note in letteratura sulla possibilità di addestrare i cani all'individuazione di insetti quali il defogliatore *Lymantria dispar* L. (WALLNER e ELLIS 1976), la termite orientale *Reticulitermes flavipes* (Koehler) (BROOKS *et al.*, 2003), la cimice dei letti *Cimex lectularius* (L.) (PFIESTER *et al.*, 2008) e la formica di fuoco *Solenopsis invicta* Buren (LIN *et al.*, 2011). In Israele, NAKASH *et al.* (2000) hanno condotto prove preliminari sulla possibilità di utilizzare i cani per il riconoscimento di *Phoenix dactylifera* L. infestate da *R. ferrugineus* in dattereti con risultati incoraggianti. Da queste premesse, al fine di monitorare la presenza del Punteruolo rosso e di accertarne le fasi iniziali delle infestazioni, sono state avviate delle indagini atte a verificare l'efficacia dell'olfatto di cani addestrati allo scopo. I test sperimentali sono stati condotti utilizzando dodici *P. canariensis* indenni, coltivate in vaso, disposte su tre file da quattro piante cadauna e distanziate un metro l'una dall'altra. Sono state poste a confronto 4 tesi costituite rispettivamente da palme nella cui chioma veniva occultata una provetta tipo "falcon" contenente una delle seguenti esche: 5 femmine, 5 maschi, 5 coppie o 5 larve del Rincoforo. Ogni cane effettuava tre passaggi per ciascuna palma per un totale di tre replicazioni; ad ogni segnalazione esatta il cane veniva ricompensato dall'addestratore. Le risposte venivano registrate come "vere positive" quando veniva segnalata una palma con la provetta contenente stadi biologici del Punteruolo e "false positive" quando il cane segnalava una palma che nascondeva la provetta vuota impiegata come controllo. I risultati complessivi delle risposte dei tre cani hanno evidenziato una spiccata abilità nell'identificare correttamente le palme in cui erano presenti le provette con gli stadi biologici del Punteruolo, con una percentuale di risposte positive del 78% (tab. 1) (SUMA *et al.*, 2013). Questi risultati hanno fornito indicazioni utili sulla possibilità di addestrare i cani per l'individuazione di stadi attivi del Punteruolo in condizioni di semicampo (es. vivai); i dati ottenuti sono paragonabili a quelli riportati da altri autori che, in contesti diversi, hanno ottenuto simili livelli di risposte positive dei cani (ENGEMAN *et al.*, 1998; SHELBY *et al.*, 2004). Tuttavia l'impiego delle unità cinofile, in aree urbane, per individuare le infestazioni in palme delle Canarie di notevoli dimensioni, molte delle quali gravemente infestate dal coleottero, hanno fornito indicazioni contrastanti, mostrando tutti i limiti applicativi del metodo che, in tali contesti,

Tabella 1 – Risposte positive e falsi positivi (%) dei cani addestrati per l'identificazione delle palme delle Canarie artificialmente infestate con i diversi stadi biologici del Punteruolo rosso delle palme (da SUMA *et al.*, 2013 mod.).

| Dog <sup>a</sup> | True/positive responses <sup>b</sup><br>(mean% ± SE) | False/positive responses <sup>c</sup><br>(mean% ± SE) |
|------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| RW               | 78 ± 7.0 a                                           | 11 ± 3.9 a                                            |
| GR1              | 81 ± 6.7 a                                           | 17 ± 4.5 a                                            |
| GR2              | 75 ± 7.3 a                                           | 10 ± 3.5 a                                            |
| Mean             | 78 ± 7.0                                             | 12.6 ± 3.9                                            |

<sup>a</sup> RW = Rottweiler; GR1 e GR2 = Golden Retriever;

<sup>b</sup> Risposte positive alle palme effettivamente infestate con stadi vitali di Punteruolo rosso

<sup>c</sup> Risposte alle palme non infestate.

A lettera uguale corrispondono valori statisticamente non significativi (P=0.05; Student-Newman-Keuls; STATSOFT Italia, 1997).

non pare possa rappresentare un sicuro mezzo diagnostico. Prove finalizzate a determinare l'abilità dei cani nell'individuare tempestivamente specie diverse di palme, infestate da *R. ferrugineus*, sono ancora in corso, e dai loro risultati sarà possibile valutare l'opportunità o meno di impiegare le unità cinofile, in integrazione con altri mezzi di ispezione, nei programmi di quarantena e nei punti di ingresso di materiale vegetale importato.

#### Altri metodi d'indagine

SOROKER *et al.* (2013), riportano che molte ricerche sono in fase di realizzazione per l'identificazione delle palme infestate dal Punteruolo rosso tramite tecniche quali il rilevamento olfattivo automatico e il rilevamento acustico. Il primo metodo si basa essenzialmente sull'analisi delle variazioni quali-quantitative dei volatili emessi dalle foglie delle palme in risposta agli attacchi del coleottero, confrontate con quelle di palme sane, mediante l'impiego di un "naso elettronico". Una recente applicazione del metodo, sebbene in studi preliminari (RIZZOLO *et al.*, 2012), riporta che il naso elettronico può rappresentare un valido strumento da adottare per il monitoraggio delle infestazioni di Punteruolo rosso. Il rilevamento acustico, è stato già impiegato in programmi di monitoraggio di legname infestato da termiti (SCHEFFRAHN *et al.*, 1993), nonché di adulti e larve di infestanti delle derrate alimentari (MANKIN *et al.*, 1997; POTAMITIS *et al.*, 2009); tale metodo ha permesso di monitorare e intercettare, in condizioni di isolamento acustico, larve, in attività trofica, del coleottero all'interno di palme infestate (HETZRONI *et al.*, 2004; MANKIN *et al.*, 2008; PINHAS *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ *et al.*, 2010). Il principale limite di tale applicazione risiede nel fatto che, nelle fasi iniziali delle infestazioni quan-

do il suono generato dall'attività trofica è troppo basso, non sempre è possibile discriminare tale suono da quello di fondo (HETZRONI *et al.*, 2004; SOROKER *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONI

Nonostante l'impegno profuso nello sviluppo di metodologie per il monitoraggio delle infestazioni del Punteruolo rosso, molte delle tecnologie adottate sono ancora oggi poco pratiche e affidabili lasciando all'ispezione visiva diretta, con tutti i limiti ad essa associati, il ruolo principale nella diagnosi delle infestazioni. Gli studi condotti impiegando le trappole a feromoni hanno comunque dimostrato tutta la loro validità ai fini del monitoraggio dei voli degli adulti del coleottero rappresentando, al contempo, un potenziale strumento predittivo per gli spostamenti da un areale all'altro del fitofago. Parimenti, le potenzialità applicative dell'impiego delle unità cinofile, ben si prestano al monitoraggio e all'identificazione delle palme infestate in ambienti confinati (come i vivai, o i punti di import-export di palme) mentre improbabile sembra il loro impiego in ambiente urbano. Le altre tecniche indagate non consentono, al momento, una tempestiva identificazione della presenza del coleottero su piante che, almeno in apparenza, non presentano alterazioni, fattore questo che risulta imprescindibile per l'attuazione di tempestivi interventi di lotta nelle aree di nuova diffusione dell'insetto.

Pertanto è ancora necessario cercare di migliorare l'efficacia e la sensibilità sia dei metodi già disponibili, che di quelli in fase di approfondimento che andranno, comunque, destinati a particolari circostanze.

In conclusione, nessuno dei metodi illustrati è sufficientemente sensibile e conveniente da essere adottato come unico strumento di monitoraggio e identificazione delle infestazioni del Punteruolo rosso; pertanto, l'integrazione di quelli che, ad oggi, appaiono essere più promettenti, potrebbe rappresentare una possibile soluzione da tenere in considerazione nell'ambito dei protocolli di lotta al temibile parassita.

## RINGRAZIAMENTI

Il lavoro è stato in parte eseguito con il contributo del progetto europeo "PALM PROTECT Strategies for the eradication and containment of the invasive pests *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier and *Paysandisia archon* Burmeister"

## RIASSUNTO

Il monitoraggio delle infestazioni del Punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus*, è importante per la tempestiva attuazione di efficaci interventi fitosanitari. In relazione all'etologia del coleottero, poco affidabili sono le indicazioni fornite dalle osservazioni visive dirette; pertanto, anche in funzione della disponibilità di attrezzature commerciali, sono stati effettuati i seguenti test: I) indagini visive; II) misurazioni termografiche; III) ispezioni visive indirette; IV) impiego di trappole a feromoni innescate con il feromone sintetico di aggregazione; V) impiego di unità cinofile.

I risultati complessivamente ottenuti non sono stati pienamente soddisfacenti; scarse sono state le informazioni acquisibili circa la presenza del coleottero sulla base delle osservazioni visive delle palme infestate, nonché utilizzando le tecniche endoscopica e termografica. Interessanti sono stati i risultati ottenuti con il monitoraggio dei voli degli adulti, tramite le trappole feromoniche e quelli ricavati dall'impiego di unità cinofile che, in particolari contesti operativi, pare possano rappresentare i metodi più affidabili per monitorare e rilevare le infestazioni nelle palme. Considerando che la disinfezione delle palme è talora possibile solo se si interviene in una fase iniziale dell'attacco, si rendono necessarie ulteriori ricerche per migliorare le modalità di monitoraggio, al fine di ottenere risultati meno aleatori nella gestione delle infestazioni del pernicioso fitofago.

## BIBLIOGRAFIA

- ALBONE E. S., 1984 - *Mammalian semiochemistry: the investigation of chemical signals between mammals*. - Chichester, UK: Wiley.
- BARRANCO P., DE LA PEÑA J., CABELLO T., 1996 - *El picudo rojo de las palmeras, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier), nueva plaga en Europa. (Coleoptera, Curculionidae)*. - Phytoma España, 67: 36-40.
- BROOKS S. E., OI F. M., KOEHLER, P. G. 2003 - *Ability of canine termite detectors to locate live termites and discriminate them from non termite material*. - Journal of Economic Entomology, 96: 1259-1266.
- BROWNE C., STAFFORD K., FORDHAM R., 2006 - *The use of scent detection-dog*. - Irish Veterinary Journal. 59(2): 97-103.
- COX M. L., 1993. - *Red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus in Egypt*. - FAO Plant Protection Bulletin, 41 (1): 30-31.
- ENGEMAN R. M., VICE D. S., RODRIGUEZ D. V., GRUVER K. S., SANTOS W. S., PITZLER M. E., 1998 - *Effectiveness of the detector dogs used for deterring the dispersal of brown treesnakes*. - Pacific Conservation Biology, 4: 256-260.
- FALEIRO J. R., ABRAHAM V. A., BOUDI N., AL SHUAIBI M. A., PREMKUMAR T., 2000 - *Field evaluation of different types of red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus pheromone lures*. - Indian Journal Entomology, 62: 427-433.
- FENTON V., 1992 - *The use of dogs in search, rescue and recovery*. - Journal of Wilderness Medicine, 3: 292-300.
- FILARDO G., MOTISI A., PERNICE F., LUCIDO P., 2008 - *Parametri termici acquisiti mediante sonde per la diagnosi precoce di attacchi di Punteruolo rosso*. - La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Vol. 1., Report Anno 2008. Regione

- Siciliana, Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Palermo, 119-121.
- GUNAWARDENA N. E., BANDARAGE U. K., 1995 – 4-Methyl-5- nonanol (ferrugineol) as an aggregation pheromone of the coconut pest, *Rhynchophorus ferrugineus* F. (Coleoptera:Curculionidae): synthesis and use in a preliminary field assay. - Journal of the National Science Council of Sri Lanka, 23: 71-79.
- GUTIÉRREZ A., RUIZ V., MOLTÓ E., TAPIA G., DEL MAR TÉLLEZ M., 2010 – Development of a bioacoustic sensor for the early detection of Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier). - Crop Protection, 29: 671-676.
- HALLETT R. H., GRIES G., GRIES R., BORDEN J. H., CZYZEWSKA E., OEHLISCHLAGER A. C., PIERCE H. D. JR., ANGERILLI N. P. D., RAUF A., 1993 – Aggregation pheromone of two Asian palm weevils, *Rhynchophorus ferrugineus* and *R. vulneratus*. - Naturwissenschaften, 80: 328-331.
- HEBARD C., 1993 – Use of search and rescue dogs. - Journal of the American Veterinary Medical Association, 203: 999-1001.
- HETZRONI A., MIZRACH A., NAKACHE Y., SOROKER V., 2004 – Developing spectral model to monitor activity of red palm weevil. - Alon Hanotea, 58: 466-469.
- KEHAT M., 1999 – Threat to Date Palms in Israel, Jordan and the Palestinian Authority by the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. - Phytoparasitica 27: 107-108.
- LIN H.-M., CHI W.-L., LIN C.-L., TSENG Y.-C., CHEN W.-T., KUNG Y.-L., LIEN Y.-Y., CHEN Y.-Y., 2011 – Fire ant-detecting canines: a complementary method in detecting Red Imported Fire Ants. - Household and Structural Insects, 104: 225-231.
- LONGO S., 2006 – Note sul Punteruolo rosso delle palme pericoloso fitofago delle palme di recente introduzione in Sicilia. - “Memorie e Rendiconti” dell’Accademia di Scienze Lettere e Belle Arti degli Zelanti e dei Dafnici di Acireale - Serie V, Vol. IV: 351-365.
- LONGO S., GUGLIOTTA G., PAPPALARDO V., SUMA P., 2009 – Note biologiche sul Punteruolo rosso delle palme in Sicilia. La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Vol. 1., Report Anno 2008. Regione Siciliana, Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Palermo, 45-47.
- MANKIN R. W., SHUMAN D., CONFFELT J.A., 1997 – Acoustic counting of adult insects with different rates and intensities of sound production in stored wheat. Journal of Economic Entomology, 90: 1032-1038.
- MANKIN R. W., MIZRACH A., HETZRONI A., LEVSKY S., NAKACHE Y., SOROKER V., 2008 – Temporal and spectral features of sound of wood-boring beetle larvae: identifiable patterns of activity enable improved discrimination from background noise. - Florida Entomologist, 91: 241-248.
- NAKASH J., OSEM Y., KEHAT M., 2000 – A suggestion to use dogs for detecting red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) infestation in date palms in Israel. - Phytoparasitica, 28: 153-155.
- OEHLISCHLAGER A. C., CHINCHILLA C. M., GONZALEZ L. M., JIRON L. F., MEXZON R. G., MORGAN B., 1993 – Development of a pheromone-based trap for the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* L. - Journal of Economic Entomology, 86: 1381-1392.
- OXLEY J. C., WAGGONER L. P., 2009 – Detection of explosives by dogs. In: Aspects of explosives detection, Marshall M. & Oxley J.C. Ed., Dorsdorf, the Netherlands: Springer, pp. 27-40.
- PIESTER M., KOEHLER P. G., PEREIRA R. M., 2008 – Ability of bed bug-detecting canine to locate live bed bugs and viable bed bug eggs. - Journal of Economic Entomology, 101: 1389-1396.
- PINHAS J., SOROKER V., HETZRONI A., MIZRACH A., TEICHER M., GOLDBERGER J., 2008 – Automatic acoustic detection of the red palm weevil. - Computers and Electronics in Agriculture, 63: 131-139.
- POTAMITIS I., GANCHEV T., KONTODIMAS D., 2009. – On automatic bioacoustic detection of pests: the cases of *Rhynchophorus ferrugineus* and *Sitophilus oryzae*. - Journal of Economic Entomology, 102: 1681-1690.
- RIZZOLO A., BIANCHI G., LUCIDO P., CANGELOSI B., POZZI L., VILLA G., CLEMATIS F., PASINI C., CURIR P., 2012 – Electronic nose for the early detection of Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) infestation in Palms: preliminary results. - SHE2012- 2nd Symposium on Horticulturae in Europe.
- SCHIEFFRAHN R. H., ROBBINS W. P., BUSEY P., SU N. Y., MUELLER R. K., 1993 – Evaluation of novel, hand-held, acoustic emissions detector to monitor termites (Isoptera: Kalotermitidae, Rhinotermitidae) in wood. - Journal of Economic Entomology, 86: 1720-1729.
- SHELBY R. A., SCHRADER K. K., TUCKER A., KLESIOUS P. H., MYERS L. J., 2004 – Detection of catfish off-flavour compounds by trained dogs. - Aquaculture Research, 35: 888-892.
- SOROKER V., NAKACHE Y., LANDAU U., MIZRACH A., HETZRONI A., GERLING D., 2004 – Utilization of sounding methodology to detect infestation by *Rhynchophorus ferrugineus* on palm offshoots. - Phytoparasitica, 32:6-8.
- SOROKER V., SUMA P., LA PERGOLA A., COHEN Y., COHEN Y., ALCHANATIS V., GOLOMB O., GOLDSHEIN E., HETZRONI A., GALAZAN L., KONTODIMAS D., PONTIKAKOS C., ZOROVIC M., BRANDSTETTER M., 2013. – Early detection and monitoring of red palm weevil: approaches and challenges. - Palm Pest Mediterranean Conference Nice, 16-18 January 2013.
- SUMA P., LONGO S., 2008 – Applicazioni di termografia, endoscopia ed analisi indiretta per la diagnosi precoce degli attacchi di Punteruolo rosso. La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia. Vol. 1., Report Anno 2008. Regione Siciliana, Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Palermo, pp. 103-106.
- SUMA P., LA PERGOLA A., LONGO S., SOROKER V., 2013 – The use of sniffing dogs for the detection of *Rhynchophorus ferrugineus*. - Phytoparasitica, DOI 10.1007/s12600-013-0330-0.
- WALLNER W. E., ELLIS T. L., 1976 – Olfactory detection of Gypsy Moth pheromone and eggs masses by domestic canines. - Environmental Entomology, 5(1): 183-186.

## MEZZI E METODI DI CONTROLLO INTEGRATO DEL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME

FRANCESCO PORCELLI (\*) - DANIELE CORNARA (\*)

(\*) Dipartimento di Scienza delle Suolo, delle Piante e degli Alimenti (DiSSPA), Sez. Entomologia e Zoologia– UNIBA Aldo Moro. Via Amendola, 165/a 70126 Bari Italia; francesco.porcelli@uniba.it  
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico”. Seduta pubblica dell’Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

*The Red Palm Weevil* [*Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790)] IPM.

The RPW IPM shall be founded on the behaviour, biology and damaging attitude of the pest. Host-plant shift and pest-favourable morphological features of *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud (Canary Palm) cause a rapid and lethal infestation. Moreover, the pest reaches its almost coincident economic and action thresholds while the infested plant are still asymptomatic. A Preventive & Protective (2P) IPM by tree-injected trap palms, plus a two-step leaves pruning technique and tree-surgery is proposed, based on key-points found in interaction between the pest and the host plant bionomics.

KEY WORDS: Life-table, Economic and ornamental Arecaceae, attract & kill, alien invasive pest.

### INTRODUZIONE

Il Punteruolo Rosso delle Palme *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), (RPW) (Coleoptera Curculionidae) è un insetto dannoso alle palme coltivate da un tempo relativamente lontano (MILNE, 1918; SIMMONDS, 1925; MURPHY *et al.*, 1999; FALEIRO, 2006). Nonostante questo, nessuna strategia di controllo ritenuta efficace è stata finora sviluppata e proposta. Tutto sommato, siamo nella situazione descritta da LEEFMANS nel 1920. Questo breve contributo indica le premesse necessarie a definire una strategia di controllo integrato del RPW in Italia che sia preventiva e protettiva (2P) nei confronti delle Palme delle Canarie (*Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud, PC), coltivate come elementi ornamentali in ambiente urbano, altrimenti infestate e uccise dal Curculionide. L'insieme delle osservazioni sperimentali che formano la base delle conoscenze sulle quali elaborare la strategia di controllo derivano da esperienze e osservazioni su RPW e altre specie simili, accumulate in ambienti naturali e coltivazioni di Palma delle Canarie, da dattero, da olio e da cocco studiate in Africa (Marocco), Asia (Sinai, Arabia Saudita, Israele, Libano), Europa (Albania, Italia, Francia, Spagna, Malta), Centroamerica (Cuba, Costa Rica), Sudamerica (Brasile).

### INFESTAZIONE E DANNO DI RPW SU PC

Il punteruolo infesta una monocotiledone a stipe singolo con un singolo meristema apicale e un

vasto cilindro centrale con pochi vasi conduttori chiusi, separati da abbondantissimo parenchima amilifero (TOMLINSON, 1961; ZIMMERMANN e TOMLINSON, 1965). Queste caratteristiche morfologiche della *Phoenix canariensis* le rendono molto difficile, o impossibile, sopravvivere all'infestazione da RPW.

Ogni femmina depone diverse uova, da pochi elementi fino a oltre dieci (INCE *et al.*, 2011) ogni volta che le si presenti l'opportunità, sotto forma di una lesione con almeno una dimensione di 4 centimetri. Le femmine si accoppiano non appena escono dalle proprie celle pupali e sono poligame e poliandre, ripetendo o meno la copula prima, durante o dopo la deposizione delle uova che avviene indifferentemente nell'arco delle 24 ore. L'oviposizione è veloce e richiede circa un minuto e mezzo per uovo.

Le larve, neonate, si approfondano verso il parenchima del cilindro centrale e diffondono batteri opportunisti che contaminano i tessuti vegetali infestati e infettano il parenchima amilifero e il meristema apicale, organi vegetali particolarmente inclini a sostenere fermentazioni per l'elevato contenuto di acqua.

Durante l'infestazione le fermentazioni innalzano la temperatura del *focus* fino a 58°C e producono alcoli e acidi organici creando un ambiente favorevole al rapido sviluppo delle larve ma repressivo per ogni eventuale nemico naturale.

Pochi dei punteruoli adulti che originano dalla prima generazione escono dalla palma uccisa per disperdersi alla ricerca di nuove piante ospiti suscettibili. Molti altri restano nella palma appena

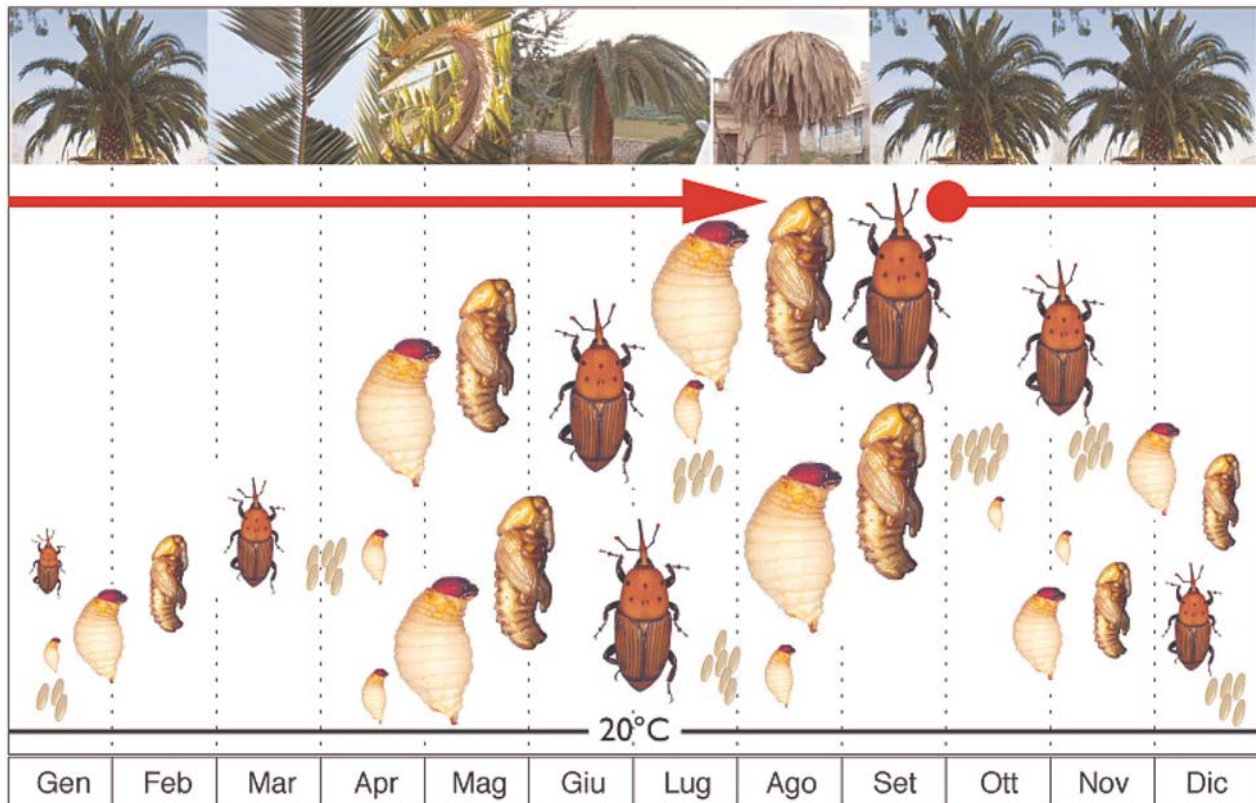


Fig. 1  
Fenologia dell'infestazione di *Rhyncophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), su *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud.

uccisa e originano una o due successive generazioni che si sovrappongono a spese del residuo parenchima amilifero (Fig. 1).

La rapida evoluzione dell'infestazione e l'habitat repressivo impediscono la presenza di parassitoidi e organismi patogeni che sono rari o assenti anche in natura.

I danni dell'infestazione diventano rapidamente letali e la palma è uccisa dal RPW e dai microrganismi associati in pochi mesi, anche se le foglie restano verdi a lungo dopo la distruzione del meristema apicale.

La coincidenza di un danno che è 1) letale quando ancora asintomatico; 2) inflitto a esemplari insostituibili per il loro rilevante valore storico e paesaggistico dalla vita molto lunga fino ad essere indeterminata e 3) additivo nel corso dell'evoluzione dell'infestazione sul territorio, suggeriscono modalità di controllo che siano contemporaneamente Preventive e Protettive (2P) nei confronti delle PC. In particolare, la vita molto lunga delle Palme delle Canarie e l'addittività del danno descrivono soglie di danno molto inferiori all'1% che, anche con un calcolo semplicistico, ci porterebbe comunque a perdere il 100% delle piante in un secolo (Fig. 2).

#### PREMESSE AL CONTROLLO

Il controllo di questo dannoso curculionide si deve basare sulla formulazione di tavole vitali, anche molto semplificate, che dettagliano il complesso dei fattori di mortalità e la loro rispettiva incidenza percentuale e assoluta sulla popolazione del fitofago.

Il confronto fra i fattori di mortalità del RPW, nelle aree di origine e in quelle d'introduzione, ricavato dalla bibliografia e dalle esperienze di abbattimento, mostra come nelle aree d'introduzione, manchi la mortalità durante la dispersione alla ricerca di piante suscettibili. Tale fattore di mortalità è, invece, la principale causa di morte, pari a circa il 66%, degli adulti in dispersione (Fig. 3).

La mortalità nelle aree d'introduzione del coleottero, deriva dall'uso di insetticidi e dall'uccisione per schiacciamento degli individui durante gli abbattimenti delle piante infestate dal coleottero. La somma di queste mortalità assomma a circa l'83% di individui. Le tavole vitali mostrano anche che la mortalità inflitta in Europa al punteruolo durante gli stadi larvali, non compensa quella che decima gli adulti in natura (Fig. 4). Infatti, nel primo caso la popolazione cresce con

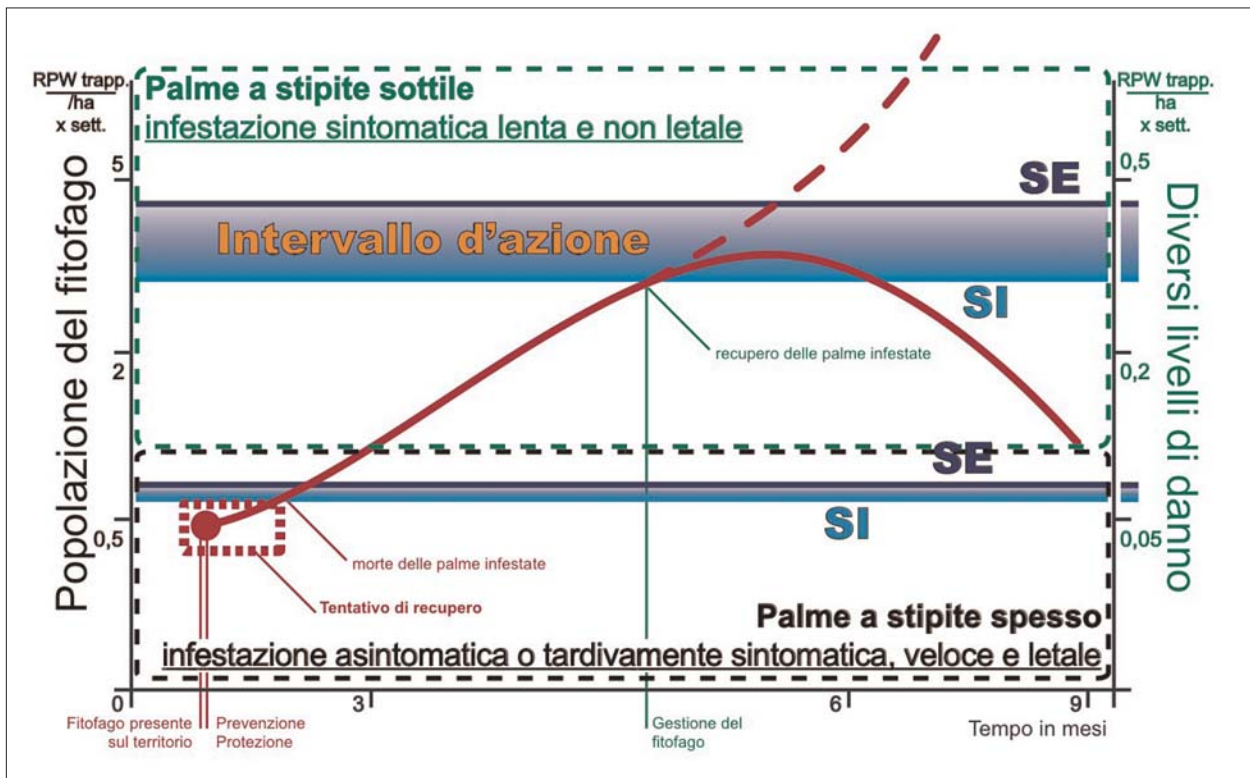


Fig. 2

Relazione fra il *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) e palme a stipite sottile o spesso rispetto alle: soglie economiche (SE) e d'intervento (SI) con i rispettivi intervalli d'azione; popolazioni del fitofago e livelli di danno; catture di RPW adulti per trappola e per settimana.

un  $T > 28$ , mentre in natura la popolazione è, ovviamente, stabile ( $T=1$ ).

La dinamica di popolazione descritta dallo studio di una sola generazione di Punteruolo, quando questo infesta la PC, spiega l'esplosione demografica e i danni conseguenti alla prima fase d'invasione del curculione in Europa. Tale prima fase è caratterizzata dalla disponibilità di PC suscettibili superiore, o al massimo uguale, al numero di femmine deponenti. In altre parole in questa prima fase le piante ospiti suscettibili all'oviposizione non sono un fattore limitante per il RPW e l'incremento demografico è più che proporzionale.

Le tavole vitali appena mostrate lasciano intravedere pochi momenti utili per inserire misure di controllo che siano efficaci, protettive e capaci di prevenire le infestazioni oltre che realmente praticabili.

In particolare ritorna l'inutilità di un controllo larvicida per i danni meccanici e fisiologici irrecurabili che questi stadi infliggono a una monocotiledone priva di meristemi necessari alle cicatrizzazioni. Tali danni vengono, al massimo, compartimentalizzati dalla pianta (THOMAS, 2013) che ne resta comunque lesa. Inoltre, i mezzi proposti di controllo chimico o biologico sono quasi inattivati dalla grande quantità di sostanza organica in decomposizione che sempre accompagna i foci di

infestazione del punteruolo. Come le larve, anche le pupe sono naturalmente poco suscettibili al controllo, riparate in una cella pupale così spessa e fibrosa da resistere al fuoco.

Anche il controllo adulticida è poco praticabile per la bassissima densità degli adulti sul territorio, comunque capaci di causare infestazioni percentualmente superiori alla modesta soglia di danno.

Esclusi gli stadi larvali e le pupe, esclusi gli adulti in dispersione, non restano che le uova, le larve neonate e gli adulti infestanti che sono a contatto della pianta ospite.

## CONTROLLO

L'analisi dei momenti utili al controllo, individua due punti critici per il RPW: uno in corrispondenza della deposizione, l'altro della nascita delle larve.

Entrambi i momenti vedono i punteruoli, adulti o neonati, a contatto con la pianta ospite ed è logico pensare di utilizzare la pianta stessa come esca avvelenata. Questo si può ottenere facilmente iniettando insetticidi negli stipiti (D'ONGHIA e PORCELLI, 2009; PORCELLI *et al.*, 2013) proteggendole dalla deposizione e prevenendo l'infestazione (2P).

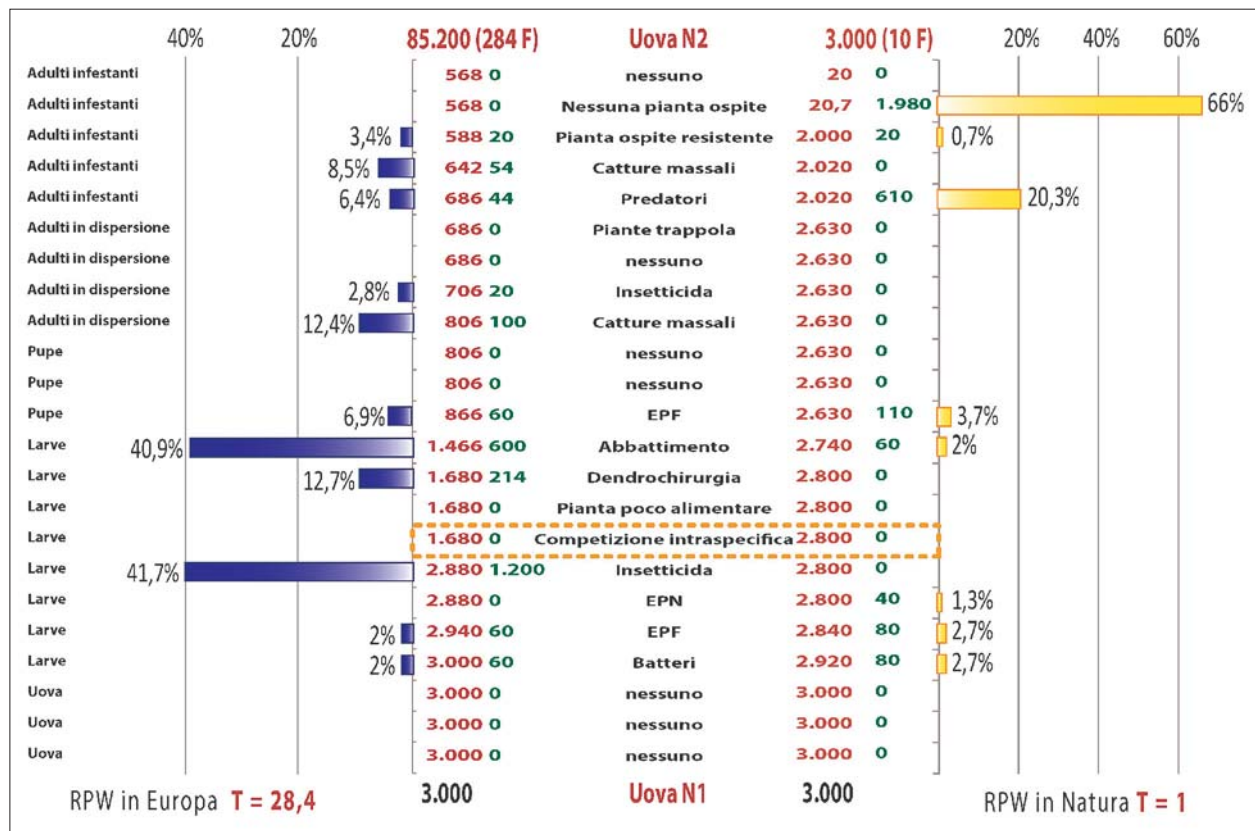


Fig. 3

Tavole vitali per *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) in ecosistema naturale (a destra istogramma, a colonne gialle) e artificiale, prevalentemente di tipo urbano (a sinistra, istogramma a colonne blu). La competizione intraspecifica resta difficile da verificare per le abitudini endofite degli stadi preimmaginali.

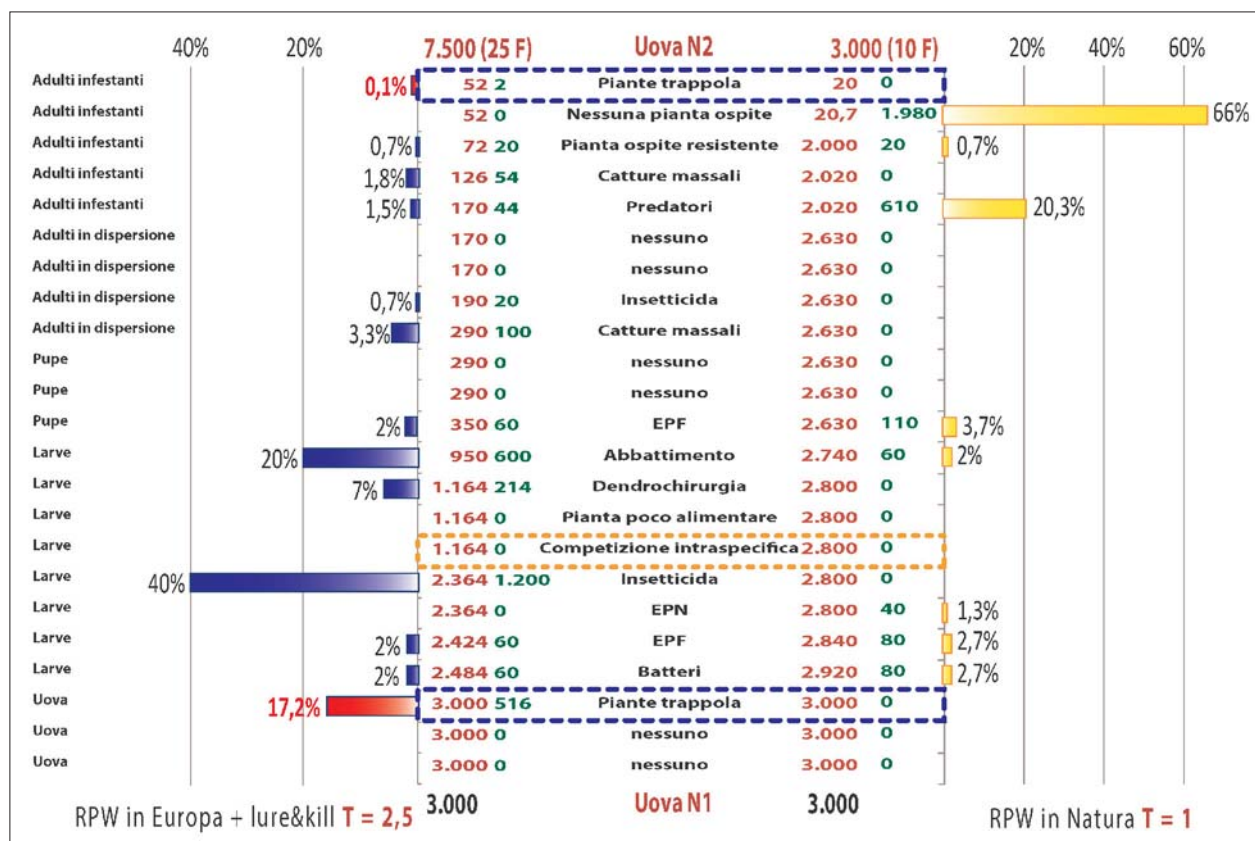


Fig. 4

Tavole vitali per *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) in ecosistema naturale (a destra, istogramma a colonne gialle) e artificiale, prevalentemente di tipo urbano (a sinistra, istogramma a colonne blu). L'inserimento dell'endoterapia nei due momenti individuati dalla linea tratteggiata blu, induce una mortalità significativa che riduce la T da oltre 28 a 2,5.

La percentuale scelta per il calcolo in tavole vitali corrisponde alla percentuale di piante iniettate sul territorio. La tecnica di endoterapia proposta prevede alcuni interventi l'anno utilizzando lo stesso iniettore.

Vi sono numerose tecniche e molti formulati utili per avvelenare le palme proteggendole e prevenendo le infestazioni. Fra queste la più idonea consiste nell'endoterapia con Imidacloprid o con Dimetoato (PORCELLI *et al.*, 2013).

Questa indicazione nasce dalla necessità di conferire una selettività secondaria al formulato, che eviti le contaminazioni ambientali urbane e il contatto con i cittadini. Inoltre, la molecola è protetta dagli agenti di degradazione e mantiene una lunga persistenza ed efficacia (PORCELLI *et al.*, 2013). Infine, il formulato avvelena l'intero stipite restando latente nel parenchima amilifero della pianta.

Un ulteriore vantaggio dell'endoterapia è che consente di proteggere le piante di quei proprietari che desiderano impegnarsi per salvaguardare le palme di loro interesse.

Anche una modesta mortalità (il 17% circa) imposta dall'endoterapia in corrispondenza delle uova per uccidere le larve neonate riduce sensibilmente la tendenza di popolazione riconducendola a un molto più ragionevole fattore di 2,6.

Inoltre, colpendo il Punteruolo in corrispondenza della deposizione delle uova si uccidono anche le femmine infestanti, che si nutrono sulla ferita della pianta poco prima di deporre. In questo modo s'impone un ulteriore 0,1% di mortalità.

Nel complesso trasformare le palme in esche avvelenate consente di operare le consuete potature anche d'estate senza temere distruttive infestazioni. Anzi, il costo dei cestelli di potatura può essere ammortizzato per iniettare i formulati su piante particolarmente alte.

Naturalmente non sarebbe saggio riporre tutte le speranze in un solo metodo di controllo. Per questo è opportuno modificare le modalità di potatura delle foglie, tagliando i rachidi a 60-80 centimetri dallo stipite. Questa tecnica minimizza la superficie della lesione e la rende poco accettabile per la deposizione. I rachidi saranno rifilati allo stipite in seguito, quando ormai secchi, evitando di produrre vaste ferite molto soggette alle deposizioni.

Inoltre, le poche piante eventualmente infestate per una cattiva pratica di endoterapia, possono essere disinfestate, *in extremis*, con dendrochirurgia (LA MANTIA *et al.*, 2008) che, però, non è protettiva e nemmeno sempre praticabile (Fig. 5).

Infine, le piante trappola riducono la popolazione

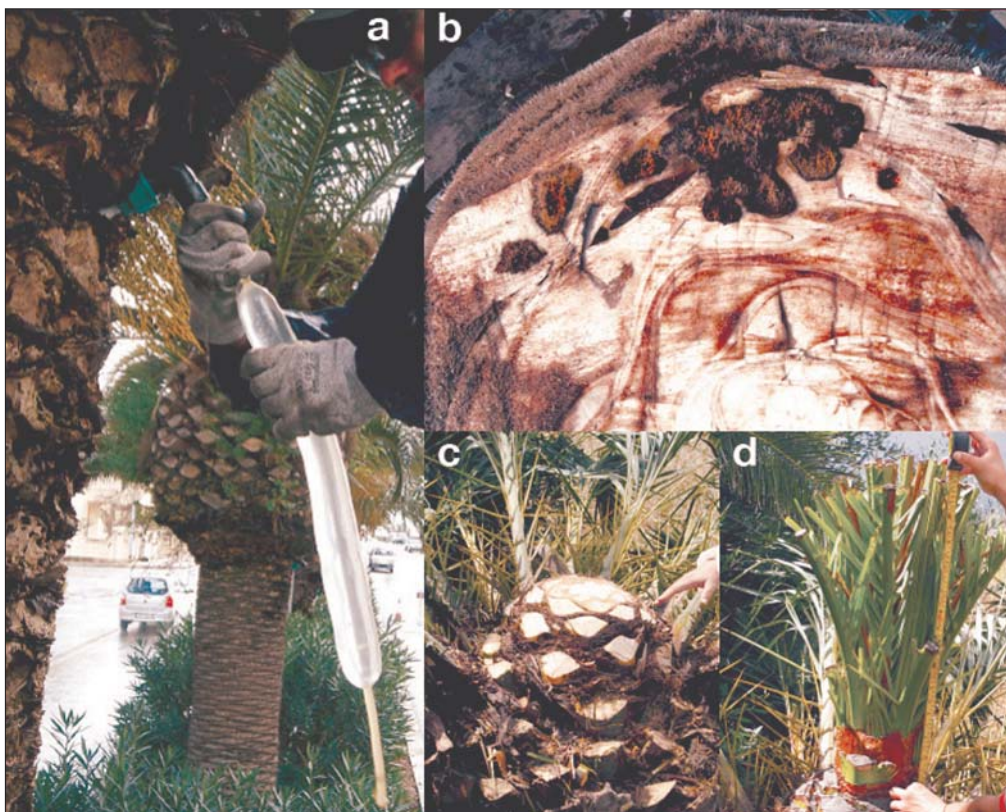


Fig. 5

Alcune componenti proposte per l'IPM di *Rhyncophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) su *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud: a) endoterapia; b,c,d) dendrochirurgia.

ne del fitofago sul territorio *prevenendo le infestazioni e proteggendo* le piante che si vogliono preservare, a differenza di altre tecniche adulticide.

#### CONCLUSIONI

La vicenda del controllo del *Rhynchophorus ferrugineus*, organismo alieno invasivo nei paesi mediterranei, spiega la necessità di considerare attentamente le nuove interazioni che una specie costruisce quando si sposta su nuove piante ospiti.

Il danno e la fitness della specie invasiva variano, infatti, in funzione del contesto nel quale l'infestazione si esprime.

Naturalmente le precedenti strategie, i mezzi e metodo di controllo noti e sperimentati nella regione di provenienza, vanno riconsiderati alla luce delle caratteristiche della regione di introduzione.

Nel caso del RPW, nuovi mezzi e metodi di controllo dovranno sostituire i vecchi per ottenere un controllo efficace che soddisfi le richieste di gestione della popolazione di RPW nelle regioni di introduzione.

#### RIASSUNTO

Questo contributo riassume una proposta di controllo delle popolazioni di *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera Curculionidae) quando questo infesta *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud.

La costruzione e l'analisi delle tavole vitali dell'insetto permettono di individuare due punti chiave nel controllo della specie in ambiente urbano che coincidono con l'oviposizione e l'attività degli adulti infestanti.

Trasformando le palme in piante trappola, per mezzo d'iniezioni di insetticidi è possibile ottenere un consistente controllo del fitofago, *contemporaneamente prevenendo le infestazioni e proteggendo le piante trattate*.

Altre componenti per il controllo integrato del dannoso Punteruolo Rosso delle Palme consistono in potature delle foglie in due passaggi, in modo da evitare di produrre ampie ferite, e la dendrochirurgia di emergenza.

#### BIBLIOGRAFIA

- D'ONGHIA A.M., PORCELLI F., 2009 – *Metodo e dispositivo per iniettare fitofarmaci in piante*. - Dep.brev. BA2009A000014 int. code A01G29 00, C.I.H.E.A.M. Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari.
- FALEIRO J.R., 2006 – *A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years*. - International Journal of Tropical Insect Science, 26(3): 135-154.
- INCE S.; PORCELLI F.; AL-JBOORY I.; 2011 – *Egg laying and egg laying behavior of Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) 1790 (Coleoptera: Curculionidae)*. - Agriculture and Biology Journal of North America, 2(11): 1368-1374.
- LA MANTIA G., LO VERDE G., FERRY M., 2008 – *Le palme colpite dal punteruolo risanate con la dendrochirurgia*. - L'Informatore Agrario, Supplemento Università delle Piante: 43-45.
- LEEFMANS S., 1920 – *De Palmsnuitkever. (Rhynchophorus ferrugineus Oliv.)*. - Mededelingen van het Instituut voor Plantenziekten, 43: 1-87.
- MILNE D., 1918 – *The Date Palm and Its Cultivation in the Punjab*. The Punjab Government, 153p.
- MURPHY S.T., BRISCOE B.R., 1999 – *The red palm weevil as an alien invasive: biology and the prospects for biological control as a component of IPM*. - Biocontrol News and Information, 20(1): 35-46.
- PORCELLI F., VALENTINI F., GRIFFO R., CAPRIO E., D'ONGHIA A.M., 2013 – *Comparing Insecticides and Distribution Techniques Against Red Palm Weevil*. - AFPP - Colloque Méditerranéen Sur Les Ravageurs Des Palmiers Nice, ISBN: 978-2-905550-31-6, 16-18 Janvier 2013: 89-96.
- SIMMONDS H.W., 1925 – *Pests and diseases of the coconut palm in the islands of the Southern Pacific*. - S. Bach, Government Printer, Suva: 31 pp.
- THOMAS R., 2013 – *L'anatomie des palmiers et les techniques d'endothérapie: quelles conséquences physiologiques?*. - AFPP – Colloque Méditerranéen Sur Les Ravageurs Des Palmiers Nice, ISBN : 978-2-905550-31-6, 16-18 Janvier 2013: 73-88.
- TOMLINSON P.B., 1961 – *Anatomy of the Monocotyledons II. Palmae*. Oxford at Clarendon Press: 453p.
- ZIMMERMANN M.H., TOMLINSON P.B., 1965 – *Anatomy of the palm Rapis excelsa I Mature vegetative axis*. - Journal of the Arnold Arboretum, 46: 160-178.

## CONTROLLO DEL PUNTERUOLO ROSSO MEDIANTE LA TECNICA DEL MASCHIO STERILE (SIT): UTOPIA O REALTÀ?

SERGIO MUSMECI (\*) - MASSIMO CRISTOFARO (\*) - SILVIA ARNONE (\*) - RAFFAELE SASSO (\*)  
STEFANIA BACCARO (\*\*) - ANGELO PASQUALI (\*\*) - SILVIA CATARCI (\*\*\*)

(\*) ENEA UTAGRI-ECO, CR Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Roma; sergio.musmeci@enea.it

(\*\*) ENEA, UTTMAT, CR Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Roma.

(\*\*\*) BBICA-onlus, Via del Bosco 10, Sacrofano (RM).

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Il punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico".  
Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *Control of red palm weevil by sterile insect technique (SIT): feasible or impossible?*

The red palm weevil (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver) (Coleoptera: Dryophthoridae), a weevil native to South-eastern Asia and Melanesia where it is a serious pest of coconuts, is considered the most dangerous pest of Canarian palm trees and date palm trees in Southern Europe, Northern Africa and Middle Asia.

Aim of this work was to evaluate the feasibility to control the weevil pest by implementation of sterile insect technique (SIT), particularly useful in area-wide IPM programs. Bioassays carried out at the ENEA C. R. Casaccia facilities were addressed to test the effects of different doses of  $\gamma$  rays on the weevil reproductive physiology and mating behavior. In spite of the apparent drawbacks in reproductive behavior of females observed in field (polyandry and high levels of fertility), laboratory experiments satisfy some important requisites for the application of this technique (last male sperm precedence, high vitality and ability of mating of irradiated males) and suggest the possibility to use SIT in particular geographical contexts. Results and perspectives are discussed.

KEY WORDS: *Rhynchophorus ferrugineus*, Sterile Insect Technique, red palm weevil, integrated pest management.

### INTRODUZIONE

*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae), fitofago nativo del sud est asiatico, originariamente infeudato sulle palme orientali (palma da sago, palma da cocco) si è adattato a molte specie di palma, sia coltivate che ornamentali (FALEIRO, 2006) e, a causa del commercio di palme e della scarsità di controlli fitosanitari si è diffuso nei paesi arabi ed in quelli del bacino del Mediterraneo, causando seri problemi di gestione delle infestazioni a danno della palma delle Canarie, *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud. In Italia è presente dal 2004 (SACCHETTI *et al.*, 2006) e, in pochi anni, è diventato endemico nelle regioni rivierasche e a clima mediterraneo, dove i principali danni sono arrecati all'attività florovivaistica, al paesaggio e, indirettamente, al turismo nelle località di mare. Il danno economico e sociale tuttavia è senz'altro maggiore in quei paesi dove la palma costituisce un'importante fonte di reddito, come la palma da dattero *Phoenix dactylifera* L. per il Medio Oriente (BOKHARI & ABUZUHARI, 1992; CHAO & KRUEGER, 2007) e la palma da cocco *Cocos nucifera* L. (SADAKATHULLA, 1991) nel sud-est asiati-

co. Nonostante i numerosi studi, l'unico metodo di lotta utilizzato continua ad essere ad oggi l'impiego di grosse quantità di insetticidi a cadenze ravvicinate che, malgrado i miglioramenti nelle metodologie di applicazione, rendono poco sostenibile nel lungo termine questo tipo di controllo, sia da un punto di vista economico che ambientale, in particolare se applicato in aree antropizzate (LLÁCER *et al.*, 2009, 2010, 2012b; DEMBILIO *et al.*, 2010). Tra le strategie alternative, la tecnica dell'insetto sterile (SIT) potrebbe rappresentare un sistema di controllo a basso impatto ambientale da inserire in programmi di difesa applicati su ampi spazi del territorio. L'applicazione del SIT, ovvero la distribuzione nell'ambiente di un gran numero di maschi sterili capaci di accoppiarsi con femmine selvatiche mediante una successione di lanci protratti nel tempo, si prefigge come obiettivo il contenimento della diffusione di focolai di infestazione del fitofago nelle zone non ancora interessate, fino alla sua possibile eradicazione nelle aree infestate (KLASSEN, 2005). Nata negli anni '50 per il controllo e la eradicazione della *Cochliomyia hominivorax* (mosca assassina) la strategia SIT è stata applicata per numerosi insetti nocivi, come ad

esempio per la *Ceratitis capitata*, *Pectinophora gossypiella* e *Cydia pomonella* (BLOEM *et al.*, 2005; KLASSEN *et al.*, 1994; HENDRICHS *et al.*, 2002; VARGAS-TERAN *et al.*, 2005). In Italia tale tecnica è stata applicata con successo nell'isola di Procida per l'eradicazione della mosca della frutta (CIRIO, 1975; BACCARO *et al.*, 2005) e, più recentemente, per il controllo della zanzara tigre (*Aedes albopictus*) (BELLINI *et al.*, 2013). Primi studi sulla strategia SIT per il controllo di *R. ferrugineus* sono stati condotti mediante la chemio-sterilizzazione (RAHALKAR *et al.*, 1975) e l'uso di raggi X (RAHALKAR *et al.*, 1973; RAMACHANDRAN, 1991). Ulteriori osservazioni sulla biologia di base utilizzando i raggi  $\gamma$  come fonte di radiazione, hanno dimostrato l'induzione di sterilità permanente e l'assenza di evidenti differenze nel comportamento di accoppiamento del maschio (GOTHI *et al.*, 2007; AL-AYEDH & RASOOL, 2009; PRABHU *et al.*, 2010), requisiti fondamentali per l'applicazione di tale tecnica (LANCE & MCINNIS, 2005). Nonostante preliminari sperimentazioni di campo abbiano fornito risultati potenzialmente positivi (RAHALKAR *et al.*, 1977; KRISHNAKUMAR & MAHESWARI, 2007), l'utilizzo della strategia SIT per questa specie è stata considerata finora inappropriata a causa del comportamento polandrino delle femmine e per il comportamento gregario e criptico dell'insetto (WHITTEN & MAHON, 2005). Uno studio preliminare di fattibilità (CRISTOFARO *et al.*, 2011) avviato presso l'ENEA nel 2010, in collaborazione con l'*International Atomic Energy Agency* (IAEA) di Vienna, ha posto le basi per verificare con maggior dettaglio la possibilità di applicazione della strategia SIT nell'ambito di un programma *area wide* per il controllo del punteruolo. La messa a punto di un efficiente sistema di allevamento su substrato di sostituzione realizzato presso i nostri laboratori ha consentito di ottenere centinaia di adulti con caratteristiche fisiologiche prossime (dimensioni, fertilità e longevità) a quelle di individui appartenenti a popolazioni selvatiche. Ciò ha permesso di pianificare e programmare le sperimentazioni presso l'ENEA e al contempo di fornire individui di rinfocoro utili allo svolgimento delle attività di ricerca presso le altre Unità Operative (cfr. i lavori riportati in questo stesso volume: DE BIASE *et al.*, 2013; FRANCARDI *et al.*, 2013; INGHILESI *et al.*, 2013). Di seguito si riportano i risultati degli studi su alcuni aspetti della biologia ed ecologia del punteruolo rosso e di quelli relativi a biosaggi di laboratorio riguardanti l'effetto dei raggi  $\gamma$  sulla *performance* riproduttiva delle femmine e sulla longevità dei maschi.

## MONITORAGGIO E RACCOLTA DEL PUNTERUOLO ROSSO DELLE PALME

Dal 2010 ad oggi, è stato condotto un monitoraggio della popolazione di *R. ferrugineus* in 6 aree della Provincia di Roma. In particolare sono state scelte 2 aree abitate del litorale (Santa Severa e Santa Marinella) e 4 aree dell'entroterra con densità di palme via via decrescenti, di cui 2 urbanizzate [C.R. ENEA della Casaccia e il Centro di Ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali di Roma (CRA-QCE)] e 2 rurali situate più a nord (Fig. 1). Sono state utilizzate le trappole RhynchoTrap della Intrachem, innescate con Rhypher 220, dispenser contenente il feromone sessuale e di aggregazione, e con acetato di etile, composto volatile con funzione attrattiva emesso dalla pianta ospite.

L'osservazione dei dati raccolti (Fig. 2) evidenzia la drammatica situazione in cui versa oggi il litorale laziale così come le zone pianeggianti e collinari dell'entroterra. In generale, l'uniformità della distribuzione nei voli è evidenziata dalla buona correlazione riscontrata tra l'andamento delle catture in siti anche molto distanti tra loro, risentendo in prima istanza dell'andamento climatico e, in particolare, della temperatura. Mentre non sorprende il dato numerico di catture in zone ad alta densità di palme come quelle del litorale, va evidenziata l'elevata presenza del punteruolo anche in zone dell'entroterra, non solo urbane ma anche rurali a densità di palme molto bassa. Nelle aree lontane da palme infestate si nota inoltre un progressivo incremento delle catture dal 2010 ad oggi. In particolare, nell'area rurale di Settevene (Fig. 1), registrati valori tra i più elevati con catture di oltre 20 individui/trappola. Viceversa, è interessante notare come nell'area fortemente infestata presso il castello di Santa Severa si sia osservato un progressivo declino delle catture, nonostante la presenza di alcune palme tuttora apparentemente integre (Fig. 2). La sex ratio degli individui catturati è sempre stata in favore delle femmine con una media di 2:1, in accordo con altri dati riportati in letteratura (PERI *et al.*, 2013). È stata tuttavia osservata una notevole variabilità della sex ratio in dipendenza del decorso stagionale e dell'area esaminata.

## VALUTAZIONE DELLA FECONDITÀ E FERTILITÀ IN FEMMINE SELVATICHE

Tali sperimentazioni, propedeutiche per l'applicazione SIT, sono state condotte con lo scopo di



Fig. 1

Principali siti di monitoraggio del punteruolo rosso delle palme negli anni 2010-2012 (da image © 2014 Google Earth).

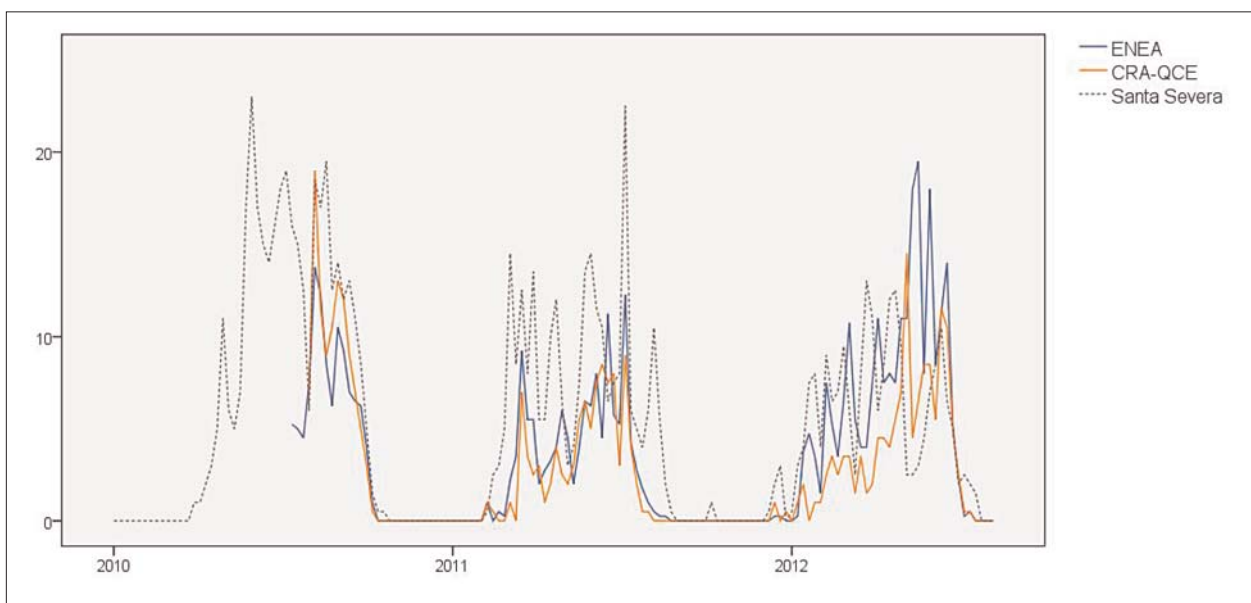


Fig. 2

Tre siti a confronto: ENEA, CRA-QCE e Santa Severa: sono riportati gli andamenti del numero medio di catture per trappola.

verificare i livelli di fertilità delle femmine catturate in campo.

Sono state dunque utilizzate femmine provenienti da:

- palme attaccate ed in fase di abbattimento nel periodo autunnale e primaverile;
- trappole allestite durante la stagione favorevole (in questo caso sono state prelevate solamente femmine trovate senza maschi, dal momento

che sono stati osservati accoppiamenti frequenti anche all'interno delle trappole);

- femmine vergini ottenute da pupari provenienti da palme abbattute, al fine di quantificare il numero di uova deposte da femmine non fecondate da utilizzare come testimone per la verifica dell'avvenuta stimolazione e/o fecondazione da parte del maschio.

Ogni femmina è stata isolata e posta in camera

climatica ( $29^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) in condizioni di umidità prossime alla saturazione, fornendo a ciascuna mezza mela come alimento (SALAMA *et al.*, 2009) e substrato per l'ovideposizione. I rilievi sono stati condotti con cadenze bisettimanali, misurando il tasso di deposizione delle uova e la percentuale di schiusa.

Sono stati riscontrati elevati livelli di fertilità in campo, sia in femmine raccolte da palme infestate sia in quelle catturate dalle trappole, così come anche in quelle posizionate in zone distanti dalle palme. Per queste ultime, la percentuale di femmine fertili tende ad aumentare con il progredire della stagione andando dal 67,4% nella primavera al fino al 90,2% in autunno. Relativamente costante è stata invece la fertilità delle femmine all'interno delle palme compresa tra il 73,5 e l'79,3%.

#### IRRAGGIAMENTO MEDIANTE RAGGI GAMMA PER L'INDUZIONE DI STERILITÀ NEI MASCHI

L'irraggiamento è stato effettuato presso l'impianto Calliope dell'ENEA [sorgente di Cobalto 60 (BACCARO e CEMMI, 2011)] su maschi neofarfallati ottenuti da allevamento in laboratorio. Sono state saggiate 6 dosi comprese tra 15 e 100 Gray (Gy) con un tasso di 0,33 Gy/sec (Fig. 3). Successivamente ogni singolo maschio è stato accoppiato con una femmina vergine, verificando l'avvenuta copula e offrendo ad ogni coppia alimento e substrato per l'ovideposizione. Sono stati

quindi rilevati con cadenze bisettimanali la sopravvivenza di entrambi gli individui, la fecondità e la fertilità delle femmine. I rilievi si sono protratti fino a 60 gg dall'accoppiamento, mentre la longevità è stata rilevata anche successivamente con cadenza settimanale.

I maschi irraggiati sono risultati molto attivi e in grado di accoppiarsi con le femmine altrettanto bene quanto i maschi non irraggiati a tutte le dosi saggiate di raggi  $\gamma$ . La sopravvivenza degli adulti è stata paragonabile ai maschi non irraggiati alla dose più bassa di 15 Gy (oltre 120 gg), ma questa si riduceva a poco più di 3 settimane già a partire da 30 Gy, rimanendo stabile fino ad 80 Gy. Come mostra il grafico della Fig. 3 relativo agli andamenti di fecondità e fertilità, non sono state rilevate differenze significative nel numero di uova prodotte rispetto al controllo non irraggiato, almeno fino alla dose di 60 Gy, mentre un leggero decremento è stato osservato a dosi più alte. La fecondità è stata in ogni caso di gran lunga più elevata rispetto a quella delle femmine vergini anche a 100 Gy (totale delle uova 147,6 rispetto a 60,2), evidenziando quindi una copula completa ed un conseguente stimolo all'ovideposizione. Il dato riguardante la fertilità delle femmine mostra una sterilità pressoché totale con una percentuale di uova schiuse inferiore all'1% a partire da 40 Gy. Viceversa la fertilità è risultata solo parziale alle dosi di 30 e 15 Gy (20,6% di uova schiuse a 15 Gy contro il 77,3% del controllo). Val la pena ricordare che la dose di 15 Gy è stata riportata come ottimale in altri lavori (KRISHNAKUMAR & MA-

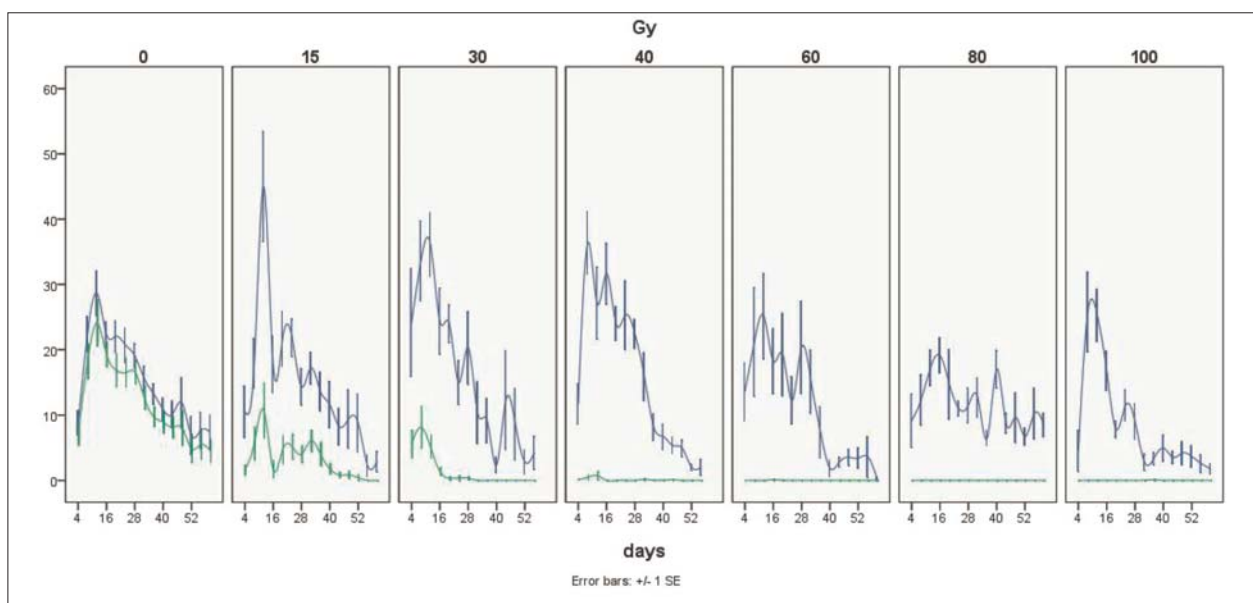


Fig. 3

Andamento della fecondità (linea blu, numero di uova per rilievo) e fertilità (linea verde, numero di larve per rilievo) delle femmine accoppiate con maschi esposti a varie dosi di irraggiamento. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

HESWARI, 2007). A tutte le dosi saggiate non sono comunque stati osservati recuperi nella fertilità anche dopo molte settimane, fino ad esaurimento nella produzione di uova.

#### ACCOPPIAMENTI IN SEQUENZA PER LA VERIFICA DELL'INDUZIONE DI STERILITÀ IN CONDIZIONI DI CAMPO

Nel 2012 sono stati condotti esperimenti di laboratorio per verificare la presenza di una eventuale scelta criptica da parte delle femmine o di competizione spermatica da parte dei maschi. A tal fine sono state simulate le condizioni presenti in campo dal momento che verosimilmente, durante il rilascio, le femmine saranno vergini o già accoppiate e si troveranno inoltre (almeno in una fase iniziale) in presenza sia di maschi sterili che di maschi “wild”. Sono stati quindi effettuati accoppiamenti di femmine vergini con maschi sterilizzati e “wild” secondo 2 schemi sperimentali a sequenza inversa. Ogni femmina è stata accoppiata singolarmente con un maschio e questo è stato successivamente tolto e sostituito con un altro maschio.

Schema 1: primo accoppiamento con maschio fertile per 10 gg, quindi sostituzione e accoppiamento con maschio sterile.

Schema 2 (eseguito su un altro gruppo di individui): primo accoppiamento con maschio sterile per 10 gg, quindi sostituzione con maschio fertile.

Come si evince dal grafico della Fig. 4, i maschi irraggiati hanno indotto una immediata sterilità

riscontrabile già nel rilievo successivo al cambio del maschio, in femmine fertili accoppiate precedentemente con maschi “wild”, con una media di 0,5% uova fertili nel secondo accoppiamento rispetto al 93,6% ottenuto nel primo accoppiamento. Comportamento analogo è stato registrato per le femmine accoppiate inizialmente con i maschi irraggiati, con la fertilità della femmina che è stata ripristinata quasi completamente già dal rilievo successivo. La sterilità così come la fertilità verificate nel secondo accoppiamento, sono risultate stabili e durature.

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

In conclusione, malgrado l'ecologia e l'etologia dell'insetto mostrino delle criticità circa l'applicazione della metodologia SIT, gli esperimenti effettuati in laboratorio hanno fornito risultati positivi e suggeriscono un approfondimento degli studi, soprattutto per casi particolari, ove l'applicazione di questa tecnica, in combinazione con altre strategie di controllo, potrebbe risultare vantaggiosa (SUPERQUARK, 2011). Infatti l'inequivocabile osservazione dell'utilizzo da parte della femmina dello sperma dell'ultimo maschio con cui si è accoppiata, fa supporre che il rilascio di un adeguato numero di maschi sterili possa consentire la sterilizzazione di femmine, anche nel caso in cui queste si siano precedentemente accoppiate con maschi selvatici (CRISTOFARO *et al.*, 2012). Questi risultati saranno oggetto di approfondimento mediante studi citologici, istologici, biomolecolari e comportamentali già in parte intrapresi in collaborazione con altri Centri di Ricerca italiani (DE

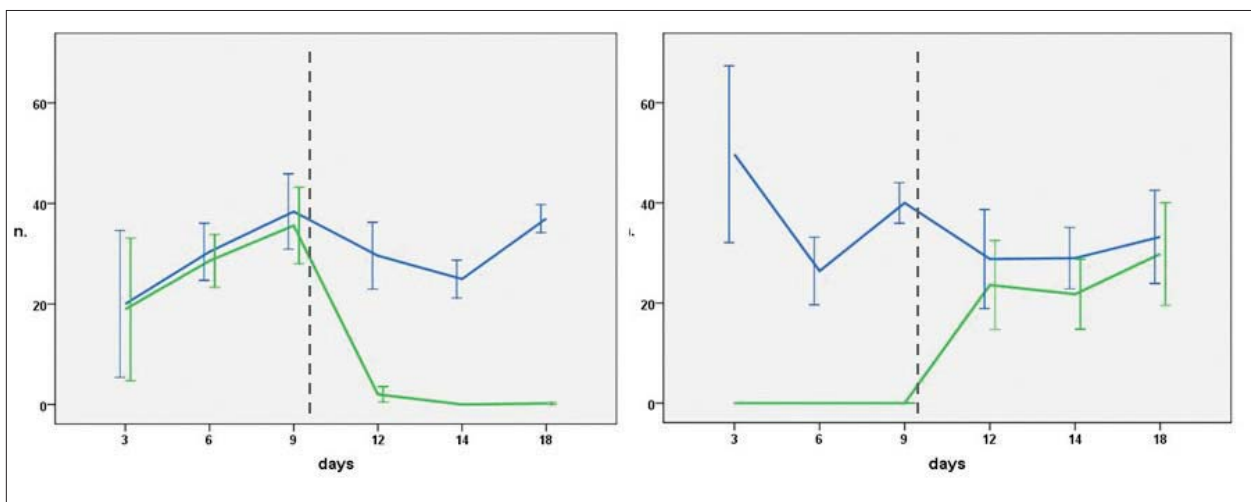


Fig. 4

Accoppiamento in sequenza. La linea tratteggiata indica la sostituzione con il maschio: sterile nella figura a sinistra, non irraggiato (wild) in quella a destra. In blu il numero di uova e in verde il numero di larve prodotte.

BIASE *et al.*, 2013; PAOLI *et al.*, in press; INGHILESI *et al.*, 2013), per la comprensione del meccanismo di selezione post-copulatoria dello sperma riscontrato già in molte altre specie (PARKER, 1970) e attribuibile probabilmente ad un meccanismo di *last male sperm precedence* riconducibile al sistema della scelta criptica o a competizione spermatica (BIRKHEAD & MØLLER, 1998; EBERHARD, 1996; SANTOLAMAZZA e RIVERA, 1998). Un utilizzo di tale tecnica dovrebbe essere maggiormente valido nel caso della palma da cocco e da dattero, sia per aspetti legati al contesto socio-economico e sia per la peculiarità del territorio e della distribuzione: le palme coltivate hanno una distribuzione spaziale regolare secondo un sesto d'impianto che tiene conto delle esigenze colturali e, soprattutto, la loro dislocazione nelle oasi le presenta come aree perfettamente isolate e quindi gestibili in un programma che preveda addirittura l'eradicazione del fitofago. Sebbene più problematica l'applicazione in Italia, la strategia SIT potrebbe essere adottata a scopo preventivo in zone "buffer" o di confine per quelle aree ancora isolate a causa di barriere fisiche o ecologiche. Si osservano infatti notevoli discontinuità nella distribuzione anche in alcune aree costiere Italiane. Di particolare interesse infine, è la possibilità di utilizzare il maschio sterile come vettore di funghi entomopatogeni, metodo innovativo che si potrebbe rivelare efficace grazie al comportamento gregario della specie. A tale riguardo, sono attualmente in corso sperimentazioni di laboratorio per verificare la trasmissibilità del fungo tra individui (BARZANTI *et al.*, 2010; FRANCARDI *et al.*, 2013), e di campo (LLÁCER *et al.*, 2012).

#### RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato con il supporto finanziario dell'IAEA e della Convenzione tra ENEA e Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia di Firenze (CRA-ABP) nell'ambito del Progetto MiPAAF - PRO-PALMA.

#### RIASSUNTO

Il punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Dryophthoridae), originario del sud-est asiatico e della Melanesia, è considerato il fitofago più dannoso per la palma delle Canarie e la palma da dattero nel sud Europa, Nord Africa e Medio Oriente. Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'applicabilità della tecnica dell'insetto sterile per il controllo del punteruolo rosso delle palme.

Presso il Centro Ricerca dell'ENEA (Casaccia) sono stati allestiti biosaggi mirati a testare gli effetti di differenti dosi di raggi  $\gamma$  sulla fisiologia e il comportamento riproduttivo del rincoforo. Malgrado le apparenti difficoltà emerse dal comportamento riproduttivo delle femmine osservato in campo (poliandria ed elevata fertilità), gli esperimenti di laboratorio hanno soddisfatto alcuni importanti requisiti per l'applicazione di questa tecnica (*last male sperm precedence*, elevata vitalità dei maschi e buona capacità di accoppiamento), suggerendo la possibilità dell'utilizzazione del SIT in particolari contesti geografici. Verranno qui discussi i risultati e le prospettive future.

#### BIBLIOGRAFIA

- AL-AYEDH H.Y., RASOOL K.G., 2009 – *Sex ratio and the role of mild relative humidity in mating behaviour of red date palm weevil Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Curculionidae) *gamma-irradiated adults*. - J. Appl. Entom., 134: 157-162.
- BACCARO S., CECILIA A., PASQUALI A., 2005 – *Irradiation Facility at ENEA-CASACCIA Centre (Rome)*. - ENEA, ENEA Report RT/2005/28/FIS, 29 pp.
- BACCARO S., CEMMI A., 2011 – *Radiation Damage Studies Performed at the Calliope Gamma Irradiation Plant at ENEA Italy*. In: SPIE Optical Engineering and Applications Conference Proceedings, San Diego: August 19-24 2011, N. 8144-27
- BARZANTI G.P., RUMINE P., BENVENUTI C., FRANCARDI V., 2010 – *Microbiological control of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus with Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae*. 43th Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, 11-15 July 2010 Trabzon, Turkey, Karadeniz Technical University, Trabzon-Turkey, p. 51.
- BELLINI R., MEDICI A., PUGGIOLI A., BALESTRINO F., CARRIERI M., 2013 – *Pilot field trials with Aedes albopictus irradiated sterile males in Italian urban areas*. - J. Med. Entomol., 50 (2): 317-325.
- BIRKHEAD T.R., MØLLER A.P., 1998 – *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, London.
- BLOEM K.A., BLOEM S., CARPENTER J.E., 2005 – *Impact of Moth Suppression/Eradication Programmes using the Sterile Insect Technique or Inherited Sterility*. In: *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*; Dyck V.A., Hendrichs J. & Robinson A.S. (Eds); Dordrech, The Netherlands, Springer; pp. 677-700.
- BOKHARI U.G., ABUZUHARI R., 1992 – *Diagnostic tests for redpalm weevil, Rhynchophorus ferrugineus infested datepalm trees*. - Arab Gulf J. Sci. Res., 10: 93-104.
- CHAO C.C. T., KRUEGER R.R., 2007 – *The Date Palm (Phoenix dactylifera L.): Overview of Biology, Uses, and Cultivation*. - Hortscience, 42: 1077-1082.
- CIRIO U., 1975 – *The Procidia Medfly pilot experiment. Status of The Medfly control after two years of the Sterile Insect release*. - IAEA, Panel Proc. Series, STI/PUB/392, pp. 39-49.
- CRISTOFARO M., SASSO R., MUSMECI S., ARNONE S., DI ILIO V., DE BIASE A., BELVEDERE S., 2011 – *Primi risultati relativi ad uno studio di fattibilità della tecnica dell'insetto sterile per il controllo di Rhynchophorus ferrugineus Olivier*. Atti XXIII Congresso Naz. Italiano di Entomologia, Genova, 13-16 giugno 2011, p. 292.
- CRISTOFARO M., ARNONE S., MUSMECI S., SASSO R., LAI

- A., DE BIASE A., LA MARCA A., BELVEDERE S., MARCARI V., SENIA G., CATARCI S., 2012 – *Feasibility of SIT to control red palm weevil* (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier): *An integrated physiological, ecological and genetic approach*. - ESA 60TH Annual Meeting, Nov. 11-14, Knoxville, Tennessee (USA).
- DE BIASE A., BELVEDERE S., SENIA G., LA MARCA A., VAN VU L., CRISTOFARO M., 2013 – *Preliminary analysis of genetic variability and differentiation of Asian and Mediterranean populations of Red Palm Weevil*. - Atti Accademia Nazionale di Entomologia, LXI, questo volume: 193-200.
- DEMBILIO Ó., LLÁCER E., MARTÍNEZ DE ALTUBE M.M., JACAS J.A., 2010 – *Field efficacy of Imidacloprid and Steinernema carpocapsae in a chitosan formulation against the Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) in Phoenix canariensis*. - Pest Manag. Sci., 66: 365-370.
- EBERHARD W.G., 1996 – *Females control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- FALEIRO J.R., 2006 – *A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years*. - Int. J. Trop. Insect Sci., 26: 135-154.
- FRANCARDI V., BENVENUTI C., BARZANTI G.P., ROVERSI P.F., 2013 – *Controllo microbiologico di Rhynchophorus ferrugineus (olivier) (Coleoptera Curculionidae) mediante impiego di una trappola "attract, infect and release"*. - Atti Accademia Nazionale di Entomologia, LXI, questo volume: 205-209.
- GOTHI K.K., HIRE R.S., VIJAYALAKSHIMI N., DONGRE T.K., 2007 – *Studies on mating behaviour of radio-sterilized males of red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv)*. - Journal of Nuclear Agriculture and Biology, 36: 65-72.
- HENDRICHS J.H., ROBINSON A.S., CAYOL J.P., ENKERLIN W., 2002 – *Medfly Area-Wide Sterile Insect Technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies*. - Fla. Entomol., 85: 1-13.
- KLASSEN W., LINDQUIST D.A., BUYCKX E.J., 1994 – *Overview of the Joint FAO/IAEA Division's involvement in fruit fly sterile insect technique programmes*. In: Fruit flies and the sterile insect technique; Calkins C.O., Klassen W., Liedo P. (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA; pp. 3-26.
- KLASSEN W., 2005 – *Area-wide Integrated pest management and the Sterile Insect Technique*. In: Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management; Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. (Eds); Dordrech, The Netherlands, Springer; pp. 39-68.
- KRISHNAKUMAR R., MAHESWARI P., 2007 – *Assessment of the Sterile Insect Technique to manage Red Palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus in coconut*. In: Area-Wide Control of Insect Pests; Vreysen M.J.B., Robinson A.S., Hendrichs J. (Eds.), pp. 475-485.
- INGHILESI A., MAZZA G., CINI A., CERVO R., 2013 – *Comportamento sociale e riproduttivo del punteruolo rosso delle palme: approfondire le conoscenze per contrastare questo flagello*. Atti Accademia Nazionale di Entomologia, LXI, questo volume: 189-192.
- LANCE D.R., MCINNIS D.O., 2005 – *Biological Basis of the Sterile Insect Technique*. In: Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management; Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. (Eds); Dordrech, The Netherlands, Springer; pp. 69-94.
- LLÁCER E., MARTÍNEZ DE ALTUBE M.M., JACAS J.A., 2009 – *Evaluation of the efficacy of Steinernema carpocapsae in a chitosan formulation against the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus in Phoenix canariensis*. - Biocontrol, 54: 559-565.
- LLÁCER E., DEMBILIO O., JACAS J.A., 2010 – *Evaluation of the efficacy of an insecticidal paint based on chlorpyrifos and pyriproxyfen in a micro-encapsulated formulation against the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus*. - J. Econ. Entom., 103: 402-408.
- LLÁCER E., SANTIAGO-ÁLVAREZ C., JACAS J.A., 2012 a – *Could sterile males be used to vector a microbiological control agent? The case of Rhynchophorus ferrugineus and Beauveria bassiana*. - B. Entom. Res., 103 (2): 241 - 250.
- LLÁCER E., NEGRE M., JACAS J.A., 2012 b – *Evaluation of an oil dispersion formulation of Imidacloprid as a drench against Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera, Curculionidae) in young palm trees*. - Pest Manag. Sci., 68: 878-882.
- PAOLI F., CRISTOFARO M., ARNONE S., FRANCARDI V., ROVERSI P.F., 2013 – *Ultrastruttura degli spermatozoi di Rhynchophorus ferrugineus*. - Atti Accademia Nazionale di Entomologia, LXI, questo volume: 247-250.
- PARKER G.A., 1970 – *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. - Biol. Rev., 4: 525-567.
- PERI E., COLAZZA S., GUARINO S., LO BUE P., SUMA P., LA PERGOLA A., LONGO S., 2013 – *The Red Palm Weevil in Sicily: the introduction and spread of an invasive alien species*. AFPP – Palm Pest Mediterranean Conf., Nice – 16, 17 and 18 January.
- PRAHU S.T., DONGRE T.K., PATIL R.S., 2010 – *Effect of irradiation on the biological activities of red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Olivier*. - Karnataka J. of Agric. Sci., 23: 186-188.
- RAHALKAR G.W., HARWALKAR M.R., RANANAVARE H.D., SHANTARAM K., AYENGAR A.R.G., 1973 – *Laboratory studies on radiation sterilization of Rhynchophorus ferrugineus males*. - J. Plantation Crops, 1: 141-145.
- RAHALKAR G.W., HARWALKAR M.R., RANANAVARE H.D., 1975 – *Laboratory studies on sterilization of male Rhynchophorus ferrugineus*. In: Sterility Principle for Insect Control 1974; International Atomic Energy Agency (Ed.), Vienna, Austria; pp. 261-267.
- RAHALKAR G.W., HARWALKAR M.R., RANANAVARE H.D., KURGAN C., ABRHAM V.A., KOYA K.M.A., 1977 – *Preliminary field studies on the control of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus using radio sterilized males*. - Journal of Nuclear Agriculture and Biology, 6: 65-68.
- RAMACHANDRAN C.P., 1991 – *Effect of gamma radiation on various stages of red date palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Oliv*. - Journal of Nuclear Agriculture and Biology, 3: 218-221.
- SACCHETTI P., CAMÈRA A., GRANCHIETTI A., ROSI M.C., MARZIALETTI P., 2006 – *Identificazione, biologia e diffusione del curculionide delle palme Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)*. - Informatore Fitopatologico, 20 (6): 35-40.
- SADAKATHULLA S., 1991 – *Management of red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus, in coconut plantations*. - Planter, 67: 415-419.

- SALAMA H.S., ZAKI F.N., ABDEL-RAZEK A.S., 2009 – *Ecological and biological studies on the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)*. - Archives of Phytopathology and Plant Protection, 42: 392-399.
- SANTOLAMAZZA S.C., RIVERA A.C., 1998 – *Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the Eucalyptus Snout-Beetle, Gonipterus scutellatus (Coleoptera, Curculionidae)*. - Etologia, 6: 33-40.
- SUPERQUARK, 2011 – <http://www.rai.tv/dl/RaiTV/programmi/media/ContentItem-274994e8-36ee-4754-b7e2-10e7d80e9f23.html>.
- VARGAS-TERÀN M., HOFMAN H.C., TWEDDLE N.E., 2005 – *Impact of Screwworm eradication programmes using the Sterile Insect Technique*. In: Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management; Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. (Eds); Dordrech, The Netherlands, Springer; pp. 629-650.
- WHITTEN M., MAHON R., 2005 – *Misconception and constraints*. In: Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management; Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. (Eds); Dordrech, The Netherlands, Springer; pp. 601-626.

## ULTRASTRUTTURA DEGLI SPERMATOZOI DI *RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS*

FRANCESCO PAOLI (\*) - MASSIMO CRISTOFARO (\*\*) - SILVIA ARNONE (\*\*)  
VALERIA FRANCARDI (\*) - PIO FEDERICO ROVERSI (\*)

(\*) Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia (CRA-ABP), via di Lanciola 12/a, Cascine del Riccio, 50125 Firenze.

(\*\*) ENEA Casaccia, UTAGRI-ECO, via Anguillarese 301, 00123 Roma

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Il punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 novembre 2013.

### *The ultrastructure of the Rhynchophorus ferrugineus sperm*

In the present study we ultrastructurally described the spermatogenesis of the Red Palm Weevil. Characteristic features of the *Rhynchophorus ferrugineus* sperm are: 100  $\mu\text{m}$  total length, 10  $\mu\text{m}$  nucleus, two mitochondrial derivatives, two accessory bodies, one puff-like structure and a typical insect 9+9+2 flagellar axoneme.

KEY WORDS: sperm ultrastructure, insect spermatogenesis, male reproductive system, male genital apparatus histology.

La necessità di proteggere colture agrarie, foreste e singole piante di interesse ornamentale ha da sempre funzionato come motore per lo sviluppo di discipline indirizzate alla ricerca di strumenti e strategie per contenere i danni causati da agenti biologici nocivi. Lo sviluppo dell'entomologia agraria si pone tra queste discipline come materia ponte tra studi di ricerca di base e indagini di biologia applicata.

*Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera, Curculionidae), specie comunemente nota come punteruolo rosso delle palme, è oggetto di vari filoni di ricerca di base e applicata finalizzati all'individuazione di modalità di lotta nelle aree di nuova introduzione di questo temibile fitofago (ABDEL-AZIM *et al.*, 2012; ABRAHAM *et al.*, 1998; AL-DOSARY *et al.*, 2012; DEMBILIO & JACAS, 2012; EL NAGGAR *et al.*, 2010; FALEIRO, 2006; MAZZA *et al.*, 2011a,b).

Nel presente contributo è stata presa in esame la spermatogenesi di questo curculionide al fine di avere un modello *wild-type* per confronti sulle modifiche indotte nei gameti a livello ultrastrutturale a seguito dell'esposizione a raggi gamma, come nel caso dei trattamenti effettuati sugli esemplari utilizzati in interventi di controllo basati sull'impiego di maschi sterili (AL-AYEDH & RASOOL 2010; HENDRICHs *et al.*, 1995; DYCK *et al.*, 2005).

La struttura dell'apparato riproduttore maschile consiste di due coppie di lobi testicolari discoidali, ciascuno contenente numerosi follicoli. Da ciascuno dei due lobi testicolari si diparte un canale che si riunisce a quello proveniente dal lobo testicolare prospiciente per formare il dotto deferente. Tale

dotto deferente varia la sua morfologia interna lungo il tragitto che lo unisce al dotto eiaculatore. Infatti, nella sua porzione prossimale esso è costituito da un sottile strato muscolare e da un epitelio monostratificato rivestito da una sottilissima cuticola che forma un lume in cui sono spesso visibili gli spermatozoi. Nella sua porzione distale, invece, si nota che la muscolatura circolare diventa premittente e molto robusta, la cuticola si inspessisce ed il lume si restringe. Tra la porzione prossimale e quella distale si ha una situazione intermedia tra le due appena descritte: aumentano la muscolatura e la cuticola e si restringe il lume. A circa metà del deferente, si inserisce una ghiandola accessoria di forma filiforme, molto lunga e piuttosto attorcigliata su se stessa. Il contenuto di questa ghiandola è riversato nel deferente in prossimità di un'altra struttura di forma globulare, anch'essa di natura ghiandolare, che funge da collettore e che produce un secreto flocculento.

L'esame ultrastrutturale della spermatogenesi mostra spermatogoni, cellule con corredo cromosomico 2n che si dividono per mitosi. Queste cellule presentano un nucleo rotondo, cospicuo, che occupa la maggior parte dello spazio intracellulare con la cromatina condensata solo in poche zone. I mitocondri sono sparsi in tutto il citoplasma ed è presente una coppia di centrioli disposti ortogonalmente a costituire il diplosoma. All'interno del citoplasma è ben visibile l'apparato di Golgi, con cisterne appiattite disposte in forma semicircolare. Queste caratteristiche si mantengono fino all'inizio della prima divisione meiotica.

Successivamente, gli spermatociti primari iniziano il processo meiotico. Essi si presentano con un nucleo ancora tondeggiate, ma con una maggiore condensazione della cromatina; nel contempo i mitocondri si ammassano progressivamente da un lato della cellula.

Terminata la meiosi, lo spermatidio inizia il processo di spermiogenesi. In questo stadio si può notare una rilevante attività dell'apparato del Golgi che forma vescicole che nello spermio maturo daranno origine all'acrosoma. Tale acrosoma è tristratificato, come in molti pterigoti, e comprende una vescicola acrosomale, un perforatorium nella regione assiale e uno strato esterno (BACCETTI, 1972). L'acrosoma tristratificato è da considerarsi un carattere plesiomorfico: esso può modificarsi, per perdita di alcune componenti, fino alla completa scomparsa dell'intera struttura (JAMIESON *et al.*, 1999).

Nel nucleo del giovane spermatidio continua la condensazione della cromatina; quest'ultima assume dapprima un'apparenza flocculenta e poi si condensa a dare un aspetto a nido d'api, caratteristica riscontrabile anche in altri curculionidi (NAME *et al.*, 2007). I mitocondri si riuniscono in un aggregato tipico, il nebenkern, dal quale poi matureranno due derivati mitocondriali di diversa grandezza in cui le creste si dispongono in parallelo l'una con l'altra e nella matrice si condensa del materiale paracristallino. La differente grandezza dei derivati mitocondriali risulta essere un carattere apomorfico degno di nota.

Per consentire l'allungamento della cellula un manicotto di microtubuli si dispone attorno al nucleo ed ai due derivati mitocondriali al fine di dirigere e dare forma, nel modo geneticamente prestabilito, all'allungamento dei singoli componenti cellulari.

Compiuto l'allungamento e la conseguente riduzione di citoplasma, la cellula è ora matura e prende il nome di spermatozoo. Esso ha una lunghezza di circa 100 µm e può essere grossolanamente suddiviso in due parti (Fig. 1A): una testa, composta da acrosoma e nucleo – quest'ultimo di circa 10 µm, con cromatina ormai completamente condensata; ed una coda, composta da un assonema, due derivati mitocondriali, due corpi accessori di forma semilunare più una struttura puff-like (Fig. 1B). I corpi accessori e la struttura puff-like originano dal centriolo aggiunto che secondo Phillips (1970) sarebbe deputato al collegamento tra nucleo ed assonema. La struttura puff-like (Fig. 1B) è un'espansione del corpo accessorio ed ha matrice amorfa ed eterogenea. Essa è una caratteristica che si riscontra nei curculionidi e nelle famiglie di coleotteri filogeneticamente vicine ad essa.

I mitocondri sono parzialmente cristallizzati con un pattern di cristallizzazione che si ripete ad intervalli di circa 47 nm. Il mitocondrio più grande si incunea nel nucleo mentre l'altro si origina subito sotto ad esso. L'assonema ha la tipica struttura da insetto pterigote ed è costituito da 9 microtubuli accessori, nove doppietti e due microtubuli centrali (Fig. 1B). Sono inoltre presenti su ciascun doppietto microtubulare due braccia di dineina ed i radial spokes (Fig. 1B).

Osservando campioni di spermatozoi al microscopio elettronico a scansione si nota che l'avvolgimento delle componenti della coda non risulta in una completa elicatura dei derivati mitocondriali e dei corpi accessori attorno all'assonema, ma esso appare piuttosto come una sinusoide le cui componenti non si intrecciano tra loro (Fig. 1C).

Le strutture qui riportate sono molto simili a quelle di altri curculionidi già descritti in letteratura (BURRINI *et al.*, 1988; DALLAI *et al.*, 1998; NAME *et al.*, 2007) e non si ravvisano peculiarità ultrastrutturali. Lo spermatozoo di *Rhynchophorus ferrugineus* mostra le caratteristiche tipiche dei coleotteri e consente di confermare l'affinità filogenetica del gruppo con crisomelidi, bruchidi e cerambycidi (DALLAI *et al.*, 1998).

Si ritiene che i dati riportati nel presente contributo potranno risultare utili per ulteriori indagini filogenetiche (JAMIESON, 1987; JAMIESON *et al.*, 1999), filogeografiche basate su marcatori mitocondriali (DE BIASE *et al.*, 2013), e per studi comparativi sugli effetti delle radiazioni ionizzanti sull'ultrastruttura degli sperm.

#### RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Claudia Benvenuti, Gian Paolo Barzanti, Annarita Cito e Giuseppe Mazza per il loro supporto tecnico ed i loro utili consigli.

Questo studio si è svolto nell'ambito del progetto Finalizzato Nazionale MIPAAF "PROPALMA - Protezione delle Palme ornamentali e spontanee dall'invasione biologica del Punteruolo rosso *Rhynchophorus ferrugineus*", D.M. 25618/7301/11.

#### RIASSUNTO

Nel presente contributo è brevemente descritta da un punto di vista ultrastrutturale la spermatogenesi del Punteruolo Rosso delle Palme. Caratteristiche dello spermatozoo di *Rhynchophorus ferrugineus* sono: lunghezza totale di circa 100 µm, nucleo di circa 10 µm, 2 derivati mitocondriali, due corpi accessori, una struttura puff-like ed un assonema flagellare costituito dalla disposizione tipica degli insetti di 9 + 9 + 2 microtubuli.

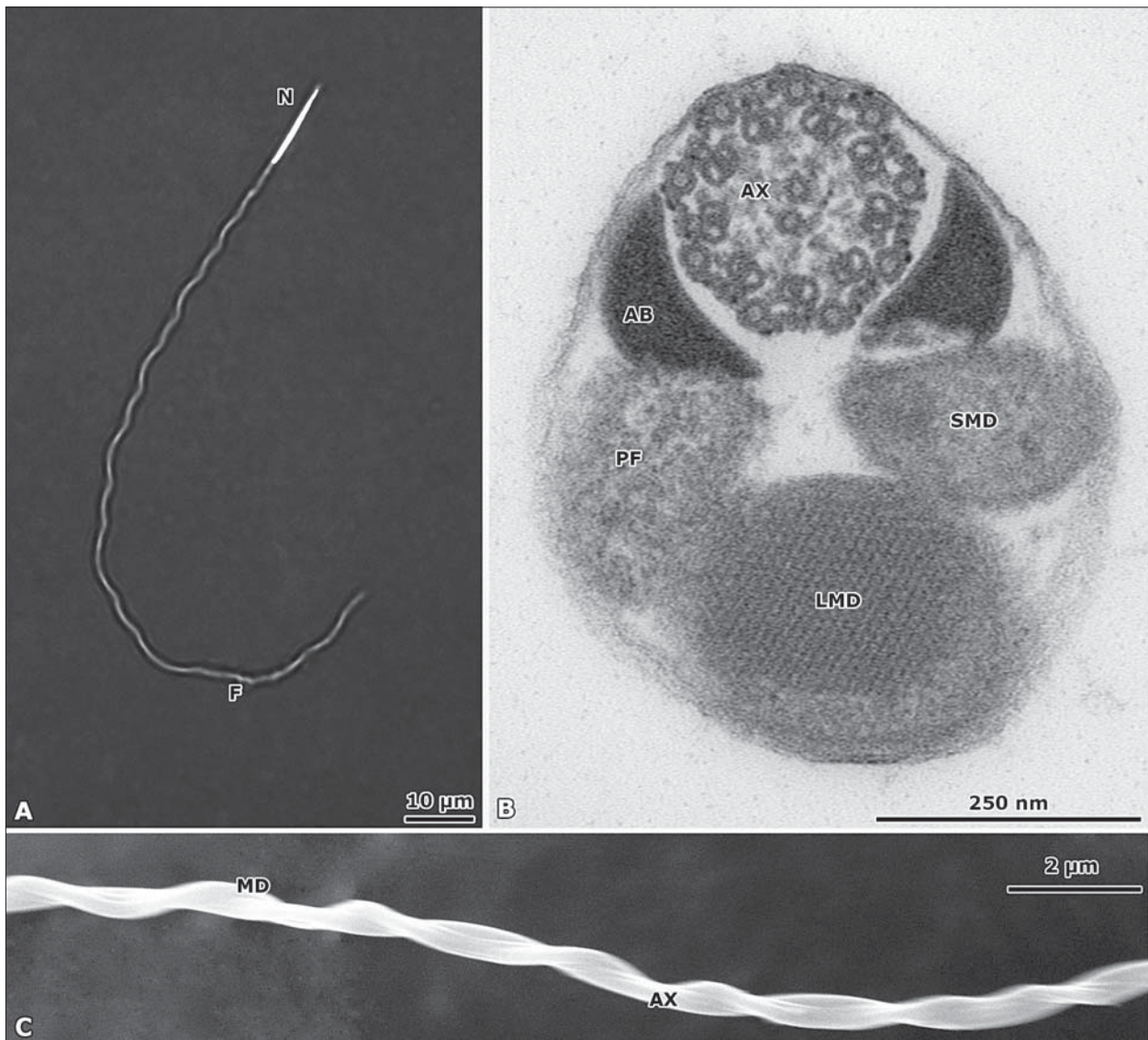


Fig. 1

A: Fotografia di spermatozoo al microscopio ottico. La colorazione in bianco (Hoescht) ne evidenzia il nucleo (N). F, flagello.  
 B: Sezione trasversale al TEM di coda di spermatozoo in cui si possono osservare le componenti interne. AB, corpi accessori; AX, assomema; LMD, derivato mitocondriale grande; SMD, derivato mitocondriale piccolo; PF, struttura puff-like.  
 C: Micrografia al SEM della coda dello spermatozoo (G). Notare il peculiare tipo di avvolgimento del derivato mitocondriale (MD) attorno all'assomema (AX).

## BIBLIOGRAFIA

- ABDEL-AZIM M.M., VIDYASAGAR P.S.P.V., ALDOSARI S.A., MUMTAZ R., 2012 – *Impact of Mating Frequency on Fecundity, Fertility and Longevity of Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)(Coleoptera: Curculionidae)*. - Journal of Agricultural Science and Technology A, 2 (4): 520-528.
- ABRAHAM V.A., AL-SHUAIBI M.A., FALEIRO J.R., ABUZUHAIK R.A., VIDYASAGAR P.S.P.V, 1998 – *An integrated management approach for red date palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus Oliv., a key pest of date palm in Middle East*. Sultan Qaboos University Journal for Scientific Research - Agricultural Sciences 3: 77-84.
- AL-AYEDH H.Y., RASOOL K.G., 2010 – *Determination of the optimum sterilizing radiation dose for control of the red date palm weevil Rhynchophorus ferrugineus Oliv.(Coleoptera: Curculionidae)*. - Crop Protection, 29 (12): 1377-1380.
- AL-DOSARY, M.M., AL-BEKAIRI A. M., MOURS E.B., 2010 – *Morphology of the egg shell and the developing embryo of the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus*. - Saudi Journal of Biological Sciences, 17 (2): 177-183.
- BACCETTI B., 1972 – *Insect sperm cells*. - Advances in Insect Physiology, 9: 315-397.
- BURRINI A.G., MAGNANO L., MAGNANO A.R., SCALA C., BACCETTI B., 1988 – *Spermatozoa and phylogeny of Curculionoidea (Coleoptera)*. - International Journal of Insect Morphology and Embriology, 17: 1-50.
- DALLAI R., AFZELIUS B.A., LUPETTI P., OSELLA G., 1998 – *Sperm structure of some Curculionoidea and their relationship with Chrysomeloidea*. - Bollettino del Museo regionale di Scienze Naturali (Torino), 16: 27-50.
- DE BIASE A., BELVEDERE S., SENIA G., MARCARI V., LA

- MARCA A., VU L.V., CRISTOFARO M., 2013 – *Preliminary analysis of variability and genetic differentiation in Asian and Mediterranean populations of Red Palm Weevil*. Atti della Accademia Nazionale Italiana di Entomologia. LXI, questo volume: 193-200.
- DEMBILIO Ó., JACAS J.A., 2012 – *Bio-ecology and integrated management of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae), in the region of Valencia (Spain)*. - Hellenic Plant Protection Journal, 5 (1): 1-11.
- DYCK V.A., HENDRICH S. J., ROBINSON A.S., (EDS.) 2005 – *Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management*, Springer, pp. 787.
- EL NAGGAR S.E., MOHAMED H.F., MAHMOUD E.A., 2010 – *Studies on the morphology and histology of the ovary of red palm weevil female irradiated with gamma rays*. - Journal of Asia-Pacific Entomology, 13 (1): 9-16.
- FALEIRO, J.R. (2006) – *A review of the issues and management of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years*. - International Journal of Tropical Insect Science, 26 (3): 135-154.
- HENDRICH S. J., FRANZ G., RENDON P., 1995 – *Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons*. - Journal of Applied Entomology, 119: 371-377.
- JAMIESON B.G., 1987 – *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. - CUP Archive. Cambridge University Press, pp. 320.
- JAMIESON B.G.M., DALLAI R., AFZELIUS B.A., 1999 – *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. - Science Publishers, Inc., pp. 555.
- MAZZA G., CINI A., CERVO R., LONGO S., 2011 – *Just phoresy? Reduced lifespan in red palm weevils Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae) infested by the mite Centrouropoda almerodai (Uroac-tiniinae: Uropodina)*. - Italian Journal of Zoology, 78 (1): 101-105.
- MAZZA G., ARIZZA V., BARACCHI D., BARZANTI G.P., BENVENUTI C., FRANCARDI V., FRANDI A., et al., 2011 – *Antimicrobial activity of the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus*. - Bulletin of Insectology, 64 (1): 33-41.
- NAME K.P.O., DOS REIS G.P.F., BAO S.N., 2007 – *An ultra-structural study of spermiogenesis in two species of Sitophilus (Coleoptera: Curculionidae)*. - Biocell, 31: 229-236.
- PHILLIPS D.M., 1970 – *Insect sperm: their structure and morphogenesis*. - Journal of Cell Biology, 44: 243-247.



