



ATTI  
DELLA  
ACCADEMIA  
NAZIONALE ITALIANA  
DI ENTOMOLOGIA

RENDICONTI  
Anno LXI  
2013



CEREBRO FAVCIBVS VTERO  
AB ORBIS ORIGINE  
TENENT

TIPOGRAFIA COPPINI - FIRENZE

ATTI  
DELLA  
ACCADEMIA  
NAZIONALE ITALIANA  
DI ENTOMOLOGIA

RENDICONTI  
Anno LXI  
2013



CEREBRO FAVCIBVS VTERO  
AB ORBIS ORIGINE  
TENENT

ISSN 0065-0757

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

Coordinatore della Redazione: *Dr. Roberto Nannelli*

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

## INDICE

### Rendiconti

Consiglio di Presidenza .....	Pag. 5
Elenco degli Accademici .....	» 6
Verbali delle adunanze del 15-16 febbraio 2013 .....	» 9
Verbali delle adunanze del 7-8 giugno 2013 .....	» 15
Verbali delle adunanze del 15-16 novembre 2013 .....	» 24

### Lecture

BRUNO MASSA – <i>Importanza della bioacustica nella sistematica degli Ortotteri</i> .....	» 33
ANDREA BATTISTI – <i>Insetti e cambiamento climatico</i> .....	» 43
ANNA MARIA FAUSTO – <i>Le strutture annesse all'apparato riproduttore degli insetti di interesse agrario e sanitario: morfologia e funzione</i> .....	» 49

### Tavola Rotonda su:

#### SALUTE DEGLI APOIDEI: DAI GENI ALLA COLONIA

FRANCO FRILLI, FRANCESCO PENNACCHIO – <i>Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia - Introduzione</i> .....	» 63
RITA CERVO, STEFANO TURILLAZZI – <i>Salute e difesa negli insetti sociali</i> .....	» 65
IGNAZIO FLORIS, ALBERTO SATTA – <i>Il collasso delle colonie e l'apicoltura oggi</i> .....	» 69
AULO MANINO, MARCO PORPORATO – <i>Api selvatiche: importanza e problematiche</i> .....	» 73
FRANCESCO NAZZI, FRANCESCO PENNACCHIO – <i>Agenti di stress e collasso delle colonie d'api</i> .....	» 77
RINALDO NICOLI ALDINI – <i>Relazioni tra microrganismi e Apoidei (Hymenoptera Apoidea)</i> .....	» 83

### Tavola Rotonda su:

#### LE COCCINIGLIE DELLE PIANTE COLTIVATE:

#### NUOVE ACQUISIZIONI E POSSIBILI STRATEGIE DI CONTROLLO

ZVI MENDEL, HOFIT KOL-MAIMON, MURAD GANIM, JOSÉ CARLOS FRANCO, ELSA BORGES DA SILVA, POMPEO SUMA – <i>Integration of mealybug sex pheromones in management strategies: reproductive biology studies and applied research</i> .....	» 93
POMPEO SUMA, AGATINO RUSSO, JOSÉ CARLOS FRANCO, ZVI MENDEL – <i>L'impiego dei semiochimici di sintesi nei programmi di controllo integrato delle cocciniglie degli agrumi</i> .....	» 97
CARLO DUSO – <i>Problems with scale insects in vineyards</i> .....	» 103
FRANCESCO PORCELLI – <i>Distribuzione e significato della simbiosi fra Diaspididae (Rhynchota Coccoidea) e Septobasidium (fungi)</i> .....	» 105
GIUSEPPINA PELLIZZARI, NICOLA MORI – <i>Pseudococcus comstocki (Kuwana) su fruttiferi e ornamentali nell'Italia nord-orientale e in altri Paesi europei</i> .....	» 113
GAETANA MAZZEO, SANTI LONGO, GIUSEPPINA PELLIZZARI, FRANCESCO PORCELLI, AGATINO RUSSO – <i>Le cocciniglie esotiche delle ornamentali recentemente introdotte in Italia e in Europa</i> .....	» 123

### Giornata culturale su:

#### CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DEI POLINEOTTERI BASALI.

#### STRUTTURA, COMPORTAMENTO E RIPRODUZIONE: ASPETTI DI BASE E APPLICATIVI

ROLF G. BEUTEL, BENJAMIN WIPFLER, MARCO GOTTARDO, ROMANO DALLAI – <i>Polyneoptera or "lower Neoptera" - new light on old and difficult phylogenetic problems</i> .....	» 133
STEFANO TURILLAZZI – <i>La socialità nei Polineotteri</i> .....	» 143
ROMOLO FOCHETTI – <i>Dalle conoscenze di base agli studi applicativi: i Plecotteri come paradigma</i> .....	» 149
ANDREA LUCHETTI, BARBARA MANTOVANI – <i>Biology of Italian termites (Blattodea, Termitoidae): native and invasive species</i> .....	» 157
MARCO GOTTARDO, DAVID MERCATI, ROMANO DALLAI – <i>La spermatologia comparata dei Phasmatodea (Insecta: Polyneoptera) conferma la posizione filogenetica basale di Timema</i> .....	» 167
ROMANO DALLAI, DAVID MERCATI, MARCO GOTTARDO, YUTA MASHIMO, RYUICHIRO MACHIDA, YOKO MATSUMURA, ROLF G. BEUTEL – <i>L'apparato genitale maschile e femminile degli Zoraptera (Insecta: Polyneoptera) e loro comportamento riproduttivo</i> .....	» 173

### 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> .....	» 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> .....	Pag. 189
ALESSIO DE BIASE, SILVIA BELVEDERE, GABRIELE SENIA, VERONICA MARGARI, 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

ANNO ACCADEMICO

2013

CONSIGLIO DI PRESIDENZA

---

PRESIDENTE

DALLAI Prof. Dott. Romano

(confermato)

VICE-PRESIDENTE

GIORDANA Prof. Dott.sa Barbara

(confermato)

SEGRETARIO

CRAVEDI Prof. Dott. Piero

(confermato)

TESORIERE

NANNELLI Dott. Roberto

(confermato)

## ELENCO DEGLI ACCADEMICI

### ACCADEMICI EMERITI

ARZONE Prof. Dott. Alessandra	- Torino	1984
BARONIO Prof. Piero	- Bologna	2001 - 2012
BOLCHI SERINI Prof. Dott. Graziella	- Milano	1986 - 2003
BONVICINI PAGLIAI Prof. Dott. Anna	- Modena	1983 - 2001
BRIOLINI Prof. Dott. Giovanni	- Bologna	1977 - 1982
COVASSI Dott. Marco Vittorio	- Firenze	1983 - 1997
DALLAI Prof. Dott. Romano	- Siena	1979 - 1982
FRILLI Prof. Dott. Franco	- Udine	1978 - 1982
GALVAGNI Dott. Antonio	- Rovereto (TN)	- 2007
MASUTTI Prof. Dott. Luigi	- Padova	1972 - 1977
MELLINI Prof. Dott. Egidio	- Bologna	1962 - 1972
MINEO Prof. Dott. Giovanni	- Palermo	1986
MONACO Prof. Dott. Raffaele	- Bari	1985
OSELLA Prof. Dott. Giuseppe Bartolomeo	- L'Aquila	1983 - 1997
PEGAZZANO Prof. Dott. Fausta	- Firenze	1986 - 2005
PRINCIPI Prof. Dott. Maria Matilde	- Bologna	1953 - 1960
RIVOSECCHI Prof. Dott. Leo	- Roma	1987 - 2003
SANTINI Prof. Dott. Luciano	- Pisa	1993 - 2000
SOLINAS Prof. Dott. Mario	- Perugia	1978
ZANGHERI Prof. Dott. Sergio	- Padova	1970 - 1977

### ACCADEMICI ORDINARI

ALMA Prof. Dott. Alberto	- Torino	2007 - 2013
BARBAGALLO Prof. Dott. Sebastiano	- Catania	1982
BIN Prof. Dott. Ferdinando	- Perugia	1998 - 2002
BINAZZI Dott. Andrea	- Firenze	1998 - 2012
BOLOGNA Prof. Marco	- Roma	2001 - 2008
BULLINI Prof. Dott. Luciano	- Roma	1986
CASALE Prof. Dott. Achille	- Sassari	1996 - 2002
CRAVEDI Prof. Dott. Piero	- Piacenza	1999 - 2005
DELRIO Prof. Dott. Gavino	- Sassari	1989 - 2000
GASPERI Prof. Dott. Giuliano	- Pavia	2005 - 2013
GIORDANA Prof. Dott. Barbara	- Milano	1997 - 2003
GIROLAMI Prof. Dott. Vincenzo	- Padova	1993 - 2004
LONGO Prof. Dott. Santi	- Catania	1993 - 2000
MALVA Dott. Carla	- Napoli	2001 - 2011
MAROLI Prof. Dott. Michele	- Roma	2003 - 2010
MAZZINI Prof. Dott. Massimo	- Viterbo	2000
MINELLI Prof. Dott. Alessandro	- Padova	1986 - 1993
NANNELLI Dott. Roberto	- Firenze	1998 - 2005
NUZZACI Prof. Dott. Giorgio	- Bari	1988 - 1994
OLMI Prof. Dott. Massimo	- Viterbo	2002 - 2013
PENNACCHIO Prof. Dott. Francesco	- Napoli	2001 - 2007
POGGI Dott. Roberto	- Genova	1989 - 1999
RAGUSA DI CHIARA Prof. Dott. Salvatore	- Palermo	1993 - 2000
RAPISARDA Prof. Dott. Carmelo	- Catania	2005 - 2012
ROTUNDO Prof. Dott. Giuseppe	- Campobasso	1999 - 2010

ROVERSI Prof. Pio Federico	- Firenze	2008
SBORDONI Prof. Dott. Valerio	- Roma	1986
SÜSS Prof. Dott. Luciano	- Milano	1987 - 1993
TRANFAGLIA Prof. Dott. Antonio	- Potenza	1993 - 1999
TRIGGIANI Prof. Oreste	- Bari	2001 - 2012
TURILLAZZI Prof. Dott. Stefano	- Firenze	1989 - 2000
VIGNA TAGLIANTI Prof. Dott. Augusto	- Roma	1986 - 1994

#### ACCADEMICI ONORARI

ALBERTI Prof. Gerd	- Greifswald (Germania)	2005
ALTIERI Prof. Miguel Angel	- Berkeley (California, USA)	2004
BOUČEK Dott. Zdenek (*)	- Praga (Repubblica Ceca)	2003
DELUCCHI Prof. Dott. Vittorio	- Zurigo (Svizzera)	1998
HARRIS Dott. Keit Murray	- Ripley, Woking (U.K.)	2002
HODEK Prof. Dott. Ivo	- České Budejovice (Repubblica Ceca)	1986
LENTEREN Prof. Dott. Johan Coert van	- Wageningen (Olanda)	2006
STROYAN Dott. Henry L.G.	- Harpenden (U.K.)	1998
TAUTZ Prof. Dott. Jürgen	- Würzburg (Germania)	2006
WILSON Prof. Edward O.	- Birmingham (Alabama, USA)	2011

#### ACCADEMICI STRAORDINARI

AUDISIO Prof. Paolo Aldo	- Napoli	2004
BATTISTI Prof. Andrea	- Padova	2010
BIONDI Prof. Maurizio	- L'Aquila	2012
BRANDMAYR Prof. Dott. Pietro	- Rende (CS)	2005
CERVO Prof. Rita	- Firenze	2012
COBOLLI Prof. Marina	- Roma	2001
COLAZZA Prof. Dott. Stefano	- Palermo	2013
DACCORDI Dott. Mauro	- Verona	1990
DE LILLO Prof. Dott. Enrico	- Bari	2011
DE MARZO Prof. Dott. Luigi (**)	- Potenza	2007
FAUSTO Prof. Dott. Anna Maria	- Viterbo	2011
FLORIS Prof. Dott. Ignazio	- Sassari	2011
FRATI Prof. Francesco	- Siena	2012
GARGIULO Prof. Dott. Giuseppe	- Bologna	2013
ISIDORO Prof. Dott. Nunzio	- Ancona	2013
LUCIANO Prof. Dott. Pietro	- Sassari	2009
MAINI Prof. Dott. Stefano	- Bologna	2005
MASSA Prof. Dott. Bruno	- Palermo	2011
NAZZI Prof. Francesco	- Udine	2012
PELLIZZARI Prof. Dott. Giuseppina	- Padova	2011
RUSSO Prof. Dott. Agatino	- Catania	2011
VANNINI Prof. Dott. Marco	- Firenze	2003
ZAPPAROLI Prof. Marzio	- Viterbo	2012

(\*) † 17 luglio 2011.

(\*\*) † 5 maggio 2013.

N.B. - Per gli Accademici Emeriti ed Ordinari le date sono rispettivamente quelle della nomina ad Accademico Straordinario e ad Accademico Ordinario.

## VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 15 - 16 FEBBRAIO 2013

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

### SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 15 febbraio 2013, alle ore 15:00, presso l'aula 1 del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università in Via Romana 17 a Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

*Ordinari:* A. BINAZZI, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, G. NUZZACI, F. PENNACCHIO, S. RAGUSA DI CHIARA, G. ROTUNDO, S. TURILLAZZI;

*Straordinari:* A. ALMA, R. CERVO, E. DE LILLO, I. FLORIS, G. GASPERI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, F. NAZZI, G. PELLIZZARI SCALTRITI.

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

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, G. BRIOLINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, L. MASUTTI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOCSECCI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Onorari:* H.L.G. STROYAN; *Ordinari:* S. BARBAGALLO, P. BARONIO, M. BOLOGNA, A. CASALE, C. MALVA, M. MAZZINI, A. MINELLI, R. POGGI, C. RAPISARDA, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI; *Straordinari:* P.A. AUDISIO, A. BATTISTI, M. COBOLLI, M. DACCORDI, A.M. FAUSTO, M. OLMI, A. RUSSO, M. VANNINI, M. ZAPPAROLI.

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

#### *Salute degli apoidei: dai geni alla colonia*

Il Presidente Romano DALLAI apre la Seduta Pubblica e comunica che l'Accademico Franco FRILLI, che assieme all'Accademico Francesco PENNACCHIO ha organizzato la Tavola Rotonda, ha scusato la sua assenza per motivi di salute, quindi invita l'Accademico Francesco PENNACCHIO a coordinare i lavori.

– Accademico Francesco PENNACCHIO: *Introduzione*

Si susseguono gli interventi:

- Accademici Stefano TURILLAZZI e Rita CERVO: *Salute e difesa negli insetti sociali.*
- Accademico Ignazio FLORIS: *Il collasso delle colonie e l'apicoltura oggi.*
- Prof. AULO MANINO e Dott. MARCO PORPORATO (Università degli Studi di Torino): *Api selvatiche: importanza e problematiche.*
- Dott. RINALDO NICOLI ALDINI (Università Cattolica del Sacro Cuore - Piacenza): *Microrganismi associati agli Apoidei.*
- Accademici Francesco PENNACCHIO e Francesco NAZZI: *Agenti di stress e collasso delle colonie d'api.*

Segue un'interessante discussione, al termine della quale la seduta si conclude alle ore 18:00.

I testi delle relazioni verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2013 dell'Accademia.

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

## ASSEMBLEA ORDINARIA

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

Sabato 16 febbraio 2013 alle ore 09:30, presso l'aula 1 del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università in Via Romana 17 a Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea Ordinaria alla presenza degli Accademici:

*Emeriti:* L. MASUTTI, M. SOLINAS;

*Ordinari:* P. BARONIO, A. BINAZZI, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, G. NUZZACI, F. PENNACCHIO, S. RAGUSA DI CHIARA, G. ROTUNDO, L. SANTINI, S. TURILLAZZI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, G. BRIOLINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOSECCHI, S. ZANGHERI; *Ordinari:* S. BARBAGALLO, M. BOLOGNA, A. CASALE, C. MALVA, M. MAZZINI, A. MINELLI, R. POGGI, C. RAPISARDA, P.F. ROVERSI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

- 1) Approvazione del verbale della seduta precedente (17 novembre 2012).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Esame e approvazione Conto consuntivo anno finanziario 2012.
- 4) Varie ed eventuali.

### 1) APPROVAZIONE DEL VERBALE SEDUTA PRECEDENTE (17 NOVEMBRE 2012)

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea Ordinaria del 17 novembre 2012, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici. Il verbale viene approvato all'unanimità.

### 2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

- Il Presidente, a norma dell'art. 7 del Regolamento, comunica che:
- la disponibilità di posti nelle diverse categorie di Accademici, al 30 aprile 2013 è la seguente:
    - per Accademico Ordinario: posti liberi 7;
    - per Accademico Straordinario: posti liberi 7.

Ciascuna proposta fatta da almeno 3 Accademici Ordinari o Emeriti accompagnata da una breve relazione sui meriti scientifici e accademici dei candidati deve pervenire al Presidente dell'Accademia entro il 30 aprile 2013 secondo quanto previsto dall'art. 12 dello Statuto.

### 3) ESAME E APPROVAZIONE CONTO CONSUNTIVO ANNO FINANZIARIO 2012

Il Presidente invita il Tesoriere NANNELLI a presentare il Conto consuntivo per l'anno finanziario 2012.

Il Tesoriere fa presente che il 6 febbraio scorso si è riunito presso il Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università di Firenze il Collegio dei Revisori dei Conti per l'analisi e l'approvazione del Bilancio preventivo 2013 e il Conto consuntivo 2012.

Il Tesoriere illustra quindi all'Assemblea i principali capitoli del Conto consuntivo evidenziando la modesta disponibilità finanziaria dell'Accademia leggermente incrementata nel corso del 2012 dall'avanzo di bilancio derivato all'Accademia dall'organizzazione e la gestione amministrativa del congresso IUSSE di Montecatini. Completata l'illustrazione e non essendovi richieste di ulteriori dettagli, il Presidente pone in votazione il Conto consuntivo 2012 che viene approvato all'unanimità e che verrà conservato agli atti.

Il Tesoriere informa l'Assemblea che nel mese di dicembre è stata presentata al MIPAAF richiesta di finanziamento per il 2013 relativamente all'organizzazione delle Tavole Rotonde.

#### 4) VARIE ED EVENTUALI

Chiesta e ottenuta la parola gli Accademici Santi LONGO e Gavino DELRIO evidenziano il perdurare dei gravi attacchi del Coleottero *Rhynchophorus ferrugineus* alle palme, tale da rappresentare tuttora uno dei principali problemi entomologici per il nostro Paese.

Segue una breve discussione da cui emerge il vivo e attuale interesse per l'argomento proposto e l'opportunità di organizzare un'apposita giornata di studio.

Il Presidente incarica l'Accademico Santi LONGO di interessarsi per la realizzazione e l'organizzazione dell'iniziativa, suggerendo come periodo il mese di settembre 2013 in una sede da individuare in tempi brevi. Come relatori dovrebbero essere coinvolti i vari gruppi di ricerca che hanno affrontato l'argomento.

La seduta dell'Assemblea Ordinaria è tolta alle ore 10:25.

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

#### SEDUTA PUBBLICA

Alle ore 10:30 il Presidente prof. Romano DALLAI dichiara aperta la Seduta Pubblica.

Oltre agli Accademici Ordinari, presenti all'Assemblea Ordinaria, partecipano gli Accademici Straordinari e altri studiosi e ricercatori ospiti dell'Accademia.

Il Presidente Romano DALLAI invita l'Accademico Bruno MASSA a presentare la lettura dal titolo:

*Importanza della bioacustica nella sistematica degli Ortoteri*

Segue una partecipata discussione che evidenzia il vivo interesse dell'uditorio per l'argomento inconsueto oltretutto per la documentata bella presentazione, al termine della quale il Presidente ringrazia il relatore e coloro che sono intervenuti.

Il testo della lettura verrà pubblicato sugli Atti-Rendiconti 2013.

La Seduta è tolta alle ore 11:30.

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

## ASSEMBLEA PLENARIA

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

Alle ore 11:30 di sabato 16 febbraio 2013 il Presidente Romano DALLAI apre la Seduta Plenaria alla presenza degli Accademici:

*Emeriti:* L. MASUTTI, M. SOLINAS;

*Ordinari:* P. BARONIO, A. BINAZZI, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, G. NUZZACI, F. PENNACCHIO, S. RAGUSA DI CHIARA, G. ROTUNDO, L. SANTINI, S. TURILLAZZI;

*Straordinari:* A. ALMA, A. BATTISTI, M. BIONDI, R. CERVO, E. DE LILLO, I. FLORIS, F. FRATI, G. GASPERI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, F. NAZZI, G. PELLIZZARI SCALTRITI, C. RAPISARDA.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, G. BRIOLINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOSACCHI, S. ZANGHERI; *Onorari:* H.L.G. STROYAN; *Ordinari:* S. BARBAGALLO, M. BOLOGNA, A. CASALE, C. MALVA, M. MAZZINI, A. MINELLI, R. POGGI, C. RAPISARDA, P.F. ROVERSI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI; *Straordinari:* P.A. AUDISIO, M. COBOLLI, M. DACCORDI, A.M. FAUSTO, M. OLMI, A. RUSSO, M. VANNINI, M. ZAPPAROLI.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

- 1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti (16-17 novembre 2012).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Proclamazione e consegna Diplomi ai nuovi Accademici Straordinari.
- 4) Fauna d'Italia.
- 5) Varie ed eventuali.

### 1) APPROVAZIONE DEI VERBALI DELLE SEDUTE PRECEDENTI (16-17 NOVEMBRE 2012)

Vengono esaminati i verbali della Seduta Pubblica di venerdì 16 novembre 2012 e dell'Assemblea Plenaria di sabato 17 novembre 2012, già inviati a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici.

I verbali vengono approvati all'unanimità.

### 2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente rende conto dell'attività svolta dall'Accademia nel 2012.

In occasione delle Sedute Pubbliche sono state realizzate le seguenti attività culturali:

- 17 febbraio
  - Tavola Rotonda coordinata dall'Accademico Carmelo RAPISARDA su: «*La Tignola del pomodoro, Tuta absoluta (Meyrick)*».
- 18 febbraio
  - Lettura del dott. Luigi PONTI su: «*Gestione di specie invasive nel quadro di una visione agroecologica: il caso di Tuta absoluta (Meyrick)*»;
  - Commemorazione del Presidente Emerito Baccio BACCETTI a cura degli Accademici Romano DALLAI e Pio Federico ROVERSI;
  - Commemorazione dell'Accademico Emerito Cesare CONCI a cura dell'Accademico Roberto POGGI;

- 8 giugno
    - Tavola Rotonda coordinata dagli Accademici Francesco PENNACCHIO e Barbara GIORDANA SU: «*Antagonisti, simbiotici e nuove strategie di controllo*»
  - 9 giugno
    - Lettura dell'Accademico Onorario Miguel Angel ALTIERI SU: «*Managing insect pests in the agroecosystems of the future*»
  - 16 novembre
    - Tavola Rotonda coordinata dall'Accademico Piero CRAVEDI su: «*La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi*»
- Altre iniziative realizzate nell'anno 2012 sono state:
- 5<sup>th</sup> Congress European Sections of the IUSSE, a Montecatini il 25-30 agosto;
  - VI Corso di Allergologia e Dermatologia entomologiche, a Como il 17 e 18 maggio, - Stampa Atti-Rendiconti Anno LIX 2011.

Il Presidente ricorda anche il programma definitivo delle iniziative per il corrente anno 2013. L'attività è iniziata con la Tavola rotonda della Seduta Pubblica di ieri (15 febbraio) coordinata dagli Accademici Franco FRILLI e Francesco PENNACCHIO su «*Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia*», e con la lettura dell'Accademico Bruno MASSA su «*Importanza della bioacustica nella sistematica degli Ortotteri*» che ha appena preceduto la presente Seduta Plenaria.

Il 7 giugno è prevista una Tavola Rotonda sulle cocciniglie dei fruttiferi, agrumi e vite, coordinata dagli Accademici Giuseppina PELLIZZARI e Agatino RUSSO. Il sabato 8 giugno sono previste una lettura su "Insetti e cambiamenti climatici" dell'Accademico Andrea BATTISTI e la commemorazione dell'Accademico Mario COLUZZI da parte del Prof. Gilberto CORBELLINI dell'Università di Roma.

In merito alla giornata di Studio coordinata dallo stesso Presidente assieme all'Accademico Stefano TURILLAZZI dal titolo provvisorio «*Up to-date su Polineotteri basali: struttura, comportamento e aspetti applicativi*», egli precisa che è stata fissata la data del 11 ottobre e che buona parte dei relatori invitati ha già fornito la disponibilità a partecipare.

Nella Seduta Pubblica di venerdì 15 novembre è prevista una Tavola Rotonda su «*Criobiologia e Crioconservazione nel futuro dell'entomologia*» coordinata dall'Accademico Pio Federico ROVERSI.

Tra le due Assemblee di sabato 16 novembre è prevista una Seduta Pubblica in cui l'Accademica Anna Maria FAUSTO presenterà una lettura dal titolo: «*Le strutture annesse all'apparato riproduttore di insetti di interesse agrario e sanitario: morfologia e funzione*».

Il Presidente informa inoltre che nell'Assemblea Ordinaria odierna è emerso l'interesse a dedicare una Giornata di Studio sulla problematica del Rincoforo delle Palme nel mese di settembre 2013. L'incarico organizzativo è stato affidato all'Accademico Santi LONGO.

Ricordando che l'impegno nell'attività culturale è prioritario per l'Accademia, il Presidente invita ad avanzare proposte anche per l'anno 2014, che è stato finora appena delineato.

L'Accademico Giorgio NUZZACI, chiesta e ottenuta la parola, evidenzia l'importanza di dedicare attenzione a tematiche di Acarologia e si dichiara personalmente disponibile a coinvolgere i colleghi Acarologi per valutare la possibilità di organizzare una Giornata di studio o un'altra analogo iniziativa per il 2014.

Su invito del Presidente, l'Accademico Francesco PENNACCHIO riferisce in merito all'avvio della pubblicazione della nuova rivista internazionale denominata "Entomologia". Il Comitato Editoriale, che è stato costituito alla fine dello scorso anno coinvolgendo la Comunità Scientifica nazionale e molti autorevoli entomologi stranieri, ha già iniziato a contribuire concretamente, avanzando, finora, offerte per più di 20 lavori. Ciò consente di prevedere l'uscita del primo numero nell'arco di alcuni mesi.

Il Presidente invita l'Accademico Stefano TURILLAZZI, responsabile della Scuola di Alta Formazione "Marcello La Greca" a riferire sui programmi di attività. L'Accademico TURILLAZZI riferisce circa la possibilità di organizzare il VII Corso di Allergologia e Dermatologia entomologiche entro il 2013. Tuttavia, date le esigenze di carattere economico-finanziario e quindi la necessità di reperire una sponsorizzazione, è probabile che si debba attendere il 2014.

Segue una breve discussione da cui emerge l'invito agli Accademici a segnalare tematiche per altri possibili corsi.

3) PROCLAMAZIONE E CONSEGNA DIPLOMI NUOVI ACCADEMICI STRAORDINARI

Il Presidente consegna i Diplomi di Accademico Straordinario ai nuovi Accademici Maurizio BIONDI, Rita CERVO, Francesco FRATI, e Francesco NAZZI. L'Accademico Marzio ZAPPAROLI ha giustificato la propria assenza per inderogabili impegni di ricerche all'estero.

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

4) FAUNA D'ITALIA

Il Presidente informa che l'Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI non è presente a causa della concomitante Assemblea dell'Unione Zoologica Italiana a Roma, ma ha inviato una breve nota con cui riferisce che: non ci sono attualmente novità di rilievo sulla istituzione di nuovi rapporti tra il Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia ed il Ministero Ambiente. Non sono emerse novità nemmeno sui rapporti legali tra l'editore Calderini-Il Sole 24 Ore (ex Edagricole) ed il Ministero stesso. Le prossime Assemblee saranno occasione per una discussione in merito.

5) VARIE ED EVENTUALI

Nessuna

La seduta dell'Assemblea plenaria è tolta alle ore 12:30

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

# VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 7 - 8 GIUGNO 2013

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

## SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 7 giugno 2013 alle ore 15:00, a Firenze Via Romana 17 (Aula 1 – Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università di Firenze), come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

*Ordinari:* S. BARBAGALLO, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, C. RAPISARDA, S. TURILLAZZI;

*Straordinari:* A. ALMA, A. BATTISTI, P. BRANDMAYR, R. CERVO, M. COBOLLI, E. DE LILLO, I. FLORIS, S. MAINI, B. MASSA, F. NAZZI, M. OLMI, A. RUSSO.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. Arzone, G. Bolchi SERINI, G. BRIOLINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, L. MASUTTI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOCCHI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Onorari:* H.L.G. SROYAN; *Ordinari:* P. BARONIO, A. BINAZZI, M.A. BOLOGNA, A.M. BONVICINI PAGLIAI, A. CASALE, C. MALVA, M. MAZZINI, A. MINELLI, G. NUZZACI, R. POGGI, S. RAGUSA DI CHIARA, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, V. SBORDONI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI; *Straordinari:* P.A. AUDISIO, M. BIONDI, A.M. FAUSTO, F. FRATI, P. LUCIANO, G. PELLIZZARI, M. ZAPPAROLI.

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

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

*Le cocciniglie delle piante coltivate: nuove acquisizioni e possibili strategie di controllo*

Il Presidente Romano DALLAI apre la seduta Pubblica e informa che l'Accademica Giuseppina PELLIZZARI, che ha attivamente partecipato all'organizzazione della Tavola Rotonda, non è presente per motivi di salute e invita l'Accademico Agatino RUSSO a coordinare i lavori.

– Accademico Agatino RUSSO: *Introduzione*  
Si susseguono gli interventi

– ZVI MENDEL (Department of Entomology, Agricultural Research Organization, Bet Dagan, Israel): *Integration of scale insect sex pheromones in management strategies: ecological basis and practical research.*

– Agatino RUSSO e Pompeo SUMA (Università di Catania): *Ottimizzazione dell'impiego dei semiochimici di sintesi nei programmi di controllo integrato delle cocciniglie degli agrumi.*

– Carlo DUSO (Università di Padova): *Problematiche associate alle cocciniglie della vite:*

– Francesco PORCELLI (Università di Bari): *Distribuzione e significato della simbiosi fra Diaspididae (Rhynchota) e Septobasidium spp. (Fungi).*

– Giuseppina PELLIZZARI e Nicola MORI (Università di Padova): *Le infestazioni di Pseudococcus comstocki su fruttiferi nell'Italia nord orientale e in altri paesi europei.*

– Gaetana MAZZEO, Santi LONGO e Agatino RUSSO (Università di Catania), Francesco PORCELLI (Università di Bari), Giuseppina PELLIZZARI (Università di Padova): *"Specie esotiche invasive delle ornamentali - rassegna".*

Segue un'interessante discussione, al termine della quale la Seduta si conclude alle ore 18:00.  
I testi delle relazioni verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2013 dell'Accademia

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

## SEDUTA ORDINARIA

Presiede il Presidente prof. Romano DALLAI

Segretario verbalizzante: il Segretario prof. Piero CRAVEDI

Sabato 8 giugno 2013 alle ore 10:00, a Firenze Via Romana 17 (Aula 1 - Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università di Firenze), come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Ordinaria.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti:* L. MASUTTI;

*Ordinari:* S. BARBAGALLO, P. BARONIO, A. BINAZZI, A. CASALE, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, R. POGGI, C. RAPISARDA, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, G. BRIOLINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOSACCHI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Ordinari:* M.A. BOLOGNA, A.M. BONVICINI PAGLIAI, C. MALVA, M. MAZZINI, A. MINELLI, G. NUZZACI, S. RAGUSA DI CHIARA, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, V. SBORDONI, L. SÜSS.

Viene discusso il seguente Ordine del Giorno:

- 1) Approvazione del verbale della seduta precedente (16 febbraio 2013).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Varie ed eventuali.

### 1) APPROVAZIONE DEL VERBALE DELLA SEDUTA PRECEDENTE (16 FEBBRAIO 2013)

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea Ordinaria del 16 febbraio 2013, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici, che viene approvato all'unanimità.

### 2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente inizia comunicando la recente scomparsa dell'Accademico Straordinario Luigi DE MARZO e invita l'Assemblea ad osservare un minuto di raccoglimento.

La notizia suscita partecipazione e commozione.

Il Presidente prosegue poi comunicando che:

- a) a norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Art. 7), a fronte di 7 posti disponibili per Accademico Ordinario e 7 posti per Accademico Straordinario, sono pervenuti entro il 30 aprile 2013 le seguenti proposte per nuovi Accademici per essere votate nell'Assemblea Ordinaria di novembre 2013.

Tre proposte per nuovi Accademici Straordinari che riguardano:

- 1) prof. Stefano COLAZZA presentato dagli Accademici Salvatore RAGUSA, Santi LONGO e Giuseppe ROTUNDO
- 2) prof. Giuseppe GARGIULO presentato dagli Accademici Carla MALVA, Francesco PENNACCHIO e Mario SOLINAS
- 3) prof. Nunzio ISIDORO presentato dagli Accademici Mario SOLINAS, Andrea BINAZZI e Pio Federico ROVERSI

Quattro proposte per nuovi Accademici Ordinari che riguardano gli Accademici Straordinari:

- 1) Andrea BATTISTI presentato dagli Accademici Marco COVASSI, Vincenzo GIROLAMI e Luigi MASUTTI

- 2) Pietro BRANDMAYR presentato dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Mario SOLINAS e Pio Federico ROVERSI
- 3) Pietro LUCIANO presentato dagli Accademici Gavino DELRIO, Mario SOLINAS e Santi LONGO
- 4) Stefano MAINI presentato dagli Accademici Maria Matilde PRINCIPI, Giovanni BRIOLINI e Mario SOLINAS
- b) Il Consiglio di Presidenza con il 2013 termina il suo mandato triennale. A novembre si dovrà procedere all'elezione del nuovo Consiglio di Presidenza e dei Revisori dei Conti per il triennio 2014-2016.  
L'Art. 11 dello Statuto prevede che il Consiglio di Presidenza possa essere rieletto. Il Presidente invita gli attuali componenti del Consiglio a segnalare l'eventuale disponibilità ad essere rieletti tutti e gli Accademici a segnalare eventuali auspicabili nuove candidature.
- c) nell'anno 2013 gli Accademici Ordinari Piero BARONIO, Romano DALLAI e Luciano SANTINI hanno compiuto il 75° anno di età per cui sono passati alla categoria degli Accademici Emeriti. L'Accademica Anna Maria BONVICINI PAGLIAI passerà nella categoria degli Emeriti nel mese di Dicembre.
- d) gli Accademici Gavino DELRIO e Pietro LUCIANO hanno accolto con vivo piacere le richieste dell'Accademia nazionale Italiana di Entomologia e della Società Entomologica Italiana di organizzare in Sardegna il XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia per l'anno 2014.  
Nell'Assemblea Plenaria che seguirà la Seduta Pubblica l'argomento verrà adeguatamente presentato e discusso.

### 3)VARIE ED EVENTUALI

Nessuna

La seduta dell'Assemblea ordinaria è tolta alle ore 10,30

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

### SEDUTA PUBBLICA

Alle ore 10,30 il Presidente Romano DALLAI dichiara aperta la Seduta Pubblica.

Oltre agli Accademici presenti all'Assemblea Ordinaria partecipano anche gli Accademici Straordinari e studiosi e ricercatori ospiti dell'Accademia.

Il Presidente dà la parola all'Accademico Straordinario Andrea BATTISTI per la lettura

*Insetti e cambiamento climatico*

segue una breve discussione con alcuni interventi, al termine della quale il Presidente ringrazia il relatore e coloro che sono intervenuti.

Il Presidente dà successivamente la parola al prof. Gilberto CORBELLINI dell'Università "La Sapienza" di Roma per la commemorazione dell'Accademico Straordinario Mario COLUZZI.

I testi della lettura e della commemorazione verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2013.

La Seduta è tolta alle ore 12:00

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

ASSEMBLEA PLENARIA

Presiede il Presidente prof. Romano DALLAI

Segretario verbalizzante: il Segretario prof. Piero CRAVEDI

Il giorno 8 giugno 2013 alle ore 12,00 il Presidente apre la seduta alla presenza degli Accademici:

*Emeriti:* L. MASUTTI;

*Ordinari:* S. BARBAGALLO, P. BARONIO, A. BINAZZI, A. CASALE, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, R. POGGI, C. RAPI SARDA, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI;

*Straordinari:* A. ALMA, P.A. AUDISIO, A. BATTISTI, M. BIONDI, P. BRANDMAYR, R. CERVO, E. DE LILLO, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, F. FRATI, S. MAINI, B. MASSA, F. NAZZI, M. OLMI, G. PELLIZZARI, A. RUSSO, M. ZAPPAROLI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, G. BRIOLINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOSECCI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Onorari:* H.L.G. STROYAN; *Ordinari:* M.A. BOLOGNA, A.M. BONVICI PAGLIAI, C. MALVA, M. MAZZINI, A. MINELLI, G. NUZZACI, S. RAGUSA DI CHIARA, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, V. SBORDONI, L. SÜSS; *Straordinari:* M. COBOLLI, P. LUCIANO, G. PELLIZZARI.

Viene discusso il seguente Ordine del Giorno:

- 1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti (15 e 16 febbraio 2013).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Fauna d'Italia.
- 4) XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia.
- 5) Premio Osella 2014.
- 6) Varie ed eventuali.

1) APPROVAZIONE DEI VERBALI DELLE SEDUTE PRECEDENTI (15 E 16 FEBBRAIO 2013)

Vengono esaminati i verbali delle Sedute Pubbliche del 15 e 16 febbraio 2013 e dell'Assemblea Plenaria del 16 febbraio 2013, già inviato a suo tempo per posta elettronica agli Accademici, che vengono approvati all'unanimità

2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente Romano DALLAI comunica la recente scomparsa dell'Accademico straordinario Luigi DE MARZO ed invita l'Assemblea ad osservare un minuto di raccoglimento.

Successivamente il Presidente consegna il Diploma di Accademico Straordinario al neoletto Marzio ZAPPAROLI, che non lo aveva ritirato a febbraio in quanto impegnato per attività di ricerca all'estero.

L'Assemblea si congratula con il neoletto accogliendolo con un caloroso applauso.

Il Presidente prosegue poi comunicando che: il programma delle attività culturali del 2013 è stato leggermente modificato e meglio definito come segue:

- Venerdì 11 ottobre 2013 gli Accademici Romano DALLAI e Stefano TURILLAZZI coordineranno una giornata di studio su "Contributo alla conoscenza dei Polineotteri basali: struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base ed applicativi" presso la sede dell'Accademia, in via Lanciola 17, Cascine del Riccio Firenze.
- Venerdì 15 novembre 2013 è previsto che la Seduta Pubblica sia dedicata a una Tavola Rotonda sul "Rincoforo delle palme" coordinata dall'Accademico Santi LONGO

- Sabato 16 novembre 2013 l'Accademica Anna Maria FAUSTO terrà la Lettura "Le strutture annesse all'apparato riproduttore degli insetti di interesse agrario e sanitario: morfologia e funzione"

Per il 2014 e il febbraio 2015 il programma elaborato in base a proposte pervenute al Consiglio di Presidenza prevede:

- *febbraio 2014*
  - venerdì 21 febbraio Tavola Rotonda coordinata dall'Accademico Enrico DE LILLO su "Controllo integrato e biologico (mediante artropodi fitofagi delle piante infestanti)";
  - sabato 22 febbraio Lettura dell'Accademico Pietro BRANDMAYR su "Indicatori ambientali".
- *giugno 2014*
  - XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia.
- *settembre 2014*
  - Giornata di Studio "Insetti vettori di malattie dell'uomo e degli animali domestici" Anna Maria FAUSTO e Michele MAROLI in onore dell'Accademico Mario COLUZZI. La sede sarà scelta tra Roma e Viterbo.
- *novembre 2014*
  - venerdì Tavola Rotonda su "Insetti vettori di malattie delle piante" coordinata dall'Accademico Alberto ALMA;
  - sabato Lettura del prof. Nunzio ISIDORO "Ultrastrutture di sensilli e ghiandole".
- *febbraio 2015*
  - venerdì Tavola Rotonda dedicata all'Acarologia coordinata dagli Accademici Giorgio NUZZACI, Salvatore RAGUSA DI CHIARA e Roberto NANNELLI;
  - sabato Lettura dal titolo "Aggiornamenti sulla sistematica degli Acari Fitoseidi" del prof. Haralabos TSOLAKIS dell'Università di Palermo.

Segue un'ampia discussione da cui emerge l'apprezzamento per il programma presentato e qualche commento relativo alla sede delle attività previste.

A novembre 2013 dovranno essere fissate le date delle adunanze del 2014.

### 3) FAUNA D'ITALIA

Su invito del Presidente l'Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI riferisce sulla situazione del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia (CSFI).

Ricorda in primo luogo come il CFSI nel 2012 abbia puntualmente ottemperato agli impegni editoriali assunti con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM), sulla base dell'Atto di Intesa tra il MATTM ed il CFSI dell'aprile 2002, rinnovato nel 2008, con la pubblicazione entro l'estate 2012 dei due volumi previsti.

Infatti il volume 47, Mammalia I - Chiroptera, di B. LANZA, è stato stampato a fine luglio, ed il volume 48, Orthoptera, di B. MASSA, P. FONTANA, F.M. BUZZETTI, R. KLEUKERS e B. ODÉ, con C. DI RUSSO e M. RAMPINI e A. GALVAGNI, con DVD allegato, è stato stampato a fine agosto. Le fatture sono state regolarmente liquidate dal CSFI all'Editore e dal MATTM al Comitato.

Per agevolarne la distribuzione, questi due volumi sono stati consegnati in due lotti di 500 copie, sia presso il Ministero dell'Ambiente sia presso il Museo di Zoologia (sede di Entomologia) della Sapienza.

Il futuro sviluppo del piano editoriale, per il momento, non è chiaro: con l'avvenuto pensionamento a fine ottobre del Dott. Sandro LA POSTA, dirigente della Direzione Protezione della Natura, Tutela della Biodiversità, che si era sempre impegnato con capacità e passione nello sviluppo della editoria scientifica e naturalistica a livello ministeriale e nel sostegno all'attività del Comitato, si è aperto un periodo nuovo, nell'attesa di proporre l'eventuale rinnovo dell'Accordo di programma e la eventuale prosecuzione e sopravvivenza della stessa collana "Fauna d'Italia".

Il nuovo Dirigente, nominato ad interim, è la Dott.ssa Maria Carmela GIARRATANO, dirigente della Divisione IV Programmazione e sviluppo delle aree naturali protette dello stesso Ministero.

Il 23 gennaio 2013 si è tenuto presso il MATTM un incontro tra il CSFI, rappresentato dal Presidente e dal Segretario Tesoriere, al fine di prendere i dovuti contatti con la nuova Dirigente e dare quindi continuità alle nostre attività. A tale incontro erano presenti anche la Dott.ssa Luisa FARINA e il Dott. Eugenio DUPRÉ, già collaboratori di LA POSTA.

L'incontro è stato a nostro avviso costruttivo, dal momento che la nuova Dirigente ha riconosciuto "una posizione di privilegio" al CSFI per le attività svolte ed ha espresso interesse a mantenere i rapporti di collaborazione esistenti. Nel corso della discussione è emersa tuttavia l'esigenza di fare chiarezza, prima d'intraprendere ogni nuova iniziativa, su alcuni aspetti del rapporto tra le parti, in particolare sugli effettivi vincoli legali esistenti tra Il Sole 24 Ore - Calderini e il CSFI. Nei nostri archivi esistono infatti documenti che testimoniano accordi tra la Casa Editrice e il Comitato per la pubblicazione della Collana della Fauna d'Italia, che risalgono al 1954 e al 1975. Non abbiamo però traccia riguardo alla formalizzazione di tali atti presso studi legali o altro.

Il 10 maggio 2013 si è quindi tenuto all'Università La Sapienza un incontro tra alcuni rappresentanti del CSFI (Augusto VIGNA TAGLIANTI, Marco BOLOGNA, Marco OLIVERIO, Marzio ZAPPAROLI) e della Calderini - Sole 24 Ore (Antonella PEDRONI, Eugenio OCCHIALINI), fare il punto sulla situazione attuale relativa alla Collana Fauna d'Italia e valutare le prospettive future. In sintesi, i temi trattati e i punti essenziali emersi da questo incontro sono i seguenti:

#### 1. Situazione vendite e ristampa volumi

Calderini: i volumi da I a XXXVII sono pressoché esauriti. Ogni volume vende mediamente 100 copie/anno. Volumi Aphodiidae (XLI) e Amphibia (XLII) sono anche esauriti e andranno ristampati.

CSFI: i volumi potrebbero avere maggiore diffusione se si tenesse conto di un elenco di librai (perlopiù stranieri) a suo tempo inviata alla casa editrice; il CSFI si impegna ad aggiornare questa lista includendovi venditori italiani ed esteri e ad inviarla a Calderini quanto prima; la casa editrice ha manifestato molto interesse all'acquisizione di tale lista.

La Calderini manifesta il suo interesse a ristampare i voll. I-XXXVII, se non tutti, alcuni. A questo proposito chiede al CSFI che le vengano segnalati i volumi di maggior interesse.

Calderini sottolinea che il costo della ristampa di una copia (1 pezzo) è esorbitante (avendo ricevuto preventivi fino a 430 euro), sarebbe quindi opportuno produrre almeno 250 copie/volume, per un prezzo medio di 50 euro. I costi della ristampa varieranno ovviamente in base alle caratteristiche di ciascun volume; per conoscere il costo effettivo della ristampa sarà necessario uno specifico preventivo.

CSFI: si propone alla Calderini di mettere on-line, liberamente disponibili, i primi (10? 20?) volumi pubblicati, gli altri in produzione.

#### 2. Digitalizzazione della collana (volumi passati e futuri) e veste editoriale

Calderini: in base alle scelte tecniche che saranno adottate - pdf *statici*/pdf *dinamici* (es., con possibilità di ricerca del testo)/e-book - e in base ad una prima valutazione, i costi medi per pagina variano da 6 (pdf *statico*) a 7,5 euro (pdf *dinamico*). Calcolando che i voll. I-XLVIII contano in tutto ca 23.000 pagine, il progetto di digitalizzazione dell'intera serie potrebbe costare tra i 120.000-150.000 euro.

Calderini: la casa editrice manifesta comunque interesse a mantenere il formato cartaceo e di rendere disponibili agli Autori i pdf dei volumi ad alcuni anni (es., 5) dalla pubblicazione.

Calderini: al fine di ridurre i costi di stampa la casa editrice (insieme al comitato) potrebbe ripensare alcuni aspetti editoriali come tiratura (più limitata), eliminazione del colore, formato del volume/testo su due colonne, tipo di carta/rilegatura, ecc. Tali modifiche potrebbero portare ad una riduzione dei costi intorno al 10-20%; la casa editrice si impegna quindi a fornire quanto prima un elenco di opzioni che si potrebbero adottare.

#### 3. Copyright e rapporti con il MATTM

Calderini: la casa editrice si impegna a fornire la documentazione legale relativa al possesso del copyright sulla Collana (documentazione che poi il CSFI trasmetterà al MATTM, come da lui

richiesto nella riunione MTTM-CSFI del 23 gennaio u.s.). In virtù di questo copyright, la casa editrice esprime inoltre il proprio interesse a portare avanti la Collana Fauna d'Italia. Riguardo alle forme di finanziamento (MATTM o altri enti) la Calderini afferma di non avere preclusioni.

La casa editrice manifesta particolare interesse alla ipotesi di pubblicare un prossimo volume dedicato ai Cetacei.

#### 4. Rapporti con gli Autori

Al fine di evitare ritardi e consentire una più efficace programmazione delle uscite, la Casa editrice manifesta interesse a studiare la possibilità di offrire “contropartite” agli Autori come, ad esempio, sconti (non quantificati) e altre facilities (non specificate). L'argomento non è stato ulteriormente approfondito.

Attualmente, il Comitato è quindi in attesa di ricevere le proposte scritte sulle ipotesi di rapporto con l'Editore e copia dei documenti relativi ai “vecchi” rapporti Calderini-Accademia-Unione Zoologica.

Nel frattempo, il Comitato ha nuovamente richiesto al MATTM i previsti lotti di volumi (dal 38 al 46) in giacenza per la diffusione.

Inoltre, è stato formalizzato l'incarico di seguire a livello scientifico la pubblicazione di un volume fuori serie sui Passeriformi italiani, con le splendide tavole di Starnini, che sarà pubblicata da ISPRA (referente per il MATTM la dott. Luisa FARINA, referente per il CSFI il prof. Marzio ZAPPAROLI e referente scientifico il prof. Bruno MASSA).

Sempre per ISPRA, il CFSI ha poi partecipato a procedura negoziata per il “Servizio di revisione ed integrazione delle schede di monitoraggio ex-art. 17 della direttiva Habitat relative alle specie di interesse comunitario di invertebrati presenti in Italia”, nell'ambito di un programma di “Promozione della sinergia delle attività di ricerca in ambito faunistico, anche a supporto della rete degli osservatori regionali biodiversità, per l'attuazione della strategia nazionale per la biodiversità”. L'incarico per questo servizio è stato affidato al dott. Fabio STOCH.

Il CSFI aveva già partecipato al progetto PESI, come “focal point”. Attualmente, partecipa come “centro di eccellenza” al Network Nazionale per la Biodiversità, con le banche dati relative alle checklist ed a CK map. Come tale, ha avuto dal MATTM un proprio server. L'incarico per questo servizio è affidato al dott. Fabio STOCH ed il referente interno del CSFI è il prof. Marco OLIVERIO.

Lo stesso prof. OLIVERIO è referente per il volume Cetacea della Collana Fauna d'Italia, che è praticamente pronto e che è stato presentato ieri (7 giugno) al CSFI a Roma dagli editors stessi (Luigi CAGNOLARO, Bruno COZZI, Giuseppe NOTARBARTOLO DI SCIARA e Michela PODESTÀ. Si tratta di un volume di alta qualità e molto atteso.

Altri volumi in stato avanzato di preparazione sono relativi agli Imenotteri Sinfiti (Fausto PESARINI) e ai Tunicati Ascidiacei (R. BRUNETTI *et al.*): per entrambi il referente interno del CSFI è il prof. Sandro MINELLI.

Altre attività svolte dal CSFI in questo inizio del 2013 sono poi state:

- la compilazione dei questionari ISTAT e ERA (European Research Area);
- la valutazione, su richiesta del MATTM, di alcuni progetti di ricerca su specie in Direttiva Habitat, per la possibilità di prelievo o manipolazione in deroga al DPR 357/97.

Infine, la situazione finanziaria del CSFI è al momento discreta (con un attivo di circa 14.000,00 €).

#### 4) XXIV CONGRESSO NAZIONALE ITALIANO DI ENTOMOLOGIA

Il Presidente invita gli Accademici Gavino DELRIO e Ignazio FLORIS a presentare quanto è stato avviato per l'organizzazione in Sardegna del XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Dopo un'introduzione dell'Accademico G. DELRIO con la presentazione di Orosei (Nuoro), località scelta per il Congresso del 2014, l'Accademico I. FLORIS ha presentato il complesso alberghiero presso cui si propone di svolgere i lavori. Orosei è situata lungo la costa orientale del centro Sardegna in un contesto ambientale di rilevante interesse naturalistico. Il Congresso dovrebbe tenersi nella settimana dal 9 al 14 giugno 2014. La struttura individuata offre un confortevole soggiorno a tariffe contenute.

Si prevedono tre giornate di lavori scientifici e una gita sociale abbinata ad una escursione naturalistica.

Sono già stati avviati contatti con le istituzioni regionali e altri possibili enti finanziatori, con l'auspicio di poter ottenere un concorso alle spese riducendo le quote di partecipazione, soprattutto a carico dei più giovani. A conclusione dell'intervento l'Accademico G. DELRIO sollecita la costituzione di un Comitato Scientifico e auspica che i migliori contributi scientifici possano trovare un'adeguata collocazione editoriale in riviste entomologiche indicizzate e recensite a livello internazionale.

Segue una breve discussione.

Il Presidente si complimenta per il lavoro svolto e concorda sulla necessità di nominare al più presto, congiuntamente alla Società Entomologica Italiana, il Comitato Scientifico del Congresso.

#### 5) PREMIO OSELLA 2014

Il Presidente riferisce che con il reddito dei fondi messi a disposizione della Fondazione "Marco Osella" l'Accademia decide di bandire il Premio per il 2014. Il Premio consisterà nell'iscrizione d'ufficio da parte dell'Accademia al XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia [Orosei (NU) 9-14 giugno 2014], più un contributo di 1500 Euro come rimborso forfetario per spese di viaggio e soggiorno per l'intera durata del Congresso medesimo. La scadenza per la consegna della domanda e della documentazione richiesta è stata fissata al 30 settembre 2013. La Commissione esaminatrice, che verrà nominata dal Consiglio di Presidenza nella seduta precedente le Assemblee di novembre p.v., dovrà completare i lavori in tempo utile perché il vincitore del Premio possa essere proclamato nell'Assemblea Plenaria di febbraio 2014 con relativa consegna di quanto sopra indicato.

Il bando del concorso verrà tempestivamente e adeguatamente divulgato.

#### 6) VARIE ED EVENTUALI

Il Tesoriere Roberto NANNELLI informa che:

- a) non è ancora pervenuta comunicazione ufficiale di accettazione da parte del MIPAAF della domanda di finanziamento per l'attività culturale 2013 inoltrata dall'Accademia nel dicembre 2012; sono stati presi contatti informali con il Dipartimento delle Politiche di Sviluppo Economico e Rurale, Direzione Generale dello Sviluppo Rurale, delle Infrastrutture e dei Servizi del MIPAAF e ci è stata data notizia che la richiesta è stata accettata con assegnazione parziale di finanziamento. Entro breve tempo, dopo la firma del funzionario responsabile, dovrebbe arrivare comunicazione del decreto di assegnazione; purtroppo come negli anni precedenti non sarà possibile recuperare le spese sostenute in data anteriore al decreto.
- b) Pubblicazioni dell'Accademia:
  - in occasione delle attuali Assemblee vengono distribuiti il volume degli Atti, Rendiconti dell'Accademia, anno LX, 2012 e le due monografie (XXII e XXIII) realizzate con il contributo del MIPAAF relative alle Tavole Rotonde del febbraio, giugno e novembre 2012; i PDF delle pubblicazioni saranno messi in rete sul sito dell'Accademia.
  - Edizione aggiornata 2013 del volume "Allergologia e dermatologia entomologiche" pubblicato dall'Accademia nell'ambito della Scuola di Alta Formazione "Marcello La Greca"; finalmente dopo due anni di gestazione si è raggiunto il traguardo per la pubblicazione della seconda edizione del volume pubblicato per la prima volta nel 2006. La parte zoologica risulta integrata con un nuovo capitolo sui Pidocchi dell'uomo (realizzato da Michele MAROLI e Roberto NANNELLI) e da un capitolo sul veleno degli Imenotteri (realizzato da Barbara PANTERA ed Elisabetta FRANCESCATO). La parte medica è stata integrata con cinque nuovi capitoli (La scabbia, di Massimo GOLA e Collaboratori; Malattia di Lyme, di Alessandro BARTOLONI e Giampaolo CORTI; Anafilassi, di Oliviero ROSSI e Collaboratori; Epidemiologia dell'ipersensibilità al veleno di Imenotteri, di Marina MAURO e Cristoforo INCORVAIA; Estratti

allergeni di veleni di Imenotteri utilizzati in diagnostica e terapia, di Elisabetta FRANCESCATO e Barbara PANTERA; Diagnosi dell'allergia al veleno di Imenotteri, di Patrizia BONADONNA e Beatrice CARUSO) mentre altri tre capitoli sono stati aggiornati.

Il finanziamento per la composizione del volume è stato ricavato dall'introito del VI Corso di Allergologia e dermatologia entomologiche tenuto a Como nel maggio 2012, per le spese di stampa è stato utilizzato il Fondo "Marcello La Greca" che verrà prontamente reintegrato con i proventi della vendita del volume. Sono già stati presi contatti con tre case farmaceutiche ed una libreria di Milano per la vendita di un certo numero di copie. Il prezzo orientativo è di 90 Euro (comprensivo di IVA) mentre per l'acquisto di volumi da parte di Accademici verrà praticato un prezzo speciale di 50 Euro. Ad ognuno degli Autori che hanno contribuito alla realizzazione dell'opera verrà inviato un volume in omaggio.

Chiesta e ottenuta la parola l'Accademico Andrea BATTISTI riferisce che dal 19 al 22 settembre prossimi si terrà a Paluzza, in provincia di Udine, il "4<sup>th</sup> Annual Meeting of the European PhD Network in Insect Science".

La seduta dell'Assemblea Plenaria è tolta alle ore 13,00

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

## VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 15 - 16 NOVEMBRE 2013

Presiede il Vice-Presidente prof. Romano DALLAI  
Segretario verbalizzante: il Segretario prof. Piero CRAVEDI

### SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 15 novembre 2013 alle ore 14:00, a Firenze Cascine del Riccio Via Lanciola 12/a, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti:* M.V. COVASSI, R. DALLAI.

*Ordinari:* A. ALMA, S. BARBAGALLO, A. BINAZZI, P. CRAVEDI, G. DELRIO, G. GASPERI, B. GIORDANA, S. LONGO, C. MALVA, M. MAROLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, S. RAGUSA DI CHIARA, C. RAPISARDA, G. ROTUNDO, S. TURILLAZZI.

*Straordinari:* A. BATTISTI, M. BIONDI, P. BRANDMAYR, R. CERVO, M. COBOLLI, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, F. FRATI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, F. NAZZI, G. PELLIZZARI, A. RUSSO.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici:

*Emeriti:* A. ARZONE, P. BARONIO, G. BOLCHI SERINI, G. BRIOLINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, L. MASUTTI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOSECCHI, L. SANTINI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI. *Ordinari:* M.A. BOLOGNA, A. CASALE, M. MAZZINI, A. MINELLI, M. OLMI, R. POGGI, P.F. ROVERSI, V. SBORDONI, L. SÜSS, O. TRIGGIANI, A. VIGNA TAGLIANTI. *Straordinari:* P.A. AUDISIO, M. DACCORDI, E. DE LILLO.

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

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

*Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico*

Il Presidente Romano DALLAI apre la seduta Pubblica e invita l'Accademico Santi LONGO a coordinare i lavori.

- Accademico Santi LONGO: *introduzione*

Si susseguono gli interventi:

- Rita CERVO (Università di Firenze) - *"Comportamento sociale e riproduttivo del punteruolo rosso delle palme: conoscere meglio per contrastare questo flagello."*
- Alessio DE BIASE (Università di Roma "La Sapienza") - *"Analisi preliminari di variabilità e differenziamento genetico in popolazioni asiatiche e mediterranee di Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera Dryophthoridae)"*
- Matteo Montagna (Università di Milano) - *"Il microbioma associato a Rhynchophorus ferrugineus"*.
- Valeria FRANCARDI (C.R.A.-ABP Firenze) - *"Trappola autocontaminante con funghi entomopatogeni: una possibile strategia nel controllo di Rhynchophorus ferrugineus (Olivier) (Coleoptera Curculionidae)"*.
- Giuseppe MAZZA (C.R.A.-ABP Firenze) - *"Entomofagi e simbionti del Punteruolo rosso delle palme"*.
- Salvatore GUARINO (Università di Palermo) - *"Individuazione e applicazione di composti volatili repellenti nel controllo delle popolazioni del Punteruolo rosso delle palme"*.
- Pompeo SUMA (Università di Catania) - *"Metodi di monitoraggio delle infestazioni del Punteruolo rosso delle palme"*.
- Francesco PORCELLI (Università di Bari) - *"Mezzi e metodi di controllo integrato del Punteruolo rosso delle palme"*.

- Massimo CRISTOFARO (ENEA Roma) - "Controllo del Punteruolo rosso mediante la tecnica del maschio sterile (SIT): utopia o realtà?"
- Francesco PAOLI - (C.R.A.-ABP Firenze) - "Ultrastruttura dell'apparato riproduttore di *Rhynchophorus ferrugineus*".

Segue un'interessante discussione, al termine della quale la Seduta si conclude alle ore 17:30.

I testi delle relazioni verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2013 dell'Accademia

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

#### ASSEMBLEA PLENARIA

Presiede il Presidente prof. Romano DALLAI

Segretario verbalizzante: il Segretario prof. Piero CRAVEDI

Sabato 16 novembre 2013 alle ore 09:30, a Firenze Cascine del Riccio, Via Lanciola 12/A, come da convocazione del Presidente iniziano i lavori dell'Assemblea Plenaria.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti:* P. BARONIO, G. BRIOLINI, M.V. COVASSI, R. DALLAI, L. MASUTTI, L. SANTINI, M. SOLINAS.

*Ordinari:* A. ALMA, S. BARBAGALLO, A. BINAZZI, M.A. BOLOGNA, A. CASALE, P. CRAVEDI, G. DELRIO, G. GASPERI, B. GIORDANA, S. LONGO, C. MALVA, M. MAROLI, R. NANNELLI, M. OLMI, F. PENNACCHIO, R. POGGI, S. RAGUSA DI CHIARA, C. RAPISARDA, G. ROTUNDO, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI.

*Straordinari:* P.A. AUDISIO, A. BATTISTI, M. BIONDI, P. BRANDMAYR, M. COBOLLI, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, F. FRATI, P. LUCIANO, S. MAINI, F. NAZZI, G. PELLIZZARI, A. RUSSO, M. ZAPPAROLI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici:

*Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOSACCHI, S. ZANGHERI .

*Ordinari:* M. MAZZINI, A. MINELLI, G. NUZZACI, P.F. ROVERSI, O. TRIGGIANI.

*Straordinari:* R. CERVO, M. DACCORDI, E. DE LILLO, B. MASSA.

Viene discusso il seguente Ordine del Giorno:

- 1) Approvazione verbale sedute precedenti (7 e 8 giugno 2013)
- 2) Comunicazioni del Presidente
- 3) Proclamazione e consegna Diplomi nuovi Accademici Ordinari (Alberto ALMA, Giuliano GASPERI e Massimo OLMI)
- 4) XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (Orosei - NU, 2014)
- 5) Fauna d'Italia
- 6) Programma definitivo delle Sedute pubbliche per l'Anno Accademico 2014
- 7) Varie ed eventuali

- 1) APPROVAZIONE DEI VERBALI DELLE SEDUTE PRECEDENTI (7 E 8 GIUGNO 2013)

Vengono esaminati i verbali delle Sedute Pubbliche del 7 e 8 giugno 2013 e dell'Assemblea Plenaria dell' 8 giugno 2013, già inviati a suo tempo per posta elettronica agli Accademici, che vengono approvati all'unanimità.

## 2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente Romano DALLAI inizia comunicando la scomparsa dell'Accademico Onorario Zdenek Bouček e invita l'Assemblea ad osservare un minuto di raccoglimento. La notizia suscita partecipazione.

Il Presidente prosegue informando che a seguito del trasferimento del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università di Firenze presso la nuova sede di Sesto Fiorentino non sarà più possibile organizzare l'Assemblea dell'Accademia in via Romana 17.

Successivamente, su invito del Presidente, l'Accademico Roberto NANNELLI riferisce in merito alle pubblicazioni dell'Accademia.

Dallo scorso giugno è disponibile la seconda edizione del libro "Allergologia e dermatologia entomologiche" pubblicato nell'ambito dell'attività della Scuola di Alta Formazione "Marcello La Greca". Il libro curato dagli Accademici Roberto NANNELLI e Stefano TURILLAZZI in collaborazione con il medico allergologo Maurizio SEVERINO, risulta notevolmente incrementato sia nella parte zoologica, con due nuovi capitoli sul veleno degli Imenotteri e sui Pidocchi dell'uomo, sia nella parte medica con quattro nuovi capitoli e altri tre aggiornati con le più recenti conoscenze. Il libro sembra riscuotere un buon interesse da parte delle case farmaceutiche che hanno promesso di acquistare un certo numero di copie da diffondere ai medici allergologi.

Il coordinatore delle pubblicazioni dell'Accademia, Roberto NANNELLI, invita e sollecita i coordinatori delle Tavole Rotonde svolte dall'Accademia nel 2013 a richiedere urgentemente ai rispettivi relatori delle giornate culturali i testi dei loro interventi in quanto, allo stato attuale, sono pervenuti solo alcuni testi della Tavola Rotonda di febbraio, mentre la pubblicazione del volume degli Atti dell'Accademia deve essere conclusa entro la primavera del 2014 con la rendicontazione delle spese al MIPAAF che parzialmente sostiene le spese di stampa delle Monografie e del volume degli Atti dell'Accademia.

L'accademico S. BARBAGALLO, in prosecuzione della tematica sull'editoria di cui è stato ora riferito, dall'Accademico NANNELLI, chiede al Presidente di poter intervenire per una breve presentazione all'Assemblea di un trattato di Entomologia applicata appena pubblicato da Edagricole. Si tratta della seconda edizione, rivista e ampliata, del ben noto volume del Dott. Aldo POLLINI, già responsabile del settore entomologico dell'ex Osservatorio per le Malattie delle Piante di Bologna. L'opera si compone di oltre 1800 pagine ed è illustrata da quasi 3500 figure, derivanti dalla ricca fototeca professionale dello stesso Autore cui si rivolgono i compiacimenti degli Entomologi agrari e forestali per l'impegnativo lavoro; essa offre una rassegna completa degli insetti dannosi in Italia alle piante di interesse agrario, ornamentale e forestale, nonché di quelli infestanti le derrate alimentari. Per tali ragioni il trattato stesso rappresenta uno strumento di utile consultazione per quanti (professionisti, tecnici, agricoltori, studenti universitari) operano nel settore di competenza.

Il Presidente comunica che gli Accademici Francesco NAZZI e Francesco PENNACCHIO assieme ad alcuni altri autori hanno contribuito a una importante ricerca apparsa recentemente sui Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America con il titolo "Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees". PNAS, 110 (46): 18466-18471.

La Giornata Culturale su: "Contributo alla conoscenza dei Polineotteri basali: struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base ed applicativi" coordinata dagli Accademici Romano DALLAI e Stefano TURILLAZZI che si è svolta a Firenze l'11 ottobre scorso, ha suscitato interesse e ha avuto una buona partecipazione di Accademici e altri studiosi di Entomologia.

## 3) PROCLAMAZIONE E CONSEGNA DIPLOMI NUOVI ACCADEMICI ORDINARI (ALBERTO ALMA, GIULIANO GASPERI E MASSIMO OLM)

Il Presidente consegna i Diplomi di Accademico Ordinario ai neonominati Alberto ALMA, Giuliano GASPERI e Massimo OLM.

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

#### 4) XXIV CONGRESSO NAZIONALE ITALIANO DI ENTOMOLOGIA (OROSEI 2014)

L'Accademico Pietro LUCIANO, su invito del Presidente fornisce informazioni sull'organizzazione del prossimo Congresso Nazionale Italiano di Entomologia.

Il comitato Scientifico del Congresso ha deciso di adottare un filo conduttore comune per tutte le sessioni scientifiche, proponendo come tema generale "Interazioni fra insetti, ambiente e mezzi di controllo" e articolandolo in quattro tematiche specifiche:

- 1) Interazioni: strutture, funzioni, ecologia
- 2) Protezione integrata e post raccolta
- 3) Interazioni fra insetti e salute dell'uomo e degli animali
- 4) Specie alloctone e cambiamenti climatici. Sistematica e Biogeografia

Quanto prima è prevista l'attivazione del sito web del Congresso con tutte le informazioni.

#### 5) FAUNA D'ITALIA

Su invito del Presidente l'Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI riferisce sulla situazione del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia (CSFI).

Rispetto alla ampia e dettagliata relazione all'Assemblea di sabato 8 giugno 2013 non ci sono novità di rilievo. Il Comitato è in attesa di un incontro (già richiesto e sollecitato più volte) con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM), per un eventuale rinnovo dell'Atto di Intesa tra il MATTM ed il CSFI dell'aprile 2002 (già rinnovato nel 2008), sulla cui base si erano programmati i volumi previsti e realizzati entro il 2012.

Nel frattempo è stato consegnato al CSFI il volume Cetacea (Mammalia IV) della Collana Fauna d'Italia (Editors: Luigi CAGNOLARO, Bruno COZZI, Giuseppe NOTARBARTOLO DI SCIARA e Michela PODESTÀ) che sarà pubblicato direttamente dall'Editore Calderini-Il Sole 24 Ore e che è attualmente in fase di revisione (referente interno prof. Marco OLIVERIO).

Altri volumi sono in stato avanzato di preparazione o praticamente pronti, come quelli relativi ai Tunicati Ascidiacei (R. BRUNETTI, F. MASTROTOTARO) (referente interno prof. Sandro MINELLI), ai Rotiferi marini (G. MELONE, W. De SMET, D. FONTANETO, F. LEASI, C. RICCI) (referente interno prof. Marco CURINI-GALLETTI) ed agli Imenotteri Sinfiti (Fausto PESARINI) (referente interno prof. Sandro MINELLI).

#### 6) PROGRAMMA DEFINITIVO DELLE SEDUTE PUBBLICHE PER L'ANNO ACCADEMICO 2014

Il Presidente conferma che nel 2014 le Adunanze dell'Accademia si terranno il 21 e il 22 febbraio a Firenze, a giugno nell'ambito del XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (9-14 giugno a Orosei, NU, e il 14 e 15 novembre a Firenze. Il programma prevede anche una Giornata Culturale che verrà organizzata a Roma il 3 ottobre.

Nella seduta Pubblica di venerdì 21 febbraio è prevista la Tavola Rotonda coordinata dall'Accademico Enrico DE LILLO su "Gestione sostenibile di piante aliene invasive mediante i loro nemici naturali".

Sabato 22 febbraio l'Accademico Pietro BRANDMAYR presenterà la lettura su "Indicatori ambientali" e gli Accademici Mario SOLINAS e Giorgio NUZZACI terranno la commemorazione dell'Accademico Luigi DE MARZO.

Il XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (Orosei, 9-14 giugno) avrà come tema generale "Interazioni fra insetti, ambiente e mezzi di controllo" che verrà articolato in quattro aree tematiche specifiche.

La Giornata culturale del 3 ottobre, dedicata all'Accademico Mario COLUZZI, sarà coordinata dagli Accademici A.M. FAUSTO e M. MAROLI ed avrà come tema "Arthropod vectors of diseases in humans and domestic animals". L'evento si terrà a Roma presso l'Università degli Studi "La Sapienza".

Il venerdì 14 novembre l'Accademico Alberto ALMA coordinerà una Tavola Rotonda su "Insetti vettori di malattie delle piante".

Sabato 15 novembre il prof. Nunzio ISIDORO dell'Università politecnica delle Marche terrà

una Lettura su "Ultrastrutture di sensilli e ghiandole e l'Accademico Gavino DELRIO tratterà il tema: "Una vecchia diatriba dell'Entomologia: Berlese *versus* Silvestri".

Il Presidente evidenzia l'opportunità di programmare l'Attività dell'Accademia anche per il 2015 e rivolge pertanto a tutti gli Accademici l'invito a proporre argomenti da sviluppare.

Segue una partecipata discussione da cui emerge l'interesse per le seguenti tematiche:

Per febbraio gli Accademici Giorgio NUZZACI, Salvatore RAGUSA DI CHIARA e Roberto NANNELLI confermano la disponibilità a organizzare una Tavola Rotonda dedicata all'Acarologia. A completamento dell'argomento, nella mattinata del sabato, viene confermata la Lettura del prof. Harelabos TSOLAKIS, dell'Università di Palermo, su "Sistematica degli Acari Fitoseidi".

A giugno gli Accademici Pietro LUCIANO e Andrea BATTISTI propongono una Tavola Rotonda su: "Tecniche di lotta e di eradicazione dei fitofagi di interesse forestale" e una Lettura, da affidare a un collega straniero, su: "La lotta con le tecniche della confusione sessuale".

Per novembre l'Accademico Maurizio BIONDI si impegna a coordinare la Tavola Rotonda su: "La statistica nella ricerca entomologica: dall'analisi inferenziale ai modelli previsionali". La Lettura del sabato dell'Accademico Maurizio BIONDI sarà invece dedicata a: "Il fenomeno dell'endemismo nell'entomofauna italiana. Stato dell'arte, conservazione, gestione".

#### 7) VARIE ED EVENTUALI

Nessuna

La seduta dell'Assemblea Plenaria è tolta alle ore 10:30

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

#### ASSEMBLEA ORDINARIA

Presiede il Presidente prof. Romano DALLAI

Segretario verbalizzante: il Segretario prof. Piero CRAVEDI

Sabato 16 novembre 2013 alle ore 11:30, a Firenze Cascine del Riccio, Via Lanciola 12/A, come da convocazione del Presidente iniziano i lavori dell'Assemblea ordinaria.

Sono presenti gli Accademici:

*Emeriti:* P. BARONIO, G. BRIOLINI, M.V. COVASSI, R. DALLAI, L. MASUTTI, L. SANTINI, M. SOLINAS.  
*Ordinari:* A. ALMA, S. BARBAGALLO, A. BINAZZI, M.A. BOLOGNA, A. CASALE, P. CRAVEDI, G. DELRIO, G. GASPERI, B. GIORDANA, S. LONGO, C. MALVA, M. MAROLI, R. NANNELLI, M. OLMI, F. PENNACCHIO, R. POGGI, S. RAGUSA DI CHIARA, C. RAPISARDA, G. ROTUNDO, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici:

*Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, E. MELLINI, G. MINEO, R. MONACO, G. OSELLA, F. PEGAZZANO, M.M. PRINCIPI, L. RIVOSECCHI, S. ZANGHERI . *Ordinari:* M. MAZZINI, A. MINELLI, G. NUZZACI, P.F. ROVERSI, O. TRIGGIANI.

Viene discusso il seguente Ordine del Giorno:

- 1) Approvazione verbale della seduta precedente (8 giugno 2013)
- 2) Comunicazioni del Presidente
- 3) Esame e approvazione Bilancio preventivo anno finanziario 2014

- 4) Votazione per il rinnovo Consiglio di Presidenza triennio 2014-2016
- 5) Votazioni per nuovi Accademici Ordinari
- 6) Votazioni per nuovi Accademici Straordinari
- 7) Votazioni per conferma Accademici Straordinari in scadenza quinquennio 2008-2013
- 8) Varie ed eventuali

1) APPROVAZIONE DEI VERBALI DELLA SEDUTA PRECEDENTE (8 GIUGNO 2013)

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea Ordinaria dell'8 giugno 2013, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici, che viene approvato all'unanimità.

2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE.

Il Presidente informa che alla scadenza dei termini previsti per la partecipazione al Premio Osella 2014 sono pervenute all'Accademia le domande di tre concorrenti. Secondo quanto previsto dallo statuto si deve quindi procedere all'elezione dell'apposita Commissione giudicatrice composta da tre Accademici Ordinari quali membri effettivi e due Accademici Ordinari quali membri supplenti.

Dopo una breve discussione l'Assemblea elegge all'unanimità gli Accademici Ordinari Piero CRAVEDI, Barbara GIORDANA e Roberto POGGI come membri effettivi e gli Accademici Ordinari Marco Alberto BOLOGNA e Carmelo RAPISARDA quali membri supplenti. I risultati dei lavori della Commissione saranno sottoposti all'approvazione della prima Assemblea Ordinaria dell'anno accademico 2014.

3) ESAME E APPROVAZIONE BILANCIO PREVENTIVO ANNO FINANZIARIO 2014

Su invito del Presidente, il Tesoriere Roberto NANNELLI informa che nei primi giorni di ottobre i titoli obbligazionari sottoscritti nel 2011, con il fondo inalienabile dell'Accademia (50.000 Euro), erano scaduti e quindi il capitale era automaticamente confluito sul c/c dell'Accademia. Il 18 ottobre si è quindi avuto un incontro fra il Tesoriere, il Presidente e un funzionario finanziario della banca MPS che ha illustrato alcune possibilità d'investimento del fondo inalienabile dell'Accademia. Il Tesoriere e il Presidente hanno concordato il rinnovo triennale di titoli obbligazionari ordinari 2013-2016 della Banca MPS (con scadenza 18/11/2016) con rimborso 100% alla scadenza, rischio moderato, interesse lordo 3% e cedole semestrali accreditate sul c/c.

A riguardo del Bilancio preventivo 2014 il Tesoriere riferisce che all'inizio del mese di novembre è stata predisposta una bozza di bilancio che è stata inviata per e-mail a ciascuno dei componenti del Collegio dei Revisori dei Conti. Non essendo emersi rilievi è stato poi concordato con il Presidente del Collegio (Dr.ssa Adele DE LUCA) di ratificare il bilancio in una prossima riunione da tenere prima dell'Assemblea dell'Accademia del febbraio 2014, in cui dovrà essere ratificato anche il Bilancio consuntivo 2013.

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

Il Tesoriere illustra i diversi punti della bozza di Bilancio preventivo 2014.

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

4) VOTAZIONE PER IL RINNOVO CONSIGLIO DI PRESIDENZA TRIENNIO 2014-2016

Il Presidente introduce l'argomento ricordando che, come è stato sottolineato nelle comunicazioni dell'Assemblea Ordinaria dell'8 giugno 2013 l'art. 11 dello Statuto prevede che il Consiglio di Presidenza possa essere rieletto. In tale occasione il Presidente invita gli attuali

componenti del Consiglio ad esprimere l'eventuale disponibilità ad essere rieletti e tutti gli Accademici a segnalare eventuali auspicabili nuove candidature.

Il Presidente informa che non è pervenuta alcuna nuova candidatura e che gli attuali componenti del Consiglio di Presidenza hanno dichiarato la propria disponibilità ad essere rieletti per il triennio 2014-2016 nei rispettivi ruoli di Presidente (Romano DALLAI) Vice Presidente (Barbara GIORDANA), Tesoriere (Roberto NANNELLI), Segretario (Piero CRAVEDI).

Il Presidente, richiamati in particolare gli articoli 15 e 16 dello Statuto e l'art. 6 del Regolamento,

- constatato che l'Assemblea è nelle condizioni di poter deliberare, essendo presente, come previsto dal citato art. 15 dello Statuto, la maggioranza assoluta degli Accademici Ordinari,
- designati gli Accademici Marco A. BOLOGNA e Roberto POGGI quali scrutatori per questa e per le altre votazioni previste per la presente seduta,
- invita l'Assemblea a passare alle votazioni a scrutinio segreto, che danno i seguenti risultati.

a) **Votazione per la carica di Presidente**

Presenti votanti: 28. DALLAI ha ottenuto 26 voti; Schede bianche: 2.

In seguito alla votazione, L'Accademico ordinario Romano DALLAI è eletto Presidente

b) **Votazioni per la carica di Vice-Presidente**

Presenti votanti: 28. GIORDANA ha ottenuto voti 27; Schede bianche: 1.

In seguito alla votazione, l'Accademica Ordinaria Barbara GIORDANA viene eletta Vice-Presidente.

c) **Votazione per la carica di Segretario**

Presenti votanti: 28. CRAVEDI ha ottenuto voti 27; Schede bianche: 1.

In seguito alla votazione, l'Accademico Ordinario Piero CRAVEDI è eletto Segretario.

d) **Votazione per la carica di Tesoriere**

Presenti votanti: 28. NANNELLI ha ottenuto voti 27. Schede bianche: 1.

In seguito alla votazione, l'Accademico Ordinario Roberto NANNELLI viene eletto Tesoriere.

L'Assemblea accoglie l'esito delle votazioni con un caloroso applauso, seguito da brevi interventi dei neoeletti (Presidente, Vice-Presidente, Segretario e Tesoriere), per esprimere i più cordiali ringraziamenti agli Accademici elettori per la fiducia loro manifestata, e per ridichiarare la propria personale disponibilità a servire l'Accademia nel nuovo impegnativo mandato.

Su proposta del Presidente, l'Assemblea elegge per acclamazione gli Accademici Ordinari Pio Federico ROVERSI e Marco Vittorio COVASSI quali revisori dei conti effettivi e l'Accademico Stefano TURILLAZZI quale revisore supplente per il prossimo triennio.

## 5) VOTAZIONI PER ELEZIONI NUOVI ACCADEMICI ORDINARI

A norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Art. 7), a fronte di 7 posti disponibili per Accademico Ordinario sono pervenuti entro il 30 aprile 2013 le seguenti proposte per nuovi Accademici per essere votate nell'Assemblea Ordinaria di novembre 2013.

Quattro proposte per nuovi Accademici ordinari che riguardano gli Accademici Straordinari:

- Andrea BATTISTI presentato dagli Accademici Marco COVASSI, Vincenzo GIROLAMI e Luigi MASUTTI
- Pietro BRANDMAYR presentato dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Mario SOLINAS e Pio Federico ROVERSI
- Pietro LUCIANO presentato dagli Accademici Gavino DELRIO, Mario SOLINAS e Santi LONGO
- Stefano MAINI presentato dagli Accademici Maria Matilde PRINCIPI, Giovanni BRIOLINI e Mario SOLINAS

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

- a) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico straordinario Andrea BATTISTI. Come previsto dall'art. 12 dello Statuto l'Accademico Luigi MASUTTI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Andrea BATTISTI eletto e da proporre, a norma dell'art 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni Culturali e Ambientali per la nomina ad Accademico ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte del Presidente della Repubblica.

- b) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico straordinario Pietro BRANDMAYR. Come previsto dall'art. 12 dello Statuto l'Accademico Mario SOLINAS illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Pietro BRANDMAYR eletto e da proporre, a norma dell'art 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni Culturali e Ambientali per la nomina ad Accademico ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte del Presidente della Repubblica.

- c) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico straordinario Pietro LUCIANO. Come previsto dall'art. 12 dello Statuto l'Accademico Gavino DELRIO illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Pietro LUCIANO eletto e da proporre, a norma dell'art 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni Culturali e Ambientali per la nomina ad Accademico ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte del Presidente della Repubblica.

- d) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico straordinario Stefano MAINI. Come previsto dall'art. 12 dello Statuto l'Accademico Giovanni BRIOLINI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Stefano MAINI eletto e da proporre, a norma dell'art 14 dello Statuto, al Ministero dei Beni Culturali e Ambientali per la nomina ad Accademico ordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia da parte del Presidente della Repubblica.

#### 6) VOTAZIONI PER ELEZIONE NUOVI ACCADEMICI STRAORDINARI

A norma dello Statuto (Articoli 12 e 13) e del Regolamento (Art. 7), a fronte di 7 posti per Accademico Straordinario, sono pervenuti entro il 30 aprile 2013 le seguenti proposte per nuovi Accademici per essere votate nell'Assemblea Ordinaria di novembre 2013.

Tre proposte per nuovi Accademici Straordinari che riguardano:

- prof. Stefano COLAZZA presentato dagli Accademici Salvatore RAGUSA, Santi LONGO e Giuseppe ROTUNDO
- prof. Giuseppe GARGIULO presentato dagli Accademici Carla MALVA, Francesco PENNACCHIO e Mario SOLINAS
- prof. Nunzio ISIDORO presentato dagli Accademici Mario SOLINAS, Andrea BINAZZI e Pio Federico ROVERSI

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

- a) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del Prof. Stefano COLAZZA come previsto dall'art. 12 c.2 l'Accademico Salvatore RAGUSA DI CHIARA illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Stefano COLAZZA Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2013-2018.

- b) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del Prof. Giuseppe GARGIULO come previsto dall'art. 12 c.2 l'Accademica Carla MALVA illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Giuseppe GARGIULO Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2013-2018.

- c) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del Prof. Nunzio ISIDORO come

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

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Nunzio ISIDORO Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2013-2018.

7) VOTAZIONI PER CONFERMA ACCADEMICI STRAORDINARI IN SCADENZA QUINQUENNIO 2009-2013

Il Presidente informa che per l'Accademico Marco VANNINI è scaduto il quinquennio di appartenenza. Il prof. Marco VANNINI ha manifestato la sua intenzione di rinunciare a far parte dell'Accademia pertanto non si procede alla votazione per la conferma.

8) VARIE ED EVENTUALI

Nessuna

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

*Il Segretario*  
Piero CRAVEDI

*Il Presidente*  
Romano DALLAI

## IMPORTANZA DELLA BIOACUSTICA NELLA SISTEMATICA DEGLI ORTOTTERI

BRUNO MASSA (\*)

(\*) Dipartimento di Scienze agrarie e forestali, Università di Palermo, Viale Scienze 13, 90128 Palermo, Italy; bruno.massa@unipa.it  
Lettura tenuta nella Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 febbraio 2013.

### *Importance of bioacoustics in the systematic of Orthoptera*

In Italy 322 taxa (84.7%) out of a total of 380 (species and subspecies) Orthoptera emit a song; we know the song of 219 taxa (57.6% of total), while the song of 103 taxa is still unknown. Sound emission in Orthoptera occurs in different ways that involve wings, legs and other parts of the body. Generally, the male sings to attract the female, which approaches the male, but there are taxa where the female may reply with another song and others where only the female calls the male, which in turn approaches her. Songs recorded may be used as other morphological characters. Each scheme has its frequency and length, each gap has also its length and the number of syllables characterizes the whole stridulation. From mean and s.d. it is possible to carry out some statistics and compare songs of different populations of the presumed same taxon or songs of different related taxa. Small differences in the structure of file teeth (number of pegs, their height, curvature, distance, etc.) may change the sound produced. This should mean that if these changes are inherited, it is possible that different populations of one taxon may face an evolutionary changing in the relationships between emitted and heard songs. Some interesting examples on the importance of bioacoustics in the systematic of Orthoptera are here discussed.

KEY WORDS: Bioacoustics, recordings, stridulation, Ensifera, Caelifera

### INTRODUZIONE

Diversi ordini di insetti sono capaci di produrre suoni per differenti finalità: Orthoptera, Plecoptera, Hemiptera, Neuroptera, Coleoptera, Hymenoptera. La stridulazione degli insetti ha diverse possibili origini; in alcuni casi sembra un mezzo di difesa, in altri è da ritenersi uno dei numerosi caratteri soggetti a selezione sessuale (DARWIN, 1871). Nel caso delle api, è stato mostrato che la sottospecie *Apis mellifera cypria* effettua una stridulazione di difesa ad alta frequenza contro *Vespa orientalis* nei casi di attacchi da parte di quest'ultima (PAPACHRISTOFOROU *et al.*, 2008). Alcune specie di coleotteri, se disturbati, emettono un suono prodotto con modalità diverse, ma sempre coinvolgente la parte superiore dell'addome (ad es. WESSEL, 2006; PANNETON *et al.*, 2005, a proposito di *Polyphylla occidentalis*; ARNONE & MASSA, 2010, a proposito del gen. *Bolbelasmus* Boucomont, 1911). È ampiamente noto che le diverse specie di cicale (Hemiptera Homoptera) emettono suoni differenti (DROSOPOULOS *et al.*, 2006; QUARTAU & SIMÕES, 2006) e recentemente sono state descritte specie in base al loro canto (HERTACH, 2011); solo in alcuni casi sono stati trovati anche altri caratteri morfologici. Tuttavia, come vedremo, la stridulazione può essere anche il prodotto di altri tipi di pressioni selettive.

Gli ortotteri, grilli, locuste, cavallette sono certa-

mente gli insetti più noti per quanto riguarda le emissioni sonore, tanto che la bioacustica è una tecnica largamente diffusa da tempi remoti (cfr. VON HELVERSEN & ELSNER, 1977; HELLER & VON HELVERSEN, 1986; HELLER, 2006). Questa breve rassegna vuole portare all'attenzione degli entomologi una serie di esempi del ruolo che ha avuto la bioacustica, cioè lo studio dei suoni prodotti dagli animali, nella sistematica di questo ordine.

### QUALCHE INFORMAZIONE GENERALE SUI SUONI PRODOTTI DAGLI ORTOTTERI

GU *et al.* (2012) hanno segnalato e descritto il fossile di una specie di Tettigoniidae (*Archaboilus musicus*) risalente al Giurassico, le cui caratteristiche delle tegmine hanno rivelato che era in grado di emettere un suono ad una frequenza di 6,4 kHz e in base anche ai precedenti dati sintetizzati da HEADS & LEUZINGER (2011) è possibile ricostruire che i primi ortotteri canterini risalgono al Triassico (Fig. 1). Il canto si è evoluto poi, suddividendosi già in origine nelle sue diverse modalità di espressione, ampiamente dipendenti dalla morfologia stessa di questi insetti. Secondo JOST & SHAW (2006) la stridulazione alare e i timpani tibiali sono ancestrali negli Ensiferi e sono stati perduti più volte, soprattutto nei Gryllidae (Fig. 2).

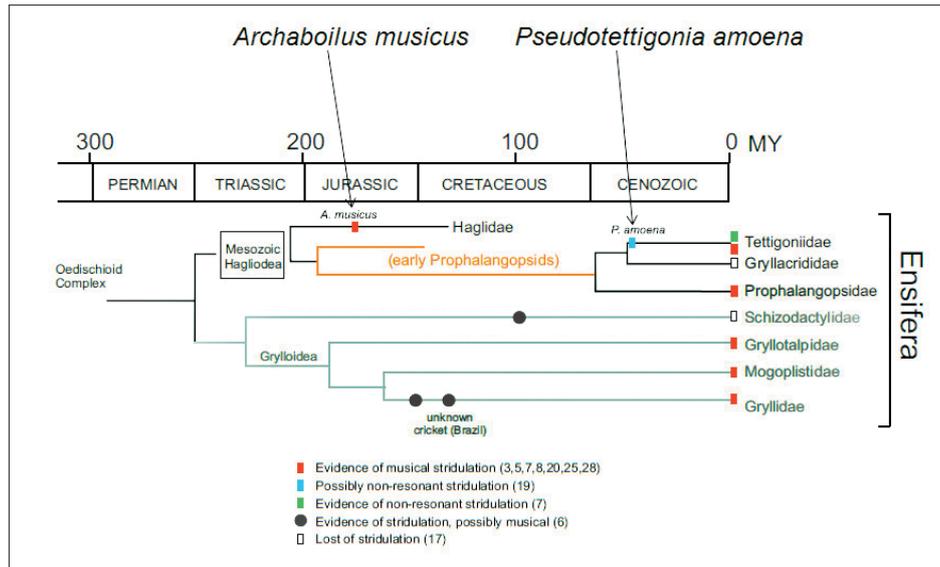


Fig. 1  
Ricostruzione temporale dei primi Ortoteri in cui si è evoluto un meccanismo per l'emissione di suoni (secondo HEADS & LEUZINGER, 2011 e GU *et al.*, 2012).

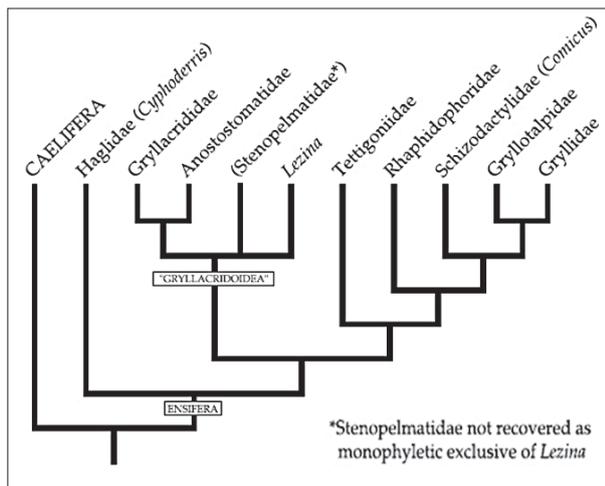


Fig. 2  
Versione semplificata delle relazioni filogenetiche degli Ensiferi, riscontrate dalle analisi di tre loci molecolari da parte di JOST & SHAW (2006).

Per suono si intende secondo l'Oxford Dictionary una sensazione prodotta all'orecchio dalla vibrazione dell'aria circostante. Per stridulazione invece si intende il suono prodotto dal meccanismo di strofinamento che coinvolge movimenti fra due parti specializzate del corpo, in maniera regolare e costante. Il canto degli ortoteri è un fattore importante nel comportamento di copula. Grazie al suono emesso, i partner si incontrano e si riconoscono; per questo motivo il canto è specie-specifico e numerose sono le specie che possono essere identificate tramite i loro suoni. In Italia, su un totale di 380 taxa (tra specie e sottospecie) 322 (84,7%) emettono suoni, 219 dei quali (57,6% del totale dei taxa) sono stati

recentemente descritti e presentati in un dvd nella sintesi di MASSA *et al.* (2012). La maggior parte delle specie produce suoni, sfregando un plettro contro una fila di dentelli o creste. Generalmente cantano solo i maschi, in alcuni gruppi le femmine possono rispondere al canto del maschio. Negli Ensiferi (Tettigonioidea e Grylloidea) il plettro e la fila di dentelli si trovano nelle ali anteriori; di conseguenza il suono è il risultato dei movimenti di apertura e chiusura delle ali (Figg. 6-7). Nei Phaneropterini e Barbitistini (Tettigonioidea) la fila di dentelli è sulla superficie inferiore dell'ala anteriore sinistra, nei grilli (Grylloidea) è sulla superficie inferiore dell'ala anteriore destra. Le tegmine dei Grylloidea sono pressochè identiche. *L'arpa* amplifica il suono emesso con lo sfregamento delle corrispondenti *pars stridens* e *plectrum*. In molti grilli (Grylloidea) il suono prodotto dalle ali anteriori risuona ad una frequenza molto bassa, facilmente individuabile. I loro suoni, come quelli della maggioranza degli uccelli, possono essere riprodotti fischiando. La fila stridulatoria influenza il movimento dell'ala e di conseguenza il suono prodotto. Piccole differenze nella struttura della fila stridulatoria (numero di rilievi, loro altezza, curvatura, distanza, etc.) possono cambiare il suono prodotto. Questo significa in pratica che se questi cambiamenti sono ereditati, è possibile che differenti popolazioni di un taxon possono andare incontro ad un cambiamento evolutivo nella relazione tra suoni emessi e uditi.

Il suono prodotto risulta acusticamente differente in base al numero di dentelli, alla velocità e alla sequenza di movimento, ma anche alla forma stessa delle ali anteriori. I grilli hanno una forma e strut-

tura delle ali anteriori che produce un tipo di suono con una frequenza molto stretta (tono puro); ciò consente un facile riconoscimento in natura e la possibilità di imitarli fischiando. Al contrario, i Phaneropterini e i Barbitistini emettono suoni ticchettanti, fruscianti o ronzanti all'interno di un'ampia gamma di frequenze, spesso ultrasoniche. Negli Ephippigerini (Tettigoniidae Bradiporynae) la stridulazione del maschio è spesso seguita da un canto di richiamo della femmina; questo duetto può durare a lungo, e più a lungo dura il corteggiamento, più probabile sarà la copula. Infine nei Gomphocerini (Acrididae), il gruppo di Celiferi più canterino durante il giorno, il suono è prodotto da una fila di dentelli del lato interno dei femori posteriori che sfrega contro le ali anteriori. In aggiunta, poiché ogni zampa ha una fila di dentelli, produce il suo modello di canto; il risultato della stridulazione deriva dalla combinazione delle due stridulazioni femore-ala (Fig. 3). La frequenza dominante è generalmente nella gamma dell'udibile. Alcune specie di *Glomeremus* (Gryllacrididae) mostrano microscopiche file stridulatorie, coperte da peli, lungo i lati del 2° e 3° tergite; essi sono probabilmente coinvolti nella stridulazione (Fig. 4). Certe specie di Phalangopsidae dell'Africa tropicale (Grylloidea) hanno tegmine molto ridotte, che ricoprono una ricca pelosità, probabilmente usata per emettere suoni (Fig. 5). In anni recenti, la disponibilità di registratori poco costosi ha consentito di ottenere delle buone registrazioni digitali di canti di specie rare o difficili da trovare, in precedenza sconosciuti, come quello di una *Lezina* (Gryllacridoidea) della Giordania, per la prima volta registrata da C. Roesti.

Altri tipi di suoni prodotti negli ortotteri sono la tremolazione (movimenti di tutto il corpo), la percussione (percussione delle zampe) e la crepitazione (suoni prodotti in volo). Nei Pamphagidae sono conosciuti differenti tipi di suoni; alcune specie producono suoni sfregando le tegmine ridotte a forma di squamette con l'ala atrofica saldata al metanoto; in alcuni Pamphagidae della sottofamiglia Thrinchinae, la parte superiore delle tibie intermedie ha una fila di dentelli o tubercoli che sono sfregati contro l'ala, producendo un suono che è amplificato dal timpano. Nei Pamphagidae Porthetinae africani, la regione costale delle tegmine (sia nelle specie in cui sono completamente sviluppate sia in quelle in cui sono ridotte) è allargata e coperta da una venatura densa, parallela, simile ad una fila stridulatoria. Inoltre, alcune specie producono suoni sfregando il femore e l'organo di Krauss. In *Trachypetrella*, è stata osservata un meccanismo di stridulazione femore-addome che comprende l'organo di Krauss e la fila stridulatoria sotto di esso (POPOV, 1997; ÜNAL 2007; MASSA, 2012). Alcune specie di

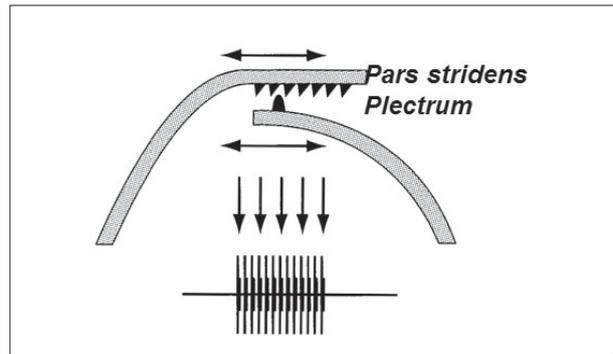


Fig. 3

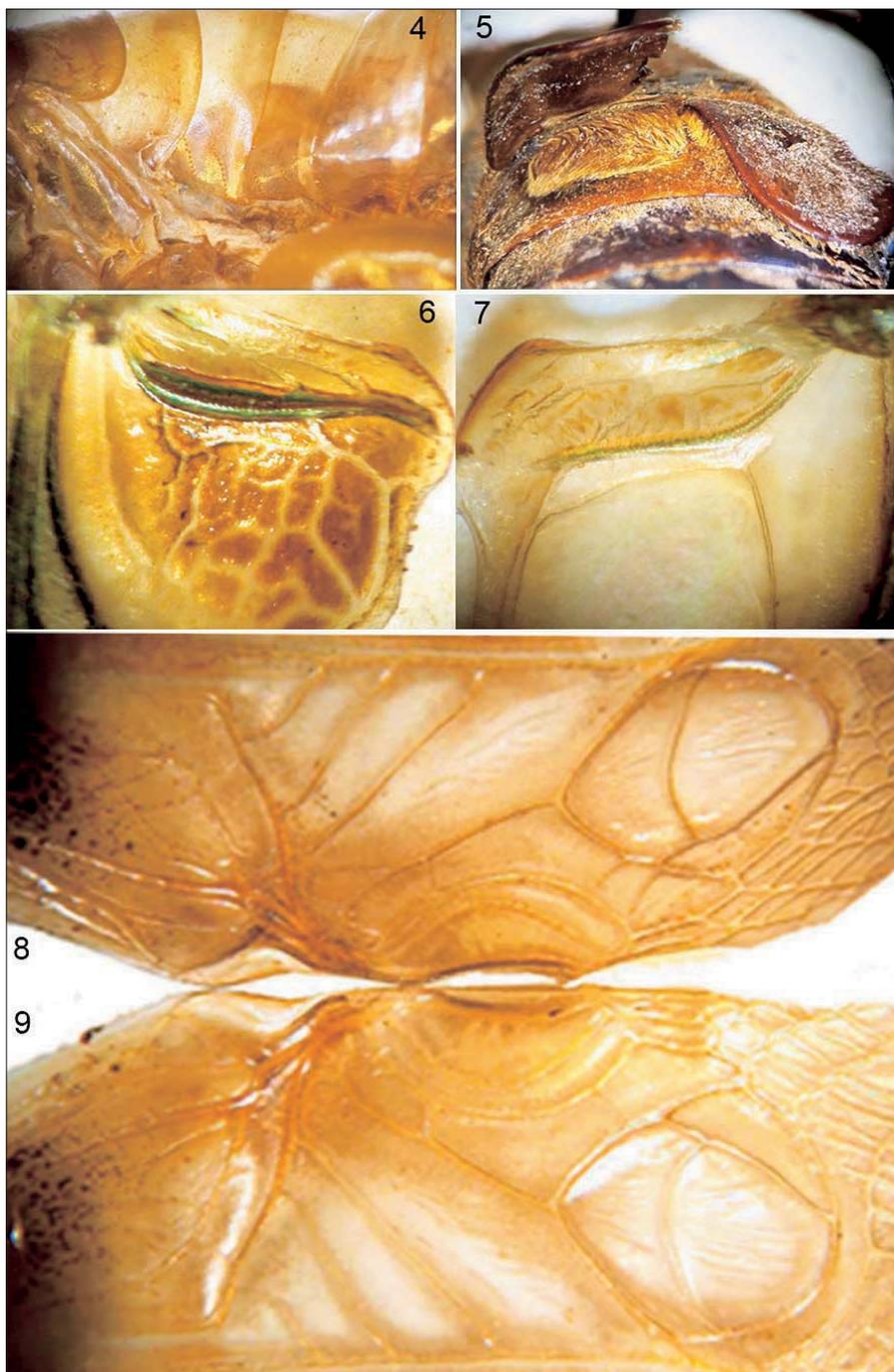
Meccanismo di stridulazione in molti Ortotteri, consistente nello sfregamento di due parti che sono denominate *pars stridens* e *plectrum* (dis. di B. Odé, in MASSA *et al.*, 2012).

Pamphagidae producono suoni sfregando strutture specializzate nella superficie interna dei femori posteriori con l'organo di Krauss (2° tergite addominale). I femori posteriori dei Pamphagidae hanno un lobo attenuato per l'articolazione femore-trocantere, che permette sia al femore sia al trocantere di ruotare sul loro asse più che negli Acrididae (dove il lobo è più prominente). Questo permette al margine inferiore della base del femore di entrare in contatto con l'organo di Krauss. È interessante osservare che c'è una relazione tra la presenza dell'organo di Krauss, del timpano e delle tegmine; le specie prive di tegmine e di organo di Krauss non presentano timpani.

#### TERMINOLOGIA USATA IN BIOACUSTICA

Le specie canterine hanno un organo uditivo (timpano) pari; negli Ensiferi è posto su entrambe le tibie anteriori, nei Celiferi su ciascun lato del primo segmento addominale. Ci sono testimonianze che alcune specie sono capaci di udire suoni di possibili nemici, ad esempio di pipistrelli o di parassiti (LEHMANN, 2003). I maschi emettono il *canto di richiamo* a cui può rispondere la femmina con suoni o movimenti, stimolando il maschio a continuare a cantare. Quando un maschio e una femmina sono vicini, il maschio può iniziare ad emettere un *canto di corteggiamento*, diverso da quello di richiamo (in particolare nei Gomphocerini) e possibilmente accompagnato da speciali movimenti del corpo o delle antenne. Infine, se due maschi si ritrovano a distanza ravvicinata, talora emettono un *canto di rivalità*, a sua volta diverso dai precedenti.

Nella bioacustica degli ortotteri si adotta la terminologia di RAGGE & REYNOLDS (1998): *canto di richiamo* (*calling song*): canto prodotto da un maschio isolato; *canto di corteggiamento* (*courtship song*): canto prodotto da un maschio quando si trova in



Figg. 4-9

Meccanismi di stridulazione. 4, Microscopiche file stridulatorie lungo i lati del 2° e 3° tergite di una specie di *Glomeremus* (Gryllacrididae). 5, Tegmine ridotte di una Phalangopsidae dell’Africa centrale, sotto cui è evidente una abbondante pelosità, probabilmente usata per emettere suoni. 6-7, Tegmina sinistra e destra di *Tessellana tessellata* per mostrare le parti coinvolte nell’emissione di suoni. 8-9, Tegmine sinistra e destra di *Brachytrupes megacephalus* per mostrare come nei Grylloidea le parti coinvolte nell’emissione di suoni siano identiche nelle due ali.

prossimità di una femmina; *canto di rivalità* (*rivalry song*): canto prodotto da due o più maschi della stessa specie in antagonismo tra loro; *sillaba* (*syllable*): suono generato da un movimento completo delle tegmine (apertura e chiusura) o dei femori posteriori (innalzamento e abbassamento); *macrosillabe* e *microsillabe* (*macrosyllables*, *microsyllables*): versi composti da sillabe di due diverse ampiezze in molte

specie di Ensiferi; *diplosillaba* (*diplosyllable*): sillaba in cui il suono è prodotto sia dal movimento di apertura che di chiusura delle tegmine (Ensiferi) o dal movimento di innalzamento o abbassamento dei femori posteriori (Celiferi). Ogni diplosillaba è composta da due emisillabe unidirezionali dello stesso movimento, es. apertura+apertura; *emisillaba* (*emisyllable*): suono prodotto da un movimento unidire-

zionale di apertura o di chiusura delle tegmine o di innalzamento o abbassamento dei femori posteriori; *verso* (*echeme*): la più elementare organizzazione di sillabe; *strofa* (*echeme sequence*): serie di versi che costituisce la struttura elementare del canto.

I suoni registrati possono essere usati esattamente come altri caratteri morfologici. Ciascuna strofa ha la sua frequenza e la sua lunghezza, ciascuna pausa ha anche la sua lunghezza e il numero di sillabe caratterizza l'intera stridulazione. I valori quindi possono avere media e deviazione standard e ad essi si può applicare senza problemi uno o più test statistici per controllare se le differenze sono significative e paragonare i suoni di popolazioni differenti dello stesso presunto taxon o i canti di differenti taxa strettamente imparentati fra loro.

Molte informazioni sulle modalità di studio e di elaborazione dei suoni prodotti dagli ortotteri sono riportate da FONTANA *et al.* (2002) e MASSA *et al.* (2012).

#### ALCUNI ESEMPI DI RICONOSCIMENTO DI SPECIE ATTRAVERSO LA BIOACUSTICA

*Natula averni* (Costa, 1855). Questo piccolissimo grillo fu descritto da Achille COSTA nel 1855 e riscoperto solo nel 2000 da SCHMIDT & HERMANN in Sardegna (segnalato come *Anaxipha longipennis*), e nel 2001 da GOROCHOV & LLORENTE nelle Canarie. ODÉ *et al.* (2012) hanno scoperto che probabilmente questo insetto è diffuso in tutto il Mediterraneo, ma possibilmente le popolazioni afferiscono a più di una specie. Una di queste specie potrebbe essere *Natula longipennis* (Serville, 1838), che fu descritta di Mauritius nell'Oceano Indiano. Le registrazioni italiane, spagnole (esclusa Maiorca) e della Corsica sembrano rientrare in un gruppo coerente dal punto di vista bioacustico, mentre sembra che le popolazioni turche, di Maiorca e soprattutto quelle tailandesi cantino in modo differente, mostrando un più elevato tasso di ripetizione delle strofe e un minore numero di sillabi per strofa (Figg. 10-12).

*Oecanthus pellucens* (Scopoli, 1763) ed *Oecanthus dulcisonans* Gorochov, 1993. Nel Mediterraneo *Oecanthus pellucens* era considerato il solo rappresentante degli Oecanthinae, ma nel 1993 GOROCHOV ha descritto *O. dulcisonans*, diffuso dalle Canarie all'Arabia. Anche se nella descrizione Gorochov non spiegava la ragione del nome *dulcisonans*, sembra evidente che dipende dal tipo di suono emesso. CORDERO *et al.* (2009) hanno recentemente mostrato le nette differenze nella bioacustica, individuando anche nuovi caratteri morfologici diagnostici.

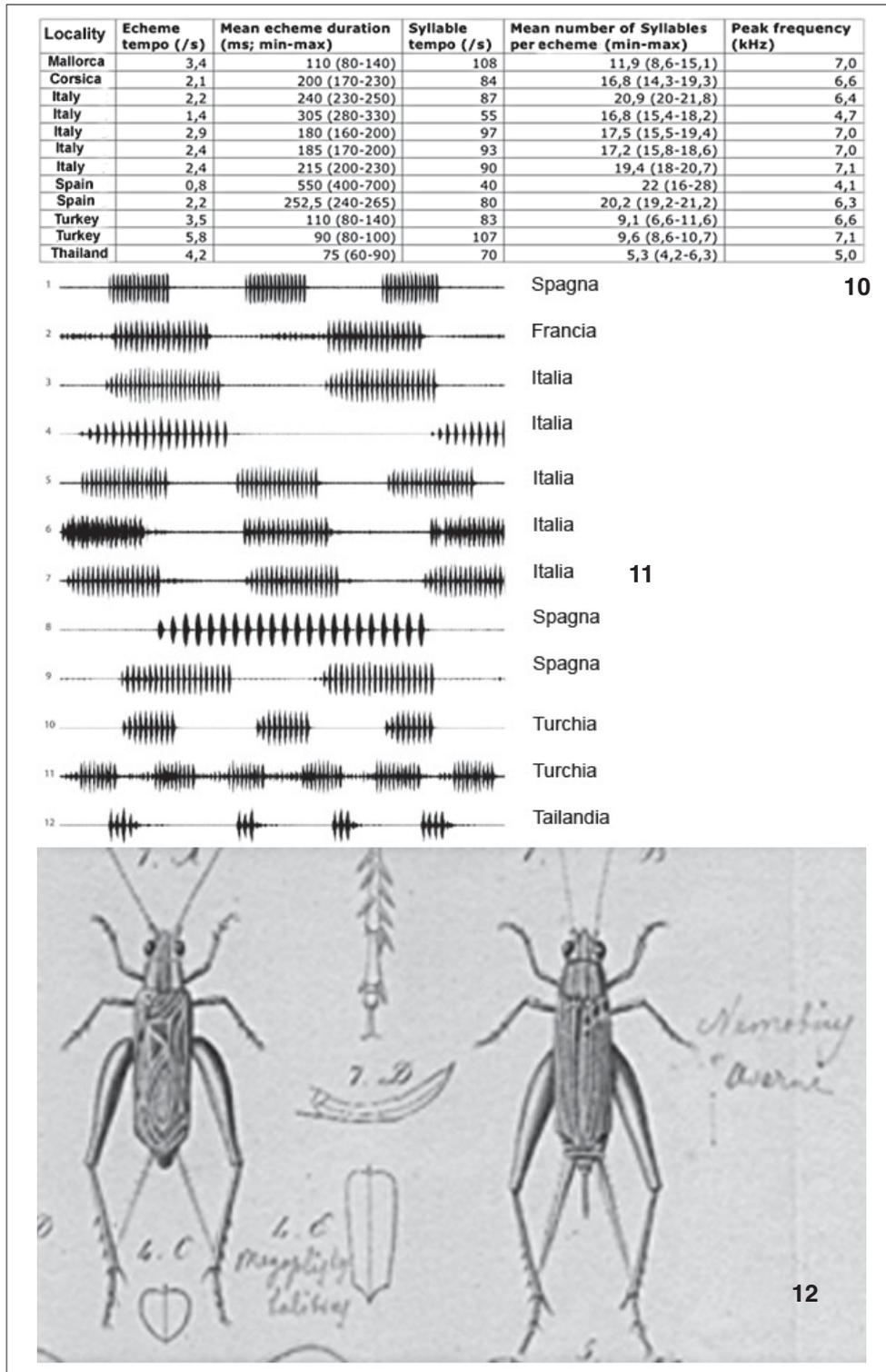
Genere *Parnassiana* Zeuner, 1941. Il genere

*Parnassiana* (Tettigoniidae Platycleidini), endemico della penisola Balcanica, include 13 specie. I maschi si identificano con i caratteri morfologici (cerchi e titillatori), ma anche grazie ai suoni prodotti. La struttura del suono è tipica del genere. Le specie geograficamente vicine emettono suoni abbastanza diversi; in molti casi non differisce la singola sillaba, ma il rapporto tra l'emissione della sillaba e l'intervallo di pausa (HELLER, 2006) (Figg. 13-14).

Acrididae Oedipodinae. I suoni prodotti dagli Oedipodinae sono meno noti di quelli dei Gomphocerinae. Essi cantano meno frequentemente e a frequenze più basse dei Gomphocerinae, ma il loro corteggiamento, che coinvolge i movimenti del corpo e delle antenne è molto interessante e utile per la tassonomia. Il corteggiamento tra maschio e femmina di *Sphingonotus rubescens* (Walker, 1870) è molto simile a quello di *S. caeruleans* (Linnaeus, 1767), ma la stridulazione emessa è lievemente diversa. Inoltre il corpo del maschio durante l'emissione del suono si solleva e le zampe posteriori sono mosse verso l'alto in modo irregolare; di tanto in tanto emette un suono e la femmina risponde sollevando il corpo e avvicinandosi ad esso. Il corteggiamento può durare anche un'ora prima della copula. Il corteggiamento di *S. caeruleans* è lievemente differente nei tempi e nei modi.

Interessanti casi di ibridazione. *Chorthippus albomarginatus* (De Geer, 1773) e *C. oschei* Helversen, 1986. Sono state osservate differenze di comportamento durante l'emissione dei canti in *Chorthippus albomarginatus* e *C. oschei*: nella fase C il primo è quasi immobile, mentre il secondo muove le zampe verso l'alto. L'ibrido mostra movimenti intermedi delle zampe e in aggiunta muove verticalmente le tibie (VEDENINA & VON HELVERSEN, 2003, 2009) (Fig. 15).

Ibridi del gen. *Decticus* Serville, 1831. La distribuzione delle specie brachittere appenniniche di *Decticus* è davvero peculiare. Le popolazioni di *D. aprutianus* Capra, 1936 sono spesso piuttosto sovrapposte con quelle di *D. verrucivorus* (Linnaeus, 1758), da cui restano isolate grazie alla differente bioacustica. Tuttavia, non tutte le popolazioni brachittere di *Decticus* che vivono negli Appennini appartengono alla specie *D. aprutianus*. Alcune popolazioni brachittere non emettono il tipico canto di *D. aprutianus*, ma quello di *D. verrucivorus*. Queste popolazioni non si sovrappongono con *D. verrucivorus* né con il vero *D. aprutianus*. Il canto del vero *D. aprutianus* è simile a quello di *D. loudoni* Ramme, 1933 e una popolazione trovata sul M. Pollino (Serra del Prete), morfologicamente ascrivibile a *D. aprutianus*, è caratterizzata da un peculiare canto, intermedio tra *D. aprutianus* e *D. loudoni* (MASSA *et al.*, 2012) (Fig. 16).

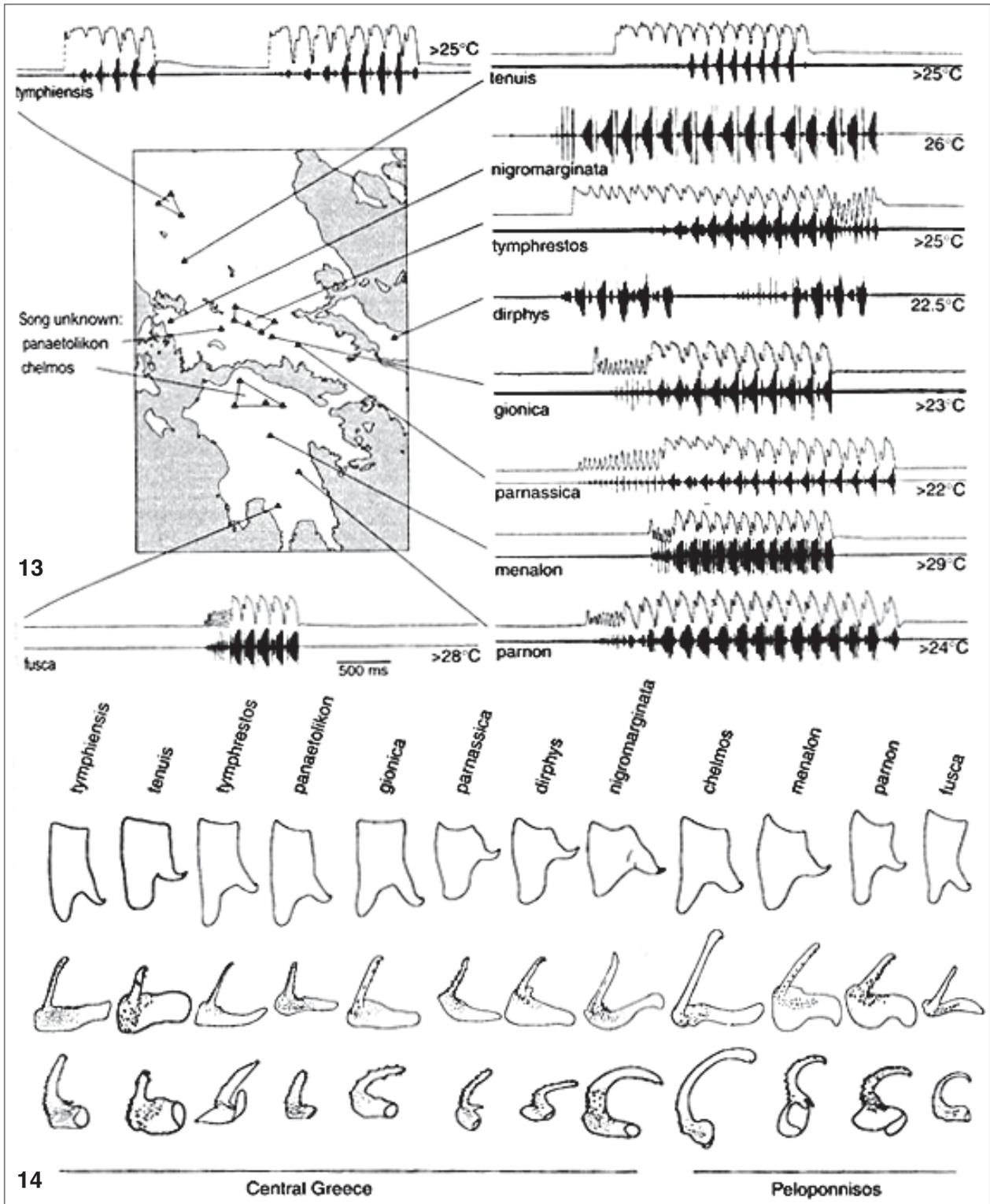


Figg. 10-12

Caratteristiche dei suoni emessi da diverse popolazioni ritenute appartenenti a *Natula averni* (10, in alto), loro oscillogrammi (11, al centro) (da ODÉ *et al.*, 2011, modificato) e disegno originale della specie (12, in basso) (da COSTA, 1855).

Difesa dai nemici. Primo passo per la complessità del suono: gli insetti che cantano dividono il loro canto in trilli e stridii. Ogni incremento nella complessità del segnale acustico è probabilmente costoso per il maschio; la preferenza da parte della femmina dovrebbe essere un bilancio tra i benefici immediati

e i futuri benefici del successo della prole. Tuttavia, alle volte i canti brevi assicurano di non essere trovati da predatori (ad es. i pipistrelli) e parassiti. Ad esempio, le specie del gen. *Poecilimon* Fischer, 1853 emettono suoni polisillabici e monosillabici, ma i suoni polisillabici possono essere facilmente rin-



Figg. 13-14

Oscillogrammi delle diverse specie di *Parnassiana* distribuite in diverse aree della Grecia (13, in alto), diversa forma dei loro cerci e titillatori maschili (14, in basso) (da HELLER, 2006, modificato).

tracciati dai parassiti. I possibili predatori notturni, oltre i pipistrelli ed alcuni uccelli notturni, comprendono un gruppo di ditteri della famiglia dei Tachinidae, le cui femmine sono in grado di localizzare i maschi degli ortotteri ensiferi attraverso la loro stridulazione e di deporre una minuscola lar-

vetta (detta *planipodium*) sul loro addome. È stato osservato che il tachinide *Therobia leonidei* sceglie in modo fonotattico l'ospite, che spesso è un tetti-gonide a stridulazione notturna del genere *Poecilimon*; la femmina del tachinide ha una maggiore probabilità di localizzare le specie di *Poecilimon* che emet-

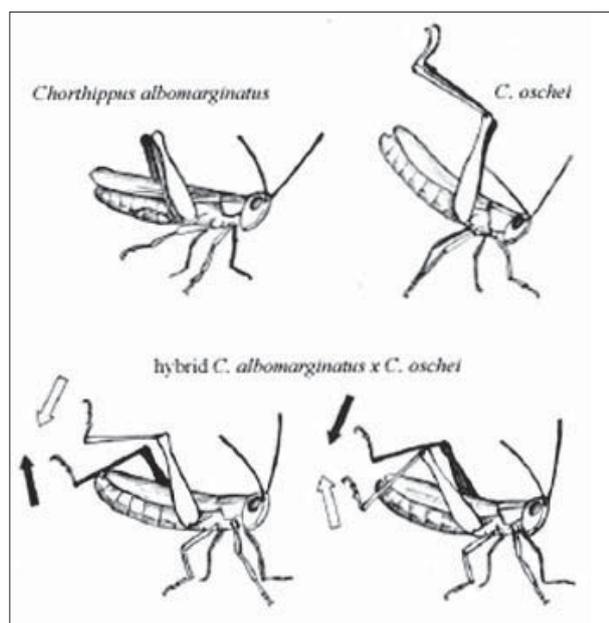


Fig.15

Differenze di comportamento durante l'emissione dei canti in *Chorthippus albomarginatus*, *C. oschei* e nel loro ibrido durante la fase C del corteggiamento: il primo è quasi immobile, il secondo muove le zampe verso l'alto, l'ibrido mostra movimenti intermedi delle zampe e in aggiunta muove verticalmente le tibie (da VEDENINA & VON HELVERSEN, 2009).

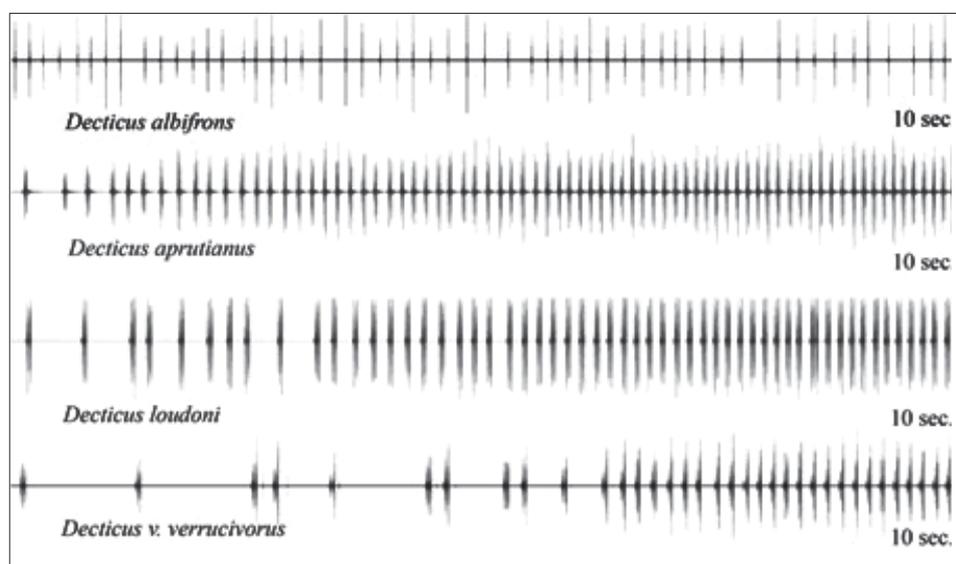


Fig.16  
Oscillogrammi delle diverse specie italiane di *Decticus* (da MASSA *et al.*, 2012).

tono suoni polisillabici, mentre ha difficoltà ad individuare la posizione di specie che emettono brevi suoni monosillabici. Questo rende le specie con stridulazione più manifesta ed impegnativa più vulnerabili nei confronti del parassita (LEHMANN, 2003). Tachinidi e loro ospiti sono attivi dal tramonto all'alba ed è molto probabile che sia avvenuta una serie di adattamenti da parte dei tettigtonidi per evitare un tasso troppo alto di parassitismo da parte dei tachinidi, in modo da mantenere un bilancio tra il livello di gradimento dei suoni da parte delle femmine e la pressione da parte dei parassiti.

#### RINGRAZIAMENTI

Ringrazio sinceramente i colleghi italiani, svizzeri, francesi, tedeschi e olandesi, che hanno messo a

disposizione alcune delle registrazioni qui riprodotte. Inoltre sono grato ai coautori del volume della Fauna d'Italia (Orthoptera) per la loro collaborazione: Paolo Fontana, Filippo Buzzetti, Roy Kleukers e Baudewijn Odé.

#### BIBLIOGRAFIA

- ARNONE M., MASSA B., 2010 – *A new species of Bolbelasmus Boucomont, 1911 (Insecta Coleoptera Geotrupidae) from Sicily (Italy)*. - *Naturalista sicil.*, 34: 401-414.
- CORDERO P.J., LLORENTE V., CORDERO P., ORTEGO J., 2009 – *Recognizing taxonomic units in the field - The case of the crickets Oecanthus dulcisonans Gorochoy 1993, and O. pellucens (Scopoli, 1763) (Orthoptera: Gryllidae): implications for their distribution and conservation in Southern Europe*. - *Zootaxa*, 2284: 63-68.
- COSTA A., 1855 – *Seguito a Grillidei*. In: Costa O.G. (ed.), *Fauna del Regno di Napoli*. Napoli: 29-52.
- DROSOPOULOS S., ELIOPOULOS E., TSAKALOU P., 2006 – *Is*

- Migration responsible for the peculiar geographical Distribution and Speciation based on acoustic Divergence of two Cicadas in the Aegean Archipelago.* In: Drosopoulos S. & Claridge M.F., *Insect Sounds and Communication*. Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York; pp. 219-226.
- FONTANA P., BUZZETTI F. M., COGO A., ODÉ B., 2002 – *Guida al riconoscimento e allo studio di cavallette, grilli, mantidi e insetti affini del Veneto*. Guide Natura/1 Museo Naturalistico Archeologico di Vicenza, 592 pp.
- GOROCHOV A.V., 1993 – *Grylloidea (Orthoptera) of Saudi Arabia and adjacent countries*. - Fauna of Saudi Arabia, 13: 79-97.
- GOROCHOV A.V., LLORENTE V., 2001 – *Estudio taxonómico preliminar de los Grylloidea de España (Insecta, Orthoptera)*. - Graellsia, 57 (2): 95-139.
- GU J.J., MONTEALEGRE-ZF., ROBERT D., ENGEL M.S., QIAO G.-X., REN D., 2012 – *Wing stridulation in a Jurassic katydid (Insecta, Orthoptera) produced low-pitched musical calls to attract females*. PNAS, doi:10.1073/pnas.1118372109/-/DCSupplemental.
- JOST M.C., SHAW K.L., 2006 – *Phylogeny of Ensifera (Hexapoda: Orthoptera) using three ribosomal loci, with implications for the evolution of acoustic communication*. - Molecular Phylogenetics and Evolution, 38: 510-530.
- HEADS S.W., LEUZINGER L., 2011 – *On the placement of the Cretaceous orthopteran Brauckmannia groeningae from Brazil, with notes on the relationships of Schizodactylidae (Orthoptera, Ensifera)*. - Zookeys, 77:17-30.
- HELLER K.-G., 2006 – *Song Evolution and Speciation in Bushcrickets*. In: Drosopoulos S. & Claridge M.F., *Insect Sounds and Communication*. Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York; pp. 137-151.
- HELLER K.-G., VON HELVERSEN D., 1986 – *Acoustic communication in phaneropterid bushcrickets: species-specific delay of female stridulatory response and matching male sensory time window*. - Behavioral Ecology and Sociobiology, 18: 189-198.
- HELVERSEN O. VON, ELSNER N., 1977 – *The stridulatory movement of acridid grasshoppers recorded with an optoelectronic device*. - Journal comparative Physiology, 122: 53-64.
- HERTACH T., 2012 – *Spectacular song pattern from the Sicilian Mountains: The new cicada species Cicadetta anapaistica sp. n. (Hemiptera: Cicadidae)*. - Zootaxa, 2771: 25-40.
- LEHMANN G.U.C., 2003 – *Review of biogeography, host range and evolution of acoustic hunting in Ormiini (Insecta, Diptera, Tachinidae), parasitoids of night-calling bushcrickets and crickets (Insecta, Orthoptera, Ensifera)*. - Zool. Anz., 242: 107-120.
- MASSA B., 2012 – *The role of the Krauss's organ in sound production in Pamphagidae (Caelifera: Orthoptera)*. - Italian Journal Zoology, 79: 441-449.
- MASSA B., FONTANA P., BUZZETTI F.M., KLEUKERS R., ODÉ B., 2012 – *Fauna d'Italia. XLVIII. Orthoptera*. Calderini ed., Bologna, 563+CCXIV pp.
- ODÉ B., KLEUKERS R., FORBICIONI L., MASSA B., ROESTI C., BOITIER E., BRAUD Y., 2011 – *In search of the most mysterious orthopteran of Europe: the Reed cricket Natula averni (Orthoptera: Gryllidae)*. - Articulata, 26 (1): 51-65.
- PANNETON B.E., SPRAGUE M.W., KALMUS G.W., CHARLES T.M., DANIEL H.J., 2005 – *Stridulatory organs in the Scarab Beetle Polyphylla occidentalis (Scarabaeidae: Coleoptera): an end and acoustic study*. - Journal of North Carolina Academy Science, 121: 134-144.
- PAPACHRISTOFOROU A., SUEUR J., RORTAIS A., ANGELOPOULOS S., THRASYVOULOU A., ARNOLD G., 2008 – *High frequency sounds produced by Cyprian honeybees Apis mellifera cypria when confronting their predator, the Oriental hornet Vespa orientalis*. - Apidologia, 39: 468-474.
- POPOV G.B., 1997 – *Arabian grasshoppers (Orthoptera): Families Pamphagidae (Eumastacoidea) and Pyrgomorphidae (Acridoidea)*. - Fauna of Saudi Arabia, 16: 111-168.
- QUARTAU J.A., SIMÕES P.C., 2006 – *Acoustic Evolutionary Divergence in Cicadas: the species of Cicada L. in southern Europe*. In: Drosopoulos S. & Claridge M.F., *Insect Sounds and Communication*. Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York; pp. 227-237.
- RAGGE D.R., REYNOLDS W.J., 1998 – *The songs of the grasshoppers and crickets of western Europe*. Harley Books & The Natural History Museum, London, 591 pp.
- SCHMIDT G.H., HERRMANN M., 2000 – *Occurrence and distribution of Orthopteroidea, Blattoptera, Mantodea, Phasmodea, and Dermaptera in Sardinia/Italy*. - Bollettino Società sarda Scienze naturali, 32: 83-128.
- ÜNAL M., 2007 – *Revision of the genus Glyphotmethis Bey-Bienko, 1951 (Orthoptera: Pamphagidae)*. - Zootaxa, 1581: 1-36.
- VEDENINA V.Y., VON HELVERSEN O., 2003 – *Complex courtship in a bimodal grasshopper hybrid zone*. - Behavioral Ecology and Sociobiology 54: 44-54.
- VEDENINA V.Y., VON HELVERSEN O., 2009 – *A re-examination of the taxonomy of the Chorthippus albomarginatus group in Europe on the basis of song and morphology (Orthoptera: Acrididae)*. - Tijdsch. Entomol., 152: 65-97
- WESSEL A., 2006 – *Stridulation in the Coleoptera - An Overview*. In: Drosopoulos S. & Claridge M.F., *Insect Sounds and Communication*. Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York; pp. 397-403.



## INSETTI E CAMBIAMENTO CLIMATICO

ANDREA BATTISTI (\*)

(\*) *DAFNAE-Entomologia, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova.*  
Lettura tenuta nella Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2013.

### *Climate change and insects*

The insect damage is frequently hypothesized to increase with climate change and globalization. Temporal and spatial dynamics of outbreaking insect populations, however, are characterized by feedback systems, often of a complicated nature. Thus, whether or not insect outbreaks will increase, or decrease, in the future needs to be analysed in the context of insect life history and population systems. It is important to understand outbreak risks because apparently strong positive effects of a changed climate on insect individuals' growth and survival, and thus potential positive population growth, may be countered by negative effects of other processes (e.g. predation/parasitism). In other words, the sum effect of climate change on the trophic interactions in the target population system will determine whether or not outbreaks will be more frequent, and more severe, under a different climate.

KEY WORDS: outbreak, range expansion, insect-plant relationships, natural enemies pullulazioni, espansione dell'areale, relazioni insetto-pianta, antagonisti naturali

### INTRODUZIONE

L'accumularsi di prove del cambiamento climatico negli ultimi decenni ha alimentato il dibattito e la ricerca in merito alle sue conseguenze ecologiche. I dati meteorologici confermano un aumento generale delle temperature e cambiamenti nei modelli di precipitazioni (SOLOMON *et al.*, 2007). L'aumento delle temperature ha comportato per gli insetti delle variazioni della distribuzione (PARMESAN *et al.*, 1999; BATTISTI *et al.*, 2005; HICKLING *et al.*, 2006), della fenologia (SPARKS e CAREY, 1995; SPARKS e YATES, 1997; WALTHER *et al.*, 2002; CLELAND *et al.*, 2007), della sincronia fenologica con le specie ospiti (VISSER *et al.*, 1998; VISSER e HOLLEMAN, 2001; DIXON, 2003; MEMMOTT *et al.*, 2007). Molto meno si sa circa le conseguenze per la dinamica delle popolazioni, ma sembra probabile che ci sarebbero effetti per alcune specie nel successo riproduttivo, nel ciclo biologico, nell'abbondanza media e nelle variazioni di abbondanza. Il cambiamento climatico influenza numerose caratteristiche dei sistemi atmosferici globali, ma in questa sede ci si concentra sulla temperatura, sia per i noti effetti sulle popolazioni di artropodi sia perché è la variabile per la quale le previsioni sono più robuste. Tuttavia, si considerano brevemente anche altre, numerose vie attraverso le quali il cambiamento climatico potrebbe influenzare gli insetti fitofagi.

Le popolazioni di insetti forniscono molti esempi di forti fluttuazioni in abbondanza e sono generalmente mantenuti a bassa densità da una combina-

zione di fattori, alcuni dei quali densità-dipendenti (sistemi di retroazione) e altri indipendenti della densità (effetti esogeni) (TURCHIN, 2003). Si assume inoltre che i disturbi stocastici possono a volte portare a deviazioni dalla densità di equilibrio, con ritorni verso l'equilibrio secondo meccanismi densità - dipendenti. Anche se non c'è consenso unanime sul perché alcune popolazioni superano la densità di equilibrio, è stato spesso ipotizzato che le condizioni atmosferiche possono innescare l'inizio di un focolaio (MATTSON e HAACK, 1987). Tali effetti potrebbero essere di tipo diretto (ad esempio, le temperature invernali che influenzano la sopravvivenza di insetti) o indiretto, attraverso effetti sulle interazioni con le piante ospiti e i nemici naturali (MARTINAT, 1987).

### EFFETTI DIRETTI

Gli insetti fitofagi, essendo generalmente poikilotermi, sono molto sensibili ai cambiamenti della temperatura (UVAROV, 1931). L'aumento delle temperature ha effetti diretti sui tempi di sviluppo degli insetti, e su svernamento, sopravvivenza, voltinismo e diapausa. Il tasso di sviluppo generalmente aumenta con l'aumentare della temperatura fino a un valore massimo, oltre il quale ci sono spesso forti aumenti nella mortalità associati a tassi di sviluppo decrescenti (UVAROV, 1931; VAN STRAALEN, 1983). Il tasso di sviluppo degli insetti delle zone temperate dovrebbe aumentare con il riscaldamento climatico

in quanto le temperature ambientali sono ben al di sotto di quelle che permettono i tassi massimi di alimentazione e di crescita (HODKINSON, 1999). L'aumento del tasso di sviluppo potrebbe portare a un aumento del voltinismo in specie multivoltine facoltative (TOBIN *et al.*, 2008), come previsto per gli scolitidi *Ips typographus* (DeGeer) (WERMELINGER e SEIFERT, 1998; FACCOLI, 2009; JONSSON *et al.*, 2009) e *Dendroctonus rufipennis* (Kirby) (BERG *et al.*, 2006). Recenti ricerche hanno evidenziato un aumento del voltinismo in specie di lepidotteri come conseguenza del riscaldamento climatico (ALTERMATT, 2010). La mortalità invernale si riduce con l'aumento delle temperature (AYRES e LOMBARDERO, 2000; TRAN *et al.*, 2007; JEPSEN *et al.*, 2008), anche se una ridotta copertura nevosa (e quindi una diminuzione di isolamento nei siti di svernamento al suolo) è in grado di invertire il modello (LOMBARDERO *et al.*, 2000a). Inverni più caldi possono consentire ad alcune specie di non entrare in quiescenza e continuare l'alimentazione e lo sviluppo durante un periodo che in precedenza era troppo freddo (BALE *et al.*, 2002). Ad esempio, le larve della processionaria del pino *Thaumetopoea pityocampa* (Denis et Schiffermüller) hanno una maggiore probabilità di sopravvivenza se le temperature invernali non scendono al di sotto specifiche soglie di alimentazione (BATTISTI *et al.*, 2005). Nel complesso, questo porterà a una maggiore sopravvivenza invernale di anno in anno (NEUVONEN *et al.*, 1999; FRIEDENBERG *et al.*, 2008; JEPSEN *et al.*, 2008), come riassunto da BALE e HAYWARD (2010) in una vasta rassegna sullo svernamento degli insetti e il cambiamento climatico.

#### EFFETTI INDIRETTI ATTRAVERSO LA PIANTA OSPITE

Ai fini di questa discussione ci si limita ai cambiamenti previsti nella fenologia della pianta ospite e agli stress abiotici che agiscono sulla pianta. Questi fenomeni possono potenzialmente influenzare le interazioni pianta - insetto sia quantitativamente sia qualitativamente. Il riscaldamento climatico sta già producendo un allungamento notevole della stagione di crescita (soprattutto in primavera) per gli ecosistemi a latitudini medio-alte (MENZEL *et al.*, 2006; MORIN *et al.*, 2009). Molte specie di insetti si sono evolute per abbinare la loro attività di alimentazione con determinati stadi di sviluppo della pianta ospite. In particolare, molte specie di insetti di alberi decidui si alimentano durante la primavera e l'inizio dell'estate quando possono sfruttare fogli giovani e nutrienti (FEENY, 1970; VAN ASCH e VISSER, 2007; SINGER e PARMESAN, 2010). Ad esempio, le larve del geometride *Epirrita autumnata*

Borkhausen si alimentano durante un breve periodo quando le foglie delle betulle sono in espansione e presentano un elevato potere nutritivo (AYRES e MACLEAN, 1987; RIIPPI *et al.*, 2002; Haukioja, 2003). Il mantenimento di questa sincronia dipenderà da come i controlli fisiologici degli insetti e delle loro piante ospiti rispondono alla temperatura (VITASSE *et al.*, 2009).

I metaboliti primari e secondari di piante legnose possono essere molto sensibili ai fattori ambientali (HERMS e MATTSON, 1992). Se gli alberi sono ragionevolmente ben abbinati a condizioni climatiche storicamente favorevoli, allora è inevitabile che il cambiamento climatico produrrà situazioni in cui gli alberi saranno sottoposti a stress abiotici. Le piante stressate subiscono intensi cambiamenti biochimici (KORICHEVA *et al.*, 1998a) che si ripercuotono sulla sopravvivenza e sulla riproduzione di insetti (AWMACK e LEATHER, 2002), anche se le conseguenze sulla dinamica della popolazione sono meno chiare (KORICHEVA *et al.*, 1998b). Prove sperimentali di stress su varie piante hanno prodotto risultati contrastanti: alcune specie rispondono positivamente, altre sono insensibili o rispondono negativamente (LARSSON, 1989; KORICHEVA *et al.*, 1998; JACTEL *et al.*, 2012). Tale variabilità potrebbe essere dovuta in parte alle risposte non lineari delle difese delle piante in relazione alla disponibilità di acqua e nutrienti (HERMS e MATTSON, 1992) e agli effetti differenziali delle condizioni ambientali sulle difese costitutive e indotte (LOMBARDERO *et al.*, 2000b).

#### EFFETTI INDIRETTI ATTRAVERSO I NEMICI NATURALI

##### *Predatori e parassitoidi*

I nemici naturali degli artropodi possono esercitare una forte pressione sulla dinamica di popolazione degli insetti fitofagi (HAWKINS *et al.*, 1997). Valutare la loro risposta al riscaldamento climatico, e capire le conseguenze per i sistemi di feedback densità-dipendente, è fondamentale per prevedere i possibili cambiamenti nelle frequenze degli attacchi (HOEKMAN, 2010). La distribuzione e l'abbondanza di nemici naturali, come quella delle loro prede, possono essere influenzati da effetti climatici diretti, ad esempio sulla sopravvivenza invernale (HUMBLE, 2006; HANCE *et al.*, 2007). La sensibilità alla temperatura potrebbe aumentare con il livello trofico (BERGGREN *et al.*, 2009), nel qual caso i nemici naturali sarebbero maggiormente influenzati rispetto degli erbivori di cui si nutrono, determinando una maggiore regolazione biologica (DAVIS *et al.*, 1998). Se gli antagonisti generalisti (ad esempio le formiche), riescono a controllare le popolazioni di fito-

fagi a livelli bassi di densità (BERRYMAN, 2002), un loro aumento dovrebbe tendere a ridurre le frequenze degli outbreaks e, viceversa, l'espansione di fitofagi in aree non occupate da nemici generalisti dovrebbe tendere ad aumentare la frequenza dei focolai.

Per parassitoidi e predatori di artropodi, la sincronia fenologica può influenzare la disponibilità di prede e le loro dimensioni al momento dell'attacco. I nemici naturali specializzati dovrebbero essere sotto forte selezione per seguire i cambiamenti fenologici delle loro prede, che potrebbe renderli meno suscettibili a divenire temporaneamente desincronizzati (KLAPWIJK *et al.*, 2010). Tuttavia, l'evoluzione e l'adattamento della fenologia sono poco conosciuti e quindi il risultato di questi cambiamenti nelle interazioni sono difficili da prevedere (FORREST E MILLER - RUSHING, 2010).

#### *Agenti patogeni*

I patogeni degli insetti, ad esempio funghi, batteri e virus, svolgono un ruolo importante nelle dinamiche di molte popolazioni (HAJEK, 1997; EL DRED *et al.*, 2008). Il tasso di infezione della maggior parte dei patogeni è fortemente dipendente dalla densità di prede e spesso appena rilevabile nelle popolazioni a bassa densità (OLOFSSON, 1989 e 1989b; ROY *et al.*, 2009). La temperatura può essere importante sia per il tasso di infezione sia per le risposte di difesa all'interno dell'ospite (CARRUTHERS *et al.*, 1992). Un optimum termico diverso per ospite e patogeno potrebbe portare a una situazione in cui le alte temperature favoriscono l'ospite, esaltando le risposte di difesa e limitando direttamente la crescita dei patogeni (BLANFORD e THOMAS, 1999). I funghi patogeni tendono ad essere favoriti da un aumento di umidità, soprattutto quando le temperature sono alte, ma non troppo alte (ALI *et al.*, 1995; FILOTAS *et al.*, 2006). Al di fuori del loro ospite, i virus poliedrici nucleari sono vulnerabili alle radiazioni UV, così che aumenti di radiazioni UV potrebbero influenzare il controllo esercitato su alcune popolazioni di insetti (WITT, 1984; OLOFSSON, 1989a e 1989b).

#### CONCLUSIONI

Gli effetti diretti del riscaldamento globale sugli insetti fitofagi saranno generalmente di tipo positivo, andando a incidere soprattutto sull'aumento della sopravvivenza invernale, su tassi di sviluppo più veloci e talvolta sull'aumento del numero di generazioni all'anno. Alcuni insetti potranno anche beneficiare di una maggiore frequenza di eventi stressanti per le piante ospiti: insetti che temono le difese costitu-

tive della pianta tenderanno a essere favoriti quando le condizioni consentono una maggiore crescita delle piante e quindi un declino del metabolismo secondario; insetti che sfruttano fogliame giovane, nutrizionalmente favorevole possono essere sensibili ai cambiamenti climatici all'inizio della stagione di crescita e alle temperature che influenzano sia i tassi di crescita vegetativa sia quelli di sviluppo degli insetti. E' tuttavia difficile prevedere se la fenologia rimarrà accoppiata o meno.

Il previsto aumento dell'attività dei nemici naturali di artropodi potrebbe portare a un'azione di regolazione più incisiva. Tuttavia l'entità dell'effetto dipenderà dalla strategia di attacco di predatori e parassitoidi in relazione agli ospiti. L'attività degli agenti patogeni dipenderà dalle variazioni dei livelli di umidità, oltre che da quelli della temperatura.

Un importante passo da considerare successivamente è come gli effetti climatici sugli individui si tradurranno in effetti sulle popolazioni (BROEKHUIZEN *et al.*, 1993). Le previsioni sulla dinamica delle popolazioni in un contesto di cambiamento climatico richiedono l'integrazione degli effetti diretti e indiretti, da sviluppare sia con modelli teorici sia con l'analisi di serie storiche di abbondanza, che iniziano ad essere disponibili per alcune specie.

#### RINGRAZIAMENTI

Lavoro svolto con il contributo dell'Università degli Studi di Padova, fondo 60%.

#### RIASSUNTO

È stato frequentemente ipotizzato che il cambiamento climatico e la globalizzazione possano essere connessi a un aumento del danno di insetti fitofagi, tuttavia mancano spiegazioni chiare sulle dinamiche spaziali e temporali delle fluttuazioni numeriche delle popolazioni di insetti, che sono normalmente regolate da complessi meccanismi di retroazione. La previsione di una variazione numerica delle popolazioni in seguito a cambiamenti climatici deve infatti tenere conto delle particolarità del ciclo biologico e della struttura delle popolazioni. E' importante tenere conto come alcuni effetti positivi sulla crescita e sulla riproduzione possano essere controbilanciati da una maggiore attività dei fattori di mortalità, quali ad esempio parassitoidi e predatori. Occorre infine considerare come gli effetti finali del cambiamento climatico sulle popolazioni di insetti dipendano dalla somma dei singoli effetti su ciascuno dei fattori coinvolti.

#### BIBLIOGRAFIA

ALI M.A., EL-KHOULY A.S., MOAWAD G.M., RAGAB G.M., 1995 – *Seasonal abundance of cabbage looper Trichoplusia ni as related to temperature, relative humidity and the nat-*

- ural incidence of a nuclear polybedrosis virus. - Acta Agron. Hung., 43: 331-339.
- ALTERMATT F., 2010 – *Climatic warming increases voltinism in European butterflies and moths*. - Proc. R. Soc. B – Biol. Sci., 277: 1281-1287.
- AWMACK C.S., LEATHER S.R., 2002 – *Host plant quality and fecundity in herbivorous insects*. - Ann. Rev. Entomol., 47: 817-844.
- AYRES M.P., LOMBARDEO M.J., 2000 – *Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens*. - Sci. Tot. Env., 262: 263-286.
- BALE J.S., HAYWARD S.A.L., 2010 – *Insect overwintering in a changing climate*. - J. Exp. Biol., 213: 980-994.
- BALE J.S., MASTERS G.J., HODKINSON I.D., AWMACK C.T., BEZEMER M., BROWN V.K., BUTTERFIELD J., BUSE A., COULSON J.C., FARRAR J., GOOD J.E.G., HARRINGTON R., HARTLEY S., JONES T.H., LINDROTH R.L., PRESS M.C., SYMRNIODIS I.D., WHITTAKER J.B., 2002 – *Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores*. - Glob. Ch. Biol., 8: 1-16.
- BATTISTI A., STASTNY M., NETHERER S., ROBINET C., SCHOPF A., ROQUES A., LARSSON S., 2005 – *Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures*. - Ecol. Appl., 15: 2084-2096.
- BERG E.E., HENRY J.D., FASTIE C.L., DE VOLDER A.D., MATSUOKA S.M., 2006 – *Spruce beetle outbreaks on the Kenai Peninsula, Alaska, and Kluane National Park and Reserve, Yukon Territory: Relationship to summer temperatures and regional differences in disturbance regimes*. - For. Ecol. Manag., 227: 219-232.
- BERGGREN Å., BJÖRKMAN C., BYLUND H., AYRES M.P., 2009 – *The distribution and abundance of animal populations in a climate of uncertainty*. - Oikos, 118: 1121-1126.
- BERRYMAN A.A., 2002 – *Population Cycles. The Case for Trophic Interactions*. - Oxford University Press.
- BLANFORD S., THOMAS M.B., 1999 – *Host thermal biology: the key to understanding host-pathogen interactions and microbial pest control?* - Agr. For. Entomol., 1: 195-202.
- BROEKHUIZEN N., EVANS H.F., HASSELL M.P., 1993 – *Site characteristics and the population-dynamics of the pine looper moth*. - J. An. Ecol., 62: 511-518.
- CARRUTHERS R.I., LARKIN T.S., FIRSTENCEL H., FENG Z.D., 1992 – *Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper*. - Ecology, 73: 190-204.
- CLELAND E.E., CHUINE I., MENZEL A., MOONEY H.A., SCHWARTZ M.D., 2007 – *Shifting plant phenology in response to global change*. - TREE, 22: 357-365.
- DAVIS A.J., JENKINSON L.S., LAWTON J.S., SHORROCKS B., WOOD S., 1998 – *Making mistakes when predicting shifts in species range in response to global warming*. - Nature, 391: 783-786.
- DIXON A.F.G., 2003 – *Climate change and phenological asynchrony*. - Ecol. Entomol., 28: 380-381.
- ELDRED B.D., DUSHOFF J., DWYER G., 2008 – *Host-pathogen interactions, insect outbreaks, and natural selection for disease resistance*. - Am. Nat., 172: 829-842.
- FACCOLI M., 2009 – *Effect of weather on Ips typographus (Coleoptera Curculionidae) phenology, voltinism, and associated spruce mortality in the Southeastern Alps*. - Env. Entomol., 38: 307-316.
- FEENY P., 1970 – *Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars*. - Ecology, 51: 565.
- FILOTAS M.J., VANDENBERG J.D., HAJEK A.E., 2006 – *Concentration-response and temperature-related susceptibility of the forest tent caterpillar (Lepidoptera : Lasiocampidae) to the entomopathogenic fungus Furia gastropachae (Zygomycetes : Entomophthorales)*. - Biol. Contr., 39: 218-224.
- FORREST J., MILLER-RUSHING A.J., 2010 – *Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution*. - Phil. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci., 365: 3101-3112.
- FRIEDENBERG N.A., SARKAR S., KOUCHOUKOS N., BILLINGS R.F., AYRES M.P., 2008 – *Temperature extremes, density dependence, and southern pine beetle (Coleoptera: Curculionidae) population dynamics in east Texas*. - Env. Entomol., 37: 650-659.
- HAJEK A.E., 1997 – *Ecology of terrestrial fungal entomopathogens*. - Adv. Micr. Ecol., 15: 193-249.
- HANCE T., VAN BAAREN J., VERNON P., BOIVIN G., 2007 – *Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective*. - Ann. Rev. Entomol., 52: 107-126.
- HAUKIOJA E., 2003 – *Putting the insect into the birch-insect interaction*. - Oecologia, 136: 161-168.
- HAWKINS B.A., CORNELL H.V., HOCHBERG M.E., 1997 – *Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations*. - Ecology, 78: 2145-2152.
- HERMS D.A., MATTSON W.J., 1992 – *The dilemma of plants: to grow or defend*. - Quart. Rev. Biol., 67: 283-335.
- HOEKMAN D., 2010 – *Turning up the heat: temperature influences the relative importance of top-down and bottom-up effects*. - Ecology, 91: 2819-2825.
- HUMBLE L.M., 2006 – *Overwintering adaptations in Arctic sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae) and their parasitoids: cold tolerance*. - Can. Entomol., 138: 59-71.
- JACTEL H., PETIT J., DESPREZ-LOUSTAU M-L., DELZON S., PIOUS D., BATTISTI A., KORICHEVA J., 2012 – *Drought effects on damage by forest insects and pathogens: a meta-analysis*. - Glob. Ch. Biol., 18: 267-276.
- JEPSEN J.U., HAGEN S.B., IMS R.A., YOCOZO N.G., 2008 – *Climate change and outbreaks of the geometrids Operophtera brumata and Epirrita autumnata in sub-arctic birch forest: evidence of a recent outbreak range expansion*. - J. An. Ecol., 77: 257-264.
- JONSSON A.M., APPELBERG G., HARDING S., BÄRRING L., 2009 – *Spatio-temporal impact of climate change on the activity and voltinism of the spruce bark beetle, Ips typographus*. - Glob. Ch. Biol., 15: 486-499.
- KLAPWIJK M.J., GROBLER B.C., WARD K., WHEELER D., LEWIS O.T., 2010 – *Influence of experimental warming and shading on host-parasitoid synchrony*. - Glob. Ch. Biol., 16: 102-112.
- KORICHEVA J., LARSSON S., HAUKIOJA E., 1998a – *Insect performance on experimentally stressed woody plants: A meta-analysis*. - Ann. Rev. Entomol., 43: 195-216.
- KORICHEVA J., LARSSON S., HAUKIOJA E., KEINÄNEN M., 1998b – *Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis*. - Oikos, 83: 212-226.
- LARSSON S., 1989 – *Stressful times for the plant stress - insect performance hypothesis*. - Oikos, 56: 277-283.
- LOMBARDEO M.J., AYRES M.P., AYRES B.D., REEVE J.D., 2000 a – *Cold tolerance of four species of bark beetle (Coleoptera:Scolytidae) in North America*. - Env. Entomol., 29: 421-432.
- LOMBARDEO M.J., AYRES M.P., LORIO P.L. JR., RUEL, J.J., 2000b – *Environmental effects on constitutive and inducible resin defences of Pinus taeda*. - Ecol. Lett., 3: 329-339.
- MARTINAT P.J., 1987 – *The role of climatic variation and weather on forest insect outbreaks*. In: Barbosa, P. and

- Schultz, J. C. (Eds.), *Insect Outbreaks* Academic Press, Inc., pp. 241-268.
- MATTSON, W. J., HAACK, R. A. 1987 – The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects. In: Barbosa P., Schultz J.C. (Eds.), *Insect Outbreaks* Academic Press, Inc., pp. 365-394.
- MEMMOTT J., CRAZE P.G., WASER M.W., PRICE M.V., 2007 – *Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions*. - *Ecol. Lett.*, 10: 710-717.
- MENZEL A., SPARKS T.H., ESTRELLA N., KOCH E., AASA A., AHAS R., ALM-KUBLER K., BISSOLLI P., BRASLAVSKA O., BRIEDE A., CHMIELEWSKI F.M., CREPINSEK Z., CURNEL Y., DAHL A., DEFILA C., DONNELLY A., FILELLA Y., JATCZA K., MAGE F., MESTRE A., NORDLI O., PENUELAS J., PIRINEN P., REMISOVA V., SCHEIFINGER H., STRIZ M., SUSNIK A., VAN VLIET A.J.H., WIELGOLASKI F.E., ZACH S., ZUST A., 2006 – *European phenological response to climate change matches the warming pattern*. - *Glob. Ch. Biol.*, 12: 1969-1976.
- MORIN X., LECHOWICZ M.J., AUGSPURGER C., O'KEEFE J., VINER D., CHUINE I., 2009 – *Leaf phenology in 22 North American tree species during the 21st century*. - *Glob. Ch. Biol.*, 15: 961-975.
- NEUVONEN S., NIEMELA P., VIRTANEN T., HOFGAARD A., BALL J.P., DANELL K., CALLAGHAN T.V., 1999 – *Climatic change and insect outbreaks in boreal forests: The role of winter temperatures*. - *Ecol. Bull.*, 47: 63-67.
- OLOFSSON E., 1989a – *Transmission agents of the nuclear polyhedrosis virus of Neodiprion sertifer (Hym, Diprionidae)*. - *Entomophaga*, 34: 373-380.
- OLOFSSON E., 1989b – *Transmission of the nuclear polyhedrosis virus of the European pine sawfly from adult to offspring*. - *J. Inv. Pathol.*, 54: 322-330.
- PARMESAN C., RYRHOLM N., STEFANESCU C., HILL J.K., THOMAS C.D., DESCIMON H., HUNTLEY B., KAILA L., KULLBERG J., TAMMARU T., TENNENT W.J., THOMAS J.A., WARREN M., 1999 – *Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming*. - *Nature*, 399: 579-583.
- RIIPI M., OSSIPOV V., LEMPA K., HAUKIOJA E., KORICHEVA J., OSSIPOVA S., PIHLAJA K., 2002 – *Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth, and accumulation of phenolics?* - *Oecologia*, 130: 380-390.
- ROY H.E., HAILS R.S., HESKETH H., ROY D.B., PELL J.K., 2009 – *Beyond biological control: non-pest insects and their pathogens in a changing world*. - *Ins. Cons. Div.*, 2: 65-72.
- SINGER M.C., PARMESAN C., 2010 – *Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: signal of climate change or pre-existing adaptive strategy?* - *Phil. Tr. R. Soc. B-Biol. Sci.*, 365: 3161-3176.
- SOLOMON S., QIN D., MANNING M., CHEN Z., MARQUIS M., AVERYT K.B., TIGNOR M., MILLER H.L., 2007 – *Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. - Intergovernmental panel on Climate Change, p. 996.
- SPARKS T.H., CAREY P.D., 1995 – *The responses of species to climate over 2 centuries - An analysis of the Marsham phenological record, 1736-1947*. - *J. Ecol.*, 83: 321-329.
- SPARKS T.H., YATES T.J., 1997 – *The effect of spring temperature on the appearance dates of British butterflies 1883-1993*. - *Ecography*, 20: 368-374.
- TOBIN P.C., NAGARKATTI S., LOEB G., SAUNDERS M.C., 2008 – *Historical and projected interactions between climate change and insect voltinism in a multivoltine species*. - *Glob. Ch. Biol.*, 14: 951-957.
- TRAN J.K., YLIOJA T., BILLINGS R.F., RÉGNIÈRE J., AYRES M.P., 2007 – *Impact of minimum winter temperatures on the population dynamics of Dendroctonus frontalis*. - *Ecol. Appl.*, 17: 882-899.
- TURCHIN P., 2003 – *Ecology: Evolution in population dynamics*. - *Nature*, 424: 257-258.
- UVAROV B.P., 1931 – *Insects and climate*. - *Tr. R. Entomol. Soc. London*, 79: 1-232.
- VAN ASCH M., VISSER M.E., 2007 – *Phenology of forest caterpillars and their host trees: The importance of synchrony*. - *Ann. Rev. Entomol.*, 52: 37-55.
- VAN STRAALEN N.M., 1983 – *Physiological time and time-invariance*. - *J. Theor. Biol.*, 104: 349-357.
- VISSER M. E., HOLLEMAN L.J.M., 2001 – *Warmer springs disrupt the synchrony of oak and winter moth phenology*. - *Pr. R. Soc. London B – Biol. Sci.*, 268: 289-294.
- VISSER M.E., VAN NOORDWIJK A.J., TINBERGEN J.M., LESSELLS C.M., 1998 – *Warmer springs lead to mistimed reproduction in great tits (Parus major)*. - *Pr. R. Soc. London B – Biol. Sci.*, 265: 1867-1870.
- VITASSE Y., DELZON S., BRESSON C.C., MICHALET R., KREMER A., 2009 – *Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden*. - *Can. J. For. Res.*, 39: 1259-1269.
- WALTHER G.R., POST E., CONVEY P., MENZEL A., PARMESAN C., BEEBEE T.J.C., FROMENTIN J.M., HOEGH-GULDBERG O., BAIRLEIN F., 2002 – *Ecological responses to recent climate change*. - *Nature*, 416: 389-395.
- WERMELINGER B., SEIFERT M., 1998 – *Analysis of the temperature dependent development of the spruce bark beetle Ips typographus (L) (Col, Scolytidae)*. - *J. App. Entomol.*, 122: 185-191.
- WITT D. J., 1984 – *Photoreactivation and ultraviolet-enhanced reactivation of ultraviolet-irradiated nuclear polyhedrosis virus by insect cells*. - *Arch. Virol.*, 79: 95-107.

## LE STRUTTURE ANNESSE ALL'APPARATO RIPRODUTTORE DEGLI INSETTI DI INTERESSE AGRARIO E SANITARIO: MORFOLOGIA E FUNZIONE

ANNA MARIA FAUSTO (\*)

(\*) Dipartimento per l'Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF) Università degli Studi della Tuscia Blocco D-Largo dell'Università, s.n.c. 01100 Viterbo; fausto@unitus.it  
Lettura tenuta nella Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2013.

### *The reproductive accessory glands in insects of agricultural and medical importance: morphology and function*

In insects, the efficiency of the reproduction often involves the participation of secretions, produced by glandular structures associated with gonads and genital ducts. These glands, which directly assist the reproductive process, have been called "accessory sex glands" or "reproductive accessory glands". In line with the huge morphological diversity in insects, it is not surprising to find a wide range of structures and functions among the reproductive accessory glands. Over the last two decades of the twentieth century, most of the works mainly deal with the morphological aspects of these structures, with particular attention to their specific functions and, sometimes, their endocrine regulation. Today these structures are extensively studied using multidisciplinary approaches, particularly in species of economic interest with the aim of developing new methods for population control. In this work, the accessory sex glands of the most relevant species of insects of medical and agricultural importance have been examined from morphological and functional point of view and revised in the light of the results of recent researches.

KEY WORDS: accessory sex glands, insect reproduction, reproductive efficiency, insect pest control, ultrastructure

### INTRODUZIONE

Negli insetti, l'efficienza riproduttiva è legata anche alla presenza di secrezioni elaborate da strutture ghiandolari annesse all'apparato riproduttore. In linea con la grande diversità degli insetti, queste ghiandole mostrano un'enorme diversificazione, sia morfologica che funzionale, che ne rende del tutto arbitraria ogni forma di classificazione. Pertanto, la dizione "ghiandole sessuali accessorie" (ADIYODI & ADIYODI, 1975), o "strutture annesse all'apparato riproduttore" (GILLOTT, 2003) raggruppa tutte le formazioni ghiandolari, più o meno complesse, presenti nei diversi tratti dell'apparato riproduttore, i cui prodotti assistono direttamente il processo riproduttivo negli insetti. Negli ultimi due decenni del XX secolo, gli aspetti morfologici ed ultrastrutturali di queste strutture sono stati oggetto di numerosi studi, i cui risultati sono stati raccolti e discussi in varie reviews (ADIYODI-ADIYODI, 1975; LEOPOLD, 1976; GILLOTT, 1988, 2003; CHEN, 1984; DAVEY, 1985; KAULENAS, 1992). Successivamente, l'attenzione della ricerca è stata maggiormente rivolta alle funzioni dei prodotti ghiandolari, largamente studiati utilizzando approcci multidisciplinari. Molti degli studi più recenti hanno riguardato

specie di interesse agrario e sanitario, con la finalità di trarne informazioni utili alla messa a punto di nuove metodologie per ridurre l'efficienza riproduttiva e controllare l'espansione delle popolazioni naturali. In questo ambito, gran parte degli studi attuali sono volti all'individuazione ed all'analisi delle componenti dei secreti delle diverse strutture ghiandolari associate all'apparato riproduttore. In particolare, l'attenzione dei ricercatori è fortemente focalizzata sui numerosi peptidi del liquido seminale che esplicano molte delle loro funzioni agendo sulla fisiologia e sul comportamento delle femmine (DOTTORINI *et al.*, 2007; SIROT *et al.*, 2008; BAER *et al.*, 2009; SOUTH *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2012; SCOLARI *et al.*, 2012; BALDINI *et al.*, 2012, 2013). In questo lavoro viene presentata una breve panoramica delle strutture più studiate dal punto di vista morfologico e funzionale fra quelle annesse all'apparato riproduttore femminile e maschile in insetti di interesse agrario e sanitario. In particolare, sono oggetto di attenzione le ghiandole accessorie *sensu scripto* in cui le conoscenze acquisite sono più complete e dettagliate e che, alla luce di recenti risultati, potrebbero aprire la strada a nuovi approcci nella ricerca di metodologie innovative per il controllo e la gestione delle popolazioni.



## LE STRUTTURE ANNESSE ALL'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE

L'apparato riproduttore femminile degli insetti consiste principalmente di ovari pari (nella maggior parte dei casi in numero di due), ovidotti pari, ovidutto comune, spermateca e vagina o borsa copulatrice. Ciascuna di queste parti svolge ruoli diversi che possono essere raggruppati in tre ambiti funzionali più importanti:

- formazione, maturazione e trasporto del gamete femminile;
- ricezione e immagazzinamento degli spermatozoi (in certi casi per periodi considerevolmente lunghi);
- coordinazione di tutti quegli eventi che porteranno alla fecondazione ed all'ovideposizione.

Lo svolgimento di queste funzioni spesso prevede l'intervento di sostanze secrete da cellule specializzate, singole o organizzate in strutture complesse. Sulla base della loro posizione lungo l'apparato riproduttore, le ghiandole annesse possono essere raggruppate nelle seguenti categorie:

- a) Ghiandole delle gonadi (di origine mesodermica).
- b) Ghiandole dei dotti (di origine mesodermica o ectodermica).
- c) Ghiandole della spermateca.
- d) Ghiandole riproduttive accessorie (*sensu stricto*).

In questo lavoro viene focalizzata l'attenzione sulla morfologia e sulle principali funzioni delle formazioni ghiandolari più studiate in specie di interesse agrario e sanitario, in particolare nell'ambito delle categorie c) e d).

Le ghiandole associate alla spermateca sono state oggetto di grande attenzione, visto il loro attivo coinvolgimento nelle funzioni svolte dalla spermateca. Come è noto, le spermateche hanno il compito principale di accogliere e conservare (anche per lunghi periodi) gli spermatozoi, di facilitare la deposizione delle uova, e sono coinvolte nei meccanismi di selezione sessuale *postmating*, meglio conosciuti come "scelta femminile criptica". È stato dimostrato che le sostanze secrete dalle ghiandole accessorie contribuiscono a mantenere un corretto equilibrio di ioni a livello del lume della spermateca, il cui ambiente ipertonico gioca un ruolo chiave nel conservare a lungo termine gli spermatozoi (AL-LAWATI *et al.*, 2009). In alcuni casi, come nella psilla del lauro, *Trioza alacris* (Hemiptera, Psylloidea), i secreti ghiandolari sono implicati nella formazione di *spermatodose*, una forma particolare di spermatofora formata nel tratto genitale femminile (MARCHINI *et al.*, 2012).

Nelle specie in cui la spermateca perde la sua funzione primaria di contenimento e mantenimento di spermatozoi, le ghiandole spermatecali assumono ruoli tipici delle ghiandole riproduttive accessorie *sensu stricto*, per cui la spermateca viene definita "pseudospermateca". Un esempio documentato di questa situazione si ha in *Stephanitis pyrioides* (Heteroptera, Tingidae) in cui la secrezione di queste ghiandole ha probabilmente un ruolo nel facilitare la deposizione delle uova e nella protezione delle uova deposte da fattori ambientali abiotici o biotici (quali predatori, parassiti o microrganismi) (MARCHINI *et al.*, 2010).

Le ghiandole accessorie femminili *sensu stricto*, spesso denominate "colleteriali" o "cement glands", si sono differenziate ed evolute indipendentemente nei diversi taxa di insetti, risultando a volte non omologhe all'interno dello stesso ordine. Generalmente hanno un'origine ectodermica e sboccano nella camera genitale o nella vagina (BÜNING, 1994; CHAPMAN, 1998), ma in alcuni casi sono mesodermiche e si collocano lateralmente agli ovidotti, come avviene nelle cavallette (CHAPMAN, 1998) o nei flebotomi (FAUSTO *et al.*, 1997). Sebbene la morfologia delle ghiandole accessorie femminili possa variare da una specie all'altra, si riscontra una certa uniformità a livello ultrastrutturale: normalmente sono costituite da uno o due strati di cellule secernenti che si affacciano su un lume interno e poggiano esternamente su una lamina basale circondata da muscolatura (GILLOTT, 1988). Nelle ghiandole di origine ectodermica, la struttura delle singole unità ghiandolari rientra perfettamente nella classificazione proposta da NOIROT & QUENNEDY (1974), e rielaborata da QUENNEDY (1998), in base alla quale si possono distinguere tre classi morfologiche con diversa complessità. I processi di sintesi e di secrezione delle ghiandole sono in genere temporalmente legati agli eventi di maturazione delle uova (LOCOCO & HUEBNER, 1980; DEGRUGILLIER & GROSZ, 1981; SZOPA, 1981; HOSKEN *et al.*, 2002). Pertanto, i prodotti di secrezione sono direttamente e puntualmente coinvolti in momenti diversi dei processi riproduttivi con funzioni specifiche, talvolta molteplici. Tra le numerose funzioni attribuite ai prodotti delle ghiandole accessorie femminili vengono riportate di seguito le più diffuse nell'ambito di insetti di importanza agraria e sanitaria (in parentesi alcuni esempi delle specie più studiate):

1. Produzione dell'ooteca (*Schistocerca gregaria*, *Periplaneta americana*)
2. Rivestimento delle uova con materiale adesivo (*Chrysomya megacephala*, *Rhodnius prolixus*)
3. Lubrificazione e protezione dei dotti dell'appa-

- rato riproduttore (*Scathophaga stercoraria*, *Chrysomya putoria*, *Frankliniella occidentalis*)
4. Facilitazione della fecondazione (*Musca domestica*)
  5. Nutrimento delle larve (ghiandole del latte) negli insetti vivipari (*Glossina* sp.)
  6. Funzione antibatterica e protezione delle uova (*Ceratitidis capitata*, *Bactrocera oleae*, *Phlebotomus perniciosus*)

Tra i primi e più approfonditi studi sulla morfologia e sull'ultrastruttura delle ghiandole accessorie femminili, si possono annoverare quelli sulle *colleterian glands* di alcuni Blattodea e Mantodea. In *Periplaneta americana* le ghiandole accessorie femminili sono estensioni tubulari ramificate, composti da diversi tipi cellulari che sono disposti in regioni specifiche. Le proteine strutturali per la formazione dell'ooteca sono elaborate nelle diverse regioni e rilasciate nella vagina, dove sono organizzate intorno ad un certo numero di uova (MERCER & BRUNET, 1959). Una situazione molto simile si verifica nelle mantidi dove sono presenti due paia di ghiandole tubulari di diversa lunghezza (GILLOTT, 1988). In *Schistocerca gregaria* (SZOPA, 1981, 1982; HÄGELE *et al.*, 2000), la "locusta del deserto", le due *pseudocolleterian glands* sono estensione mesodermiche tubulari dei due ovidutti laterali e che producono alcune delle componenti esterne del guscio ovulare. È stato dimostrato che queste sostanze hanno un effetto feromonale che favorisce il passaggio dalla forma solitaria a quella gregaria nelle popolazioni naturali.

In un interessante lavoro, DALLAI *et al.* (1996) hanno descritto la morfologia e l'ultrastruttura della ghiandola accessoria femminile del tripide *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), un insetto molto dannoso per le colture orticole, frutticole e floricole, in grado di arrecare sia danni diretti (punture su foglie e fiori) che indiretti (trasmissione di virus). L'unica ghiandola è una struttura voluminosa con un bulbo apicale, composto da unità secretorie del terzo tipo nella classificazione di NOIROT & QUENNEDY (1974) ed un lungo dotto che si apre nella vagina, indipendentemente dalla spermateca. I prodotti delle cellule secretorie, di cui non si conosce la natura, sono probabilmente coinvolte nella lubrificazione e protezione dei dotti dell'apparato riproduttore.

Le ghiandole accessorie degli insetti vivipari svolgono una funzione essenziale nello sviluppo larvale e pertanto sono particolarmente studiate nelle specie del genere *Glossina*, vettori provati di tripanosomi, agenti della malattia del sonno e della nagana. In *Glossina morsitans* queste strutture, tubulari ramificate, sono composte da tre distinte

regioni: a) un dotto collettore comune, b) quattro tubuli prossimali con cellule secernenti e privi di strato muscolare esterno, c) numerosi tubuli periferici, con grandi cellule secernenti. La morfologia e l'attività della ghiandola cambiano in relazione al ciclo gonotrofico. I prodotti di secrezione, che hanno funzione nutriente, vengono trasferiti all'embrione nell'utero insieme a batteri simbiotici, essenziali per lo sviluppo larvale e per la fertilità degli adulti che ne risulteranno (ATTARDO *et al.*, 2008; PELLEGRINI *et al.*, 2011).

Le due ghiandole accessorie femminili di *Ceratitidis capitata* sono tra le più studiate in assoluto. Dal punto di vista morfologico presentano una porzione basale globosa ed una apicale a forma di "cuore", con lunghi dotti che si aprono nel lato dorsale-anteriore della vagina (DALLAI *et al.*, 1985). Queste ghiandole sono costituite da unità secretorie ascrivibili al terzo tipo di NOIROT & QUENNEDY (1974), la cui attività è strettamente legata al ciclo di maturazione delle uova. Il secreto ha probabilmente più funzioni, fra cui la facilitazione della fecondazione, vista la presenza di *b-N-acetylhexosaminidase*, attiva nella rimozione del cappuccio micropilare. La presenza di peptidi antibatterici (ceratotoxine A, B e C), nel secreto ghiandolare e sul corion delle uova deposte, ha suggerito una funzione di protezione da possibili infezioni, sia dei dotti ovarici che delle uova (MARCHINI *et al.*, 1991, 1993, 1997). Tali peptidi sono stati caratterizzati, ed i geni che li codificano identificati: la loro espressione, che non è dipendente da infezioni batteriche, è regolata, almeno nel caso della ceratotoxina A, dall'ormone giovanile (ROSETTO *et al.*, 1996; MANETTI *et al.*, 1997).

Tra i Ditteri di interesse sanitario non sono molti gli studi sulle ghiandole accessorie femminili, il cui ruolo nella riproduzione è ritenuto poco significativo, soprattutto se paragonato a quello delle ghiandole accessorie maschili. Tuttavia nelle Phlebotominae, le ghiandole associate all'apparato riproduttore (due grandi strutture tubulari che vanno incontro ad importanti cambiamenti morfologici e funzionali durante il ciclo gonotrofico) sembra abbiano funzioni determinanti per la capacità riproduttiva della femmina. In *Phlebotomus perniciosus*, la loro struttura è caratterizzata da un epitelio monostratificato secernente, che circonda un lume, in cui le secrezioni vengono riversate gradualmente e si accumulano prima di essere rilasciate sulle uova mature durante il loro passaggio attraverso la vagina (FAUSTO *et al.*, 1997) (Fig. 1). La principale componente della secrezione di queste ghiandole risulta essere una lipasi (denominata PhpaLIP) il cui gene, femmina-specifico, è espresso in vari

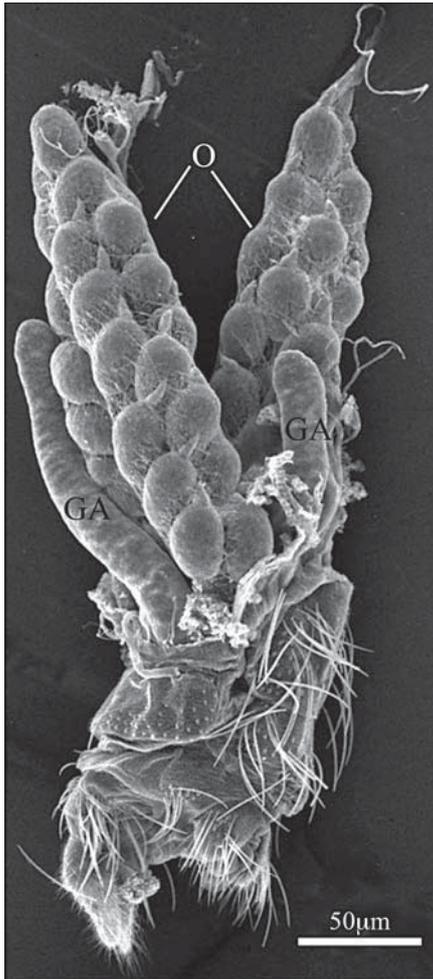


Fig. 1

Immagine al microscopio elettronico a scansione (barra= 50  $\mu\text{m}$ ) dell'apparato riproduttore femminile di *Plebotomus perniciosus*, 48 h dopo il pasto di sangue (da FAUSTO *et al.*, 1997). (GA) ghiandola accessoria; (O) ovario.

distretti dell'apparato riproduttore in relazione al ciclo gonotrofico (ROSETTO *et al.*, 2003; BELARDINELLI *et al.*, 2007). Testando in vitro la proteina ricombinante è stata evidenziata anche una sua attività antibatterica (BELARDINELLI *et al.*, 2005). Studi sulla frazione non polare della secrezione delle ghiandole accessorie in un'altra specie di flebotomo, *Lutzomyia longipalpis*, endemica del sud America e potenziale vettore di leishmaniosi umane, hanno permesso di scoprire una sostanza *pheromone-like* con effetto attrattivo/stimolatorio nei confronti di altre femmine co-specifiche (DOUGHERTY *et al.*, 1994). Il ruolo della ghiandola annessa all'apparato riproduttore nei Culicidi non è noto. In alcune specie, la ghiandola non mostra alcun cambiamento di dimensione durante il ciclo gonotrofico, per cui è stato messo in dubbio che la sua attività possa avere un reale effetto sulla capacità riproduttiva delle femmine (DETINOVA, 1962; GIGLIOLI, 1963; ROSAY, 1968; ROSSIGNOL *et al.*,

1977). Tuttavia, la ghiandola accessoria di *Anopheles labranchiae*, recentemente descritta da FAUSTO *et al.* (2011), mostra una crescente attività in relazione alla maturazione delle uova, con la produzione di sostanze che inizialmente sono accumulate nelle camere interne e poi rilasciate nella vagina superiore, durante il passaggio dell'uovo (Fig. 2). Questi risultati fanno ipotizzare che i prodotti della ghiandola possano avere un ruolo durante la fecondazione. Recentemente, ROGERS *et al.* (2008) hanno messo in evidenza in *An. gambiae* trasformazioni strutturali delle cellule ghiandolari della vagina dopo l'accoppiamento. Tali modificazioni, che sono in relazione alle variazioni evidenziate nel "mating machinery" (l'insieme dei componenti molecolari e strutturali che sono accesi o spenti dopo la copulazione), probabilmente non consentono alla struttura di svolgere la sua funzione, rendendo le femmine accoppiate non competenti per ulteriori inseminazioni. Queste osservazioni potrebbero avere rilevanti implicazioni nella messa a punto di strategie di controllo genetico per questo importante vettore.

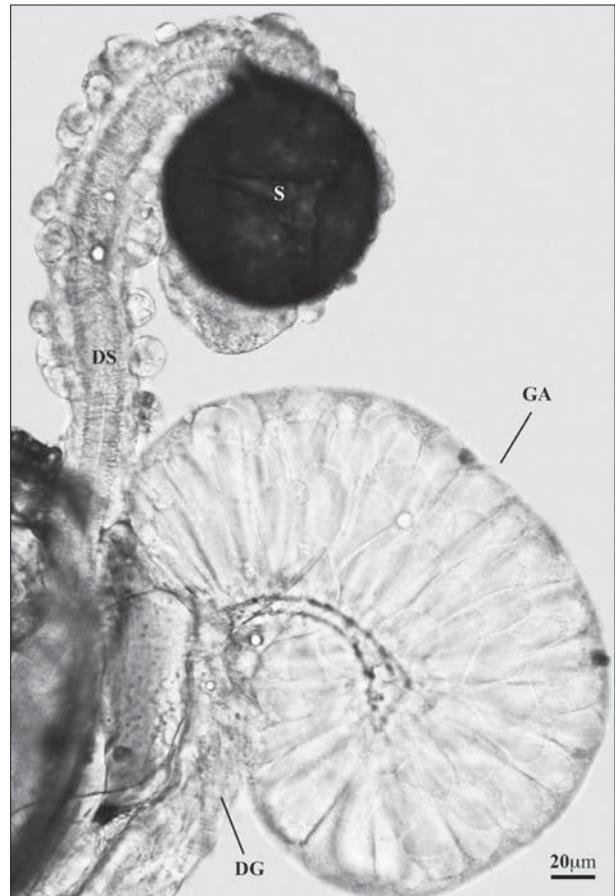


Fig. 2

Immagine al microscopio ottico della spermateca (S) e della ghiandola accessoria (GA) femminile di *Anopheles labranchiae* (DG) dotto ghiandolare, (DS) dotto spermatecale.

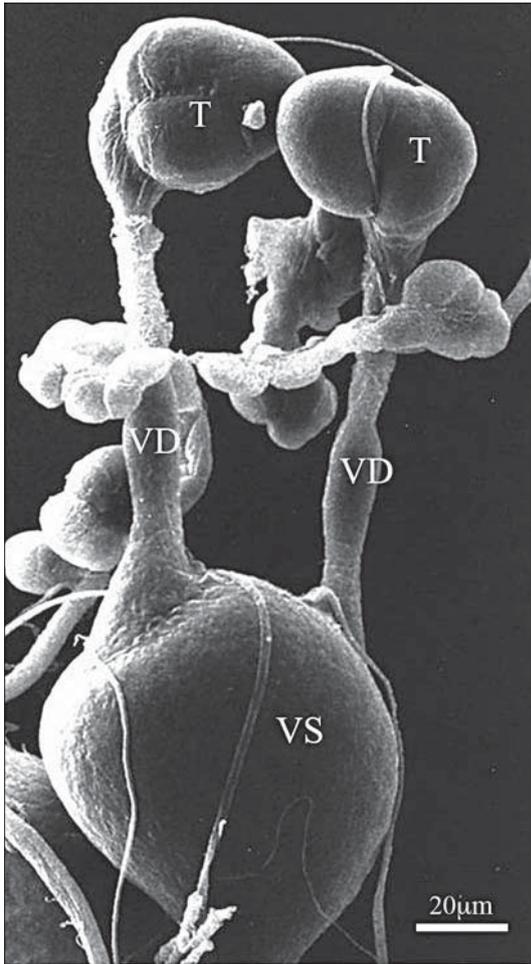


Fig. 3

Immagine al microscopio elettronico a scansione (barra= 20  $\mu\text{m}$ ) dell'apparato riproduttore maschile di *Pblebotomus perniciosus* (da FAUSTO *et al.*, 2000). (T) testicolo, (VD) vasi deferenti, (VS) vescicola seminale.

#### LE STRUTTURE ANNESSE ALL'APPARATO RIPRODUTTORE MASCHILE

L'apparato riproduttore maschile degli insetti consiste principalmente di testicoli (nella maggior parte dei casi in numero di due), vasi deferenti, vescicole seminali e dotto eiaculatore. Ciascuna di queste parti svolge ruoli diversi nella formazione, maturazione e trasporto del gamete maschile, e nel trasferimento degli spermatozoi alla femmina. Lo svolgimento di queste funzioni prevede l'intervento di sostanze secrete da cellule specializzate, singole o organizzate in strutture complesse. Come per le femmine, in generale queste strutture ghiandolari vengono classificate sulla base della loro posizione lungo l'apparato riproduttore:

- a) Strutture associate ai testicoli
- b) Strutture associate ai vasi deferenti ed alla vescicola seminale
- c) Strutture associate ai dotti eiaculatori
- d) Ghiandole riproduttive accessorie (*sensu stricto*)

In molti ordini di insetti, le secrezioni delle diverse formazioni ghiandolari si combinano per formare una o più strutture sacciformi, le "spermatofore", contenenti gli spermatozoi, che così vengono trasferiti all'apparato riproduttore femminile. Negli ordini in cui le spermatofore non si formano, gli spermatozoi vengono trasferiti in un mezzo liquido, il "fluido seminale", prodotto principalmente dalle ghiandole accessorie *sensu stricto*, con la partecipazione anche di altre strutture ghiandolari annesse all'apparato riproduttore (KAULENAS, 1992).

Le secrezioni delle cellule ghiandolari presenti nei testicoli sono state particolarmente studiate in alcuni Ortotteri Tettigonidae dove è stato evidenziato il loro ruolo nella formazione del cappuccio che avvolge le teste degli spermatozoi all'interno degli "spermatodesmi" (GILLOTT, 1988). Tali strutture contribuiscono alla maturazione e all'assemblamento degli spermatozoi durante il loro trasporto all'interno delle spermatofore (SOTTILE *et al.*, 2009).

I vasi deferenti possono presentare un epitelio specializzato per la secrezione di alcune componenti delle spermatofore, come evidenziato in *Lytta nuttalli* (KAULENAS, 1992). In specie dove non sono presenti vescicole seminali vere e proprie, come avviene nella "mediterranean flour moth" *Anagasta (Ephesia) kübniella* (RIEMANN & THORSON, 1979), i vasi deferenti possono svolgere la funzione di immagazzinamento di spermatozoi, nel qual caso il loro epitelio secerne sostanze attive nel mantenimento degli spermatozoi stessi.

In molte specie, la porzione terminale dei vasi deferenti può dilatarsi, o generare evaginazioni indipendenti, a formare vescicole seminali vere e proprie. Queste ultime, di origine mesodermica o ectodermica, rappresentano un serbatoio di spermatozoi ed il loro epitelio può avere un'attività secretoria più o meno marcata. In specie in cui non sono presenti ghiandole accessorie vere e proprie, le vescicole seminali possono assumerne le funzioni, per cui il loro epitelio acquisisce un'alta attività secretoria. Un esempio particolarmente studiato di questa situazione riguarda l'unica vescicola seminale mediana, posta alla confluenza dei due vasi deferenti, dei maschi dei flebotomi (Fig. 3). In *Pblebotomus perniciosus* la vescicola seminale mostra una struttura complessa in cui si riconoscono 3 compartimenti morfologicamente differenti (A, B e C-Fig. 4) (FAUSTO *et al.*, 2000). Le cellule epiteliali di ciascuno di questi compartimenti presentano una grande attività secretoria con produzione di materiale che mostra caratteristiche morfologiche, e quindi probabilmente anche funzionali, diverse fra i compar-

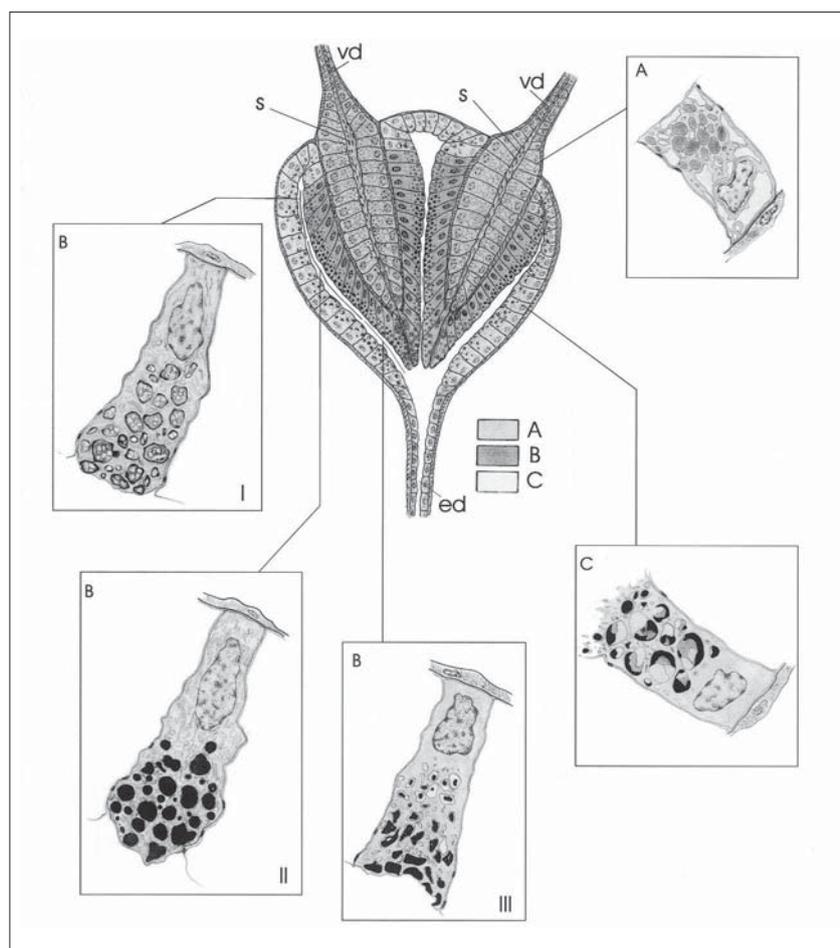


Fig. 4  
Disegno schematico in cui vengono messi in evidenza i tre compartimenti (A-B-C) della vescicola seminale di *Phlebotomus perniciosus* (da FAUSTO *et al.*, 2000).

timenti (FAUSTO *et al.*, 2000). Anche in altri Ditteri, per esempio nei generi *Musca* e *Sarcophaga*, le ghiandole accessorie maschili sono assenti. In questi casi, le cellule secretorie del dotto eiaculatore producono diverse secrezioni che svolgono ruoli generalmente tipici delle ghiandole accessorie.

Le ghiandole accessorie *sensu stricto*, di origine mesodermica o ectodermica, sono collegate mediante dotti più o meno lunghi, con la parte inferiore dei deferenti o con l'estremità superiore del dotto eiaculatore (GILLOTT, 2005). In alcune specie le ghiandole mostrano un'elevata complessità morfologica e funzionale, legata alla sintesi e secrezione di numerosi e diversificati prodotti che, singolarmente e/o in associazione fra loro, sovrintendono ad una grande molteplicità di funzioni. Fondamentalmente l'azione di queste sostanze si esplica nel mantenere le proprietà biologiche degli spermatozoi e nel facilitare il loro trasferimento nella femmina, dove possono indurre una serie di trasformazioni fisiologiche e comportamentali, fondamentali per l'efficienza riproduttiva. La mor-

fologia delle ghiandole accessorie maschili risulta estremamente diversificata, anche se presenta generalmente una struttura di base composta da unità tubulari semplici in numero estremamente variabile, da due a centinaia. Ciascuna unità tubulare mostra, di solito, un epitelio monostratificato che delimita un lume interno ed è circondato da una guaina muscolare.

Negli Orthoptera (Acrididae), le ghiandole appaiono come due masse bilaterali, ognuna delle quali è composta da una serie di tubuli intrecciati, che in *Locusta migratoria* e in *Schistocerca gregaria* sono in numero di 16 (GILLOTT, 1988). Ogni tipo di tubuli produce diverse secrezioni che assumono ruoli fondamentali in diversi contesti funzionali, soprattutto nella formazione delle spermatofores (una o più per ogni accoppiamento) e nel favorire il passaggio della spermatofores attraverso le vie genitali maschili. In questo ambito sono stati condotti interessanti studi morfologico-funzionali sulle ghiandole accessorie maschili di alcuni Tettigoniidae. In *Bolivarius siculus* MARCHINI *et al.* (2009) hanno descritto due gruppi

principali di tubuli ghiandolari che si aprono nel dotto eiaculatore: le “ghiandole di primo ordine”, un certo numero di grandi tubuli anteriori, e le “ghiandole di secondo ordine”, posizionate posteriormente, con tubuli più piccoli e più numerosi. Queste ghiandole, come in altri Tettigoniidae, sono coinvolte nella formazione della spermatofora, una parte della quale (*spermatophylax*) è priva di spermatozoi ed è considerata un dono nuziale (SOTTILE *et al.*, 2009).

La formazione della spermatofora è probabilmente la funzione primaria anche dei prodotti di secrezione delle ghiandole accessorie maschili delle Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), tra cui si annoverano le specie vettrici del morbo di Chagas in Sud America. In *Rhodius prolixus* ed in alcune specie del genere *Triatoma*, sono state descritte quattro ghiandole accessorie, distinguibili sulla base della morfologia del secreto, elettrorassaparente o opaco, che svolge funzioni differenziate nella formazione della spermatofora (CHIANG *et al.*, 2012).

Nonostante l’alta diversificazione, le ghiandole associate all’apparato riproduttore nei Coleotteri mostrano un piano strutturale tubulare semplice, simile a quello descritto per gli Ortotteri. Anche in questo caso i prodotti di secrezione contribuiscono generalmente alla formazione delle spermatofore. A volte alcuni dei componenti della spermatofora raggiungono l’emolinfa delle femmine, dove forniscono un contributo trofico di supporto all’ovogenesi ed alla vitellogenesi (GILLOTT, 2003). Tra gli insetti di importanza economica, le ghiandole annesse all’apparato riproduttore maschile sono state oggetto di studi approfonditi solo in poche specie. Per esempio, nel genere *Leptinotarsa* è stato osservato un singolo paio di ghiandole tubulari con una struttura semplice e cellule secretorie di un solo tipo (DE LOOF & LAGASSE, 1972). Anche i maschi di *Popillia japonica* mostrano un singolo paio di ghiandole; tuttavia la loro morfologia è piuttosto complessa, con regionalizzazioni ben evidenti e produzione di diversi prodotti secretori. Tre paia di ghiandole tubulari sono state descritte in *Lytta nuttalli* (GERBER *et al.*, 1971), due paia in *Bruchidius atrolineatus* che secernono materiale organizzato in granuli morfologicamente molto diversificati (GLITHO & HUIGNARD, 1990). In *Acanthoscelides obtectus* sono presenti cinque paia di ghiandole con diversa complessità strutturale (DAS *et al.*, 1980).

Diversamente da quanto avviene nei Coleotteri, la morfologia generale delle ghiandole accessorie maschili dei Lepidotteri appare molto più omogenea all’interno dell’ordine: in tutte le specie studiate le ghiandole sono descritte come due tubuli fusi per una parte più o meno importante della loro lunghezza. A questa semplicità morfologica si con-

trappone una spiccata e talvolta complessa regionalizzazione strutturale. In *Calpodes ethlius* (Hesperidae) sono state evidenziate sei distinte regioni in cui si distinguono due differenti tipi cellulari con modalità di secrezione apocrina o merocrina (LAI-FOOK, 1982). Questa specializzazione regionale si riflette nelle diversità dei prodotti secretori, che sono riversati nella parte prossimale del dotto eiaculatore. Un’organizzazione simile è stata riportata anche in altre specie di lepidotteri di interesse agrario, quali *Anagasta (Ephestia) kühniella* (RIEMANN & THORSON, 1979), o *Lymantria dispar* (GIEBOULTOWICZ *et al.*, 1988). Generalmente i prodotti delle ghiandole maschili sono coinvolti nella formazione delle spermatofore, che avviene nella borsa copulatrice della femmina, dove gli spermatozoi effettuano gli ultimi stadi maturativi. Molti sono gli studi volti a chiarire l’effetto dei prodotti di queste ghiandole sulla fisiologia delle femmine dopo la copula. Per esempio, in *Hyalophora cecropia* e *Lymantria dispar* sono stati identificati alcuni peptidi che hanno un ruolo chiave sulla soppressione della sintesi e dell’emissione di feromoni attrattivi verso i maschi da parte delle femmine, che così risultano refrattarie ad ulteriori accoppiamenti (GILLOTT, 2003). In altri casi, come ad esempio *Heliothis virescens*, alcuni dei prodotti delle ghiandole accessorie maschili stimolano nelle femmine la produzione di vitello ed il suo uptake da parte dell’ovocita (GILLOTT, 2003).

Tra i Ditteri, solo in alcune famiglie (Simuliidae, Chironomidae, Glossinidae) si ha la produzione di spermatofore, mentre, nella maggiore parte delle specie, le sostanze secrete dalle ghiandole accessorie vanno a costituire il *mating plug*. Tra gli studi più dettagliati e completi sulla morfologia e sulla funzione delle ghiandole accessorie maschili, hanno grande rilevanza quelli nei Tephritidae *Ceratitis capitata* e *Bactrocera oleae*. In entrambe le specie, sono presenti due tipi di ghiandole (il primo di derivazione mesodermica ed il secondo di origine ectodermica), che si aprono nel dotto eiaculatore. Il primo paio è sacciforme in *B. oleae* e tubulare in *C. capitata*, con cellule secretorie binucleate e microvillate, mentre il secondo paio ha una struttura ramificata, con rami generalmente più lunghi in *B. oleae* che in *C. capitata*. Nonostante la loro diversa morfologia, l’ultrastruttura dei due tipi di ghiandole è abbastanza simile in entrambe le specie (DE MARZO *et al.*, 1976; MARCHINI *et al.*, 2003; MARCHINI & DEL BENE, 2006). I numerosi studi sulla caratterizzazione biochimica e funzionale del liquido seminale di queste specie hanno messo in luce nel corso degli anni, in modo sempre più puntuale, le molteplici attività biologiche che le diverse componenti svolgono (CAVALLORO & DELRIO,

1970; DELRIO & CAVALLORO, 1979; MIYATAKE *et al.*, 1999). Per esempio, è stato dimostrato che le femmine vergini iniettate con estratti di queste ghiandole, analogamente alle femmine fecondate, spostano la loro attenzione dai maschi ai frutti per aumentare il loro tasso di deposizione delle uova (JANG, 1995). Ne risulta una marcata diminuzione della propensione all'accoppiamento come è stato dimostrato nelle femmine della “queensland fruit fly”, *Bactrocera tryoni* (RADHAKRISHNAN & TAYLOR, 2007, 2008). Negli ultimi anni, grazie all'uso di tecniche di sequenziamento di nuova generazione e della proteomica, sono stati intrapresi numerosi studi finalizzati alla caratterizzazione delle proteine del fluido seminale ed alla loro attività nelle femmine. In questo contesto, *C. capitata* è tra le specie più studiate a livello genetico e molecolare (DAVIES & CHAPMAN, 2006; GOMULSKI *et al.*, 2008). Recentemente SCOLARI *et al.* (2012) hanno identificato quattrocento peptidi con possibile attività biologica, la cui caratterizzazione e regolazione potrà rivelare nuove funzioni e processi legati alla biologia riproduttiva di questa specie. Tali risultati aprono la strada a nuovi approcci nella ricerca di metodologie innovative per il controllo e la gestione delle popolazioni di *C. capitata*, peste agraria con ampia distribuzione geografica e con una storia di rapidi e devastanti esplosioni. Studi analoghi sono stati intrapresi sulle proteine prodotte dalle ghiandole accessorie maschili del coleottero *Tribolium castaneum* (parassita delle derrate) (SOUTH *et al.*, 2011), dell'ape *Apis mellifera* (BAER *et al.*, 2009), del flebotomo *Lutzomyia longipalpis* (AZEVEDO *et al.*, 2012), e soprattutto delle zanzare *Aedes aegypti* (SIROT *et al.*, 2008) e *Anopheles gambiae* (DOTTORINI *et al.*, 2007). In queste due ultime specie, e nelle Culicidae in generale (tra cui si annoverano i principali vettori di malattie all'uomo ed agli animali), le ghiandole accessorie maschili sono due grandi strutture tubulari, unite fra loro nella parte prossimale prima di aprirsi nella regione anteriore del dotto eiaculatore (CLEMENS, 2000) (Fig. 5).

In *Aedes aegypti*, il più importante vettore di dengue e virus della febbre gialla in tutto il mondo, è stato ampiamente dimostrato che le proteine prodotte dalle ghiandole accessorie maschili influenzano il comportamento riproduttivo ed alimentare delle femmine (CLEMENS, 1999; KLOWDEN, 1999). Gli effetti post-accoppiamento sul comportamento della zanzara femmina riguardano il volo, la risposta agli stimoli dell'ospite, l'oogenesi, la deposizione delle uova, la digestione del sangue e la refrattarietà sessuale (NUNES LIMA-CAMARA *et al.*, 2013). SIROT *et al.* (2008, 2011) hanno identificato in *Ae. aegypti* 145 “male-

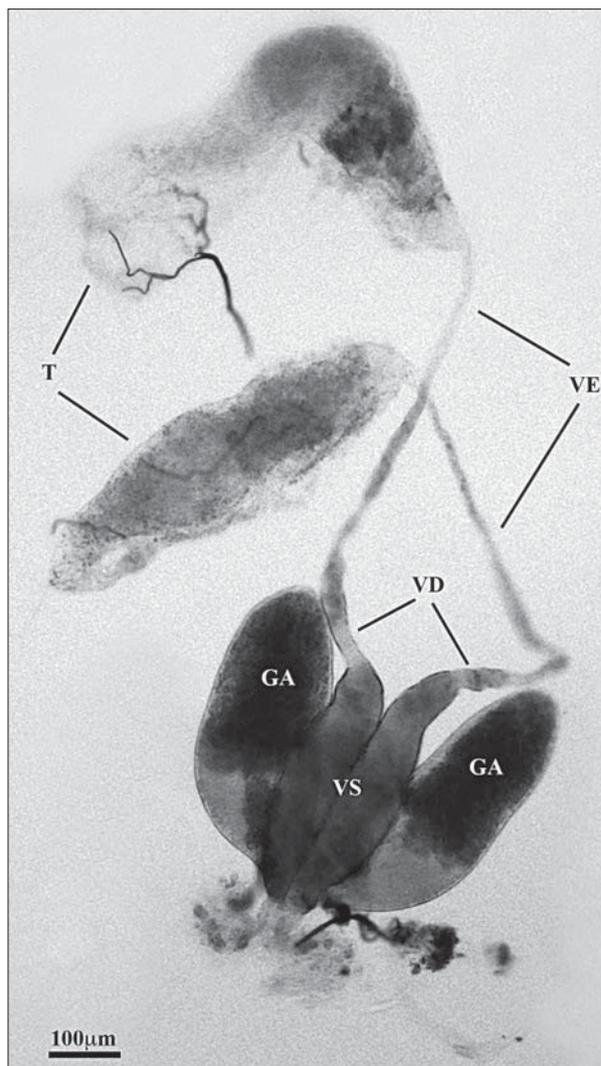


Fig. 5  
Apparato riproduttore maschile di *Aedes sp.* (T) testicoli, (VE) vasi efferenti, (VD) vasi deferenti, (VS) vescicole seminali, (GA) ghiandole accessorie.

derived proteins” presenti nel tratto riproduttivo di femmine dopo l'accoppiamento, che potrebbero avere un ruolo nel comportamento femminile *post-mating*. Numerosi studi di questo genere sono stati effettuati negli ultimi anni anche in alcune anofeline, fra cui *Anopheles gambiae*, il principale vettore della malaria. Un'accurata analisi del genoma di *A. gambiae* rivela 46 geni associabili ai prodotti delle ghiandole accessorie maschili, potenziali modulatori del comportamento femminile (DOTTORINI *et al.*, 2007). In questo ambito, BALDINI *et al.* (2013) hanno messo in evidenza un'interazione tra il 20-idrossi-ecdissone, un ormone steroideo trasferito dal maschio durante l'accoppiamento) ed il *Mating-Induced Stimulator of Oogenesis*, una proteina riproduttiva femminile, la cui espressione è indotta dall'accoppiamento, e che provoca un incremento della produzione di uova. Questo rappresenta un ulteriore *pathway*

molecolare la cui regolazione/manipolazione potrebbe costituire uno strumento finalizzato a ridurre l'efficienza riproduttiva delle popolazioni naturali e, di conseguenza, la diffusione della malaria.

Analisi trascrittomiche sono attualmente in atto anche in altre specie di importanza sanitaria. SPIEGEL *et al.* (2013) hanno identificato alcune proteine prodotte dalle cellule secretorie della vescicola seminale del flebotomo *Lutzomyia longipalpis*, che sono presenti nel *mating plug* e che si ipotizza siano coinvolte nel ridurre la frequenza degli accoppiamenti in femmine che hanno già copulato.

In conclusione, questa breve trattazione sulla morfologia e sulle funzioni delle più studiate strutture ghiandolari annesse all'apparato riproduttore di insetti di importanza agraria e sanitaria ne mette in luce la grande diversificazione ed il ruolo fondamentale per la riproduzione. Pertanto, nel tempo, queste strutture sono state oggetto di attenzione da parte dei ricercatori nel tentativo di delineare i meccanismi attraverso cui i loro secreti intervengono nel modulare l'efficienza riproduttiva delle varie specie. In questo ambito, le moderne tecniche genomiche e trascrittomiche forniscono risultati sempre più puntuali, aprendo orizzonti nuovi per la messa a punto di metodi di controllo delle popolazioni delle specie di maggior interesse agrario e sanitario.

#### RIASSUNTO

Negli insetti, l'efficienza della riproduzione è legata all'azione di secrezioni prodotte da strutture ghiandolari associate alle gonadi ed a diversi tratti degli apparati riproduttori maschili e femminili.

Queste ghiandole, che assistono direttamente il processo riproduttivo, sono note come "ghiandole sessuali accessorie" o "strutture annesse all'apparato riproduttore" e mostrano, in linea con la grande diversità degli insetti, un'ampia diversificazione nella morfologia e nelle funzioni. In questo lavoro viene presentata una breve panoramica delle strutture più studiate dal punto di vista morfologico e funzionale fra quelle annesse all'apparato riproduttore femminile e maschile in insetti di interesse agrario e sanitario. In particolare, sono oggetto di attenzione le ghiandole accessorie *sensu scripto* di alcune specie, quali *Ceratitis capitata*, *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*, in cui le conoscenze acquisite sono più complete e dettagliate e che, alla luce di recenti risultati, potrebbero aprire la strada a nuovi approcci nella ricerca di metodologie innovative per il controllo e la gestione delle popolazioni.

#### BIBLIOGRAFIA

ADIYODI K.G., ADIYODI R.G., 1975 – *Morphology and cytology of the accessory sex glands in invertebrates*. - Int. Rev. Cytol., 43: 353-398.  
AL-LAWATI H., KAMP G., BIENEFELD K., 2009 –

*Characteristics of the spermathecal contents of old and young honey bee queens*.-J. Insect Physiol., 55:116-121.  
ATTARDO G.M., LOHS C., HEDDI A., ALAM U.H., YILDIRIM S., AKSOY S., 2008 – *Analysis milk gland structure and function in Glossina morsitans: milk protein production, symbiont populations and fecundity*. - J. Insect Physiol., 54: 1236-1242.  
AZEVEDO R.V., DIAS D.B., BRETAS J.A., MAZZONI C.J., SOUZA N.A., ALBANO R.M., WAGNER G., DAVILA A.M., PEIXOTO A.A., 2012 – *The transcriptome of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) male reproductive organs*. - PLoS ONE 7: article number e34495.  
BAER B., HEAZLEWOOD J.L., TAYLOR N.L., EUBEL H., MILLAR A.H., 2009 – *The seminal fluid proteome of the honeybee Apis mellifera*. - Proteomics, 9 (8): 2085-2097.  
BALDINI F., GABRIELI P., ROGERS D.W., CATTERUCCIA F., 2012 – *Function and composition of male accessory gland secretions in Anopheles gambiae: A comparison with other insect vectors of infectious diseases (Review)*.- Pathog. Glob. Health, 106(2): 82-93.  
BALDINI F., GABRIELI P., SOUTH A., VALIM C., MANCINI F., CATTERUCCIA F., 2013 – *The Interaction between a Sexually Transferred Steroid Hormone and a Female Protein Regulates Oogenesis in the Malaria Mosquito Anopheles gambiae*.-PLoS Biol., 11(10): article number e1001695.  
BELARDINELLI M., FAUSTO A.M., GUERRA L., BUONOCORE F., BONGIORNO G., MAROLI M., MAZZINI M., 2005 – *Lipase and antibacterial activity of a recombinant protein from the female accessory glands of Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae)*. - Ann. Trop. Med. Parasit, 99 (7): 673-682.  
BELARDINELLI M., GUERRA L., GAMBELLINI G., MAROLI M., MAZZINI M., FAUSTO A.M., 2007 – *Immunolocalization of a lipase-like protein in the female reproductive apparatus of Phlebotomus papatasi during the gonotrophic cycle*. - Ann. Trop. Med. Parasit, 101 (7): 611-619.  
BÜNING, J. (ed.), 1994 – *The Insect Ovary: Ultrastructure, Previtellogenetic Growth and Evolution*. Chapman & Hall, London.  
CAVALLORO R., DELRIO G., 1970 – *Studi sulla radio-sterilizzazione di Ceratitis capitata Wiedemann e sul comportamento dell'insetto normale e sterile*. - Redia, 52: 511-547.  
CHAPMAN R.F., 1998 – *The Insects. Structure and Functions*. Simpson S.J. & Douglas A. E. (Eds), Cambridge University Press.  
CHEN P.S., 1984 – *The functional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions*. - Annu. Rev. Entomol., 29: 233-255.  
CHIANG R.G., CHIANG J.A., SARQUIS O., LIMA M.M., 2012 – *Morphology of reproductive accessory glands in eight species of blood-feeding Hemiptera (Hemiptera, Reduviidae) insect vectors of Chagas disease*.-Acta Trop., 122: 196-204.  
CLEMENTS A.N., 1999 – *The Biology of Mosquitoes, Vol. 1: Development, Nutrition and Reproduction*. Chapman & Hall (Eds.), London, pp. 1-536.  
CLEMENTS A.N., 2000 – *The biology of mosquitoes Vol.1. Development, Nutrition and Reproduction*. CABI Ed., pp 327-328.  
DALLAI R., DEL BENE G., FANCIULLI P.P., MELIS PORCINAI G., 1985 – *Fine structure of the female reproductive accessory glands in the dipteran Ceratitis capitata Wied.* - Redia, 68: 189-217.  
DALLAI R., DEL BENE G., LUPETTI P., 1996 – *Fine*

- structure of spermatheca and accessory gland of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). - J. Int. Insect Morphol. & Embryol., 25: 317-330.
- DAS A.K., HUIGNARD J., BARBIER M., QUESNEAU-THIERRY A., 1980 - Isolation of the two paragonial substances deposited into the spermatophores of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae). - *Experientia*, 36: 918-19.
- DAVEY K.G., 1985 - *The male reproductive tract*. In: Kerkut GA & Gilbert LT Ed., *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 1., Oxford: Pergamon Press., pp 1-14.
- DAVIES S.J., CHAPMAN T., 2006 - Identification of genes expressed in the accessory glands of male Mediterranean Fruit Flies (*Ceratitis capitata*). - *Insect Biochem. Molec.*, 36: 846-856.
- DE LOOF A., LAGASSE A., 1972 - *The ultrastructure of the male accessory reproductive glands of the Colorado Beetle*. - *Z. Zellforsch.*, 130: 545-552.
- DE MARZO L., NUZZACI G., SOLINAS M., 1976 - *Aspetti anatomici, strutturali, ultrastrutturali e fisiologici delle ghiandole genitali accessorie del maschio di Dacus oleae*. - *Entomologica*, 12:213-240.
- DEGRUGILLIER M.E., GROSZ S.G., 1981 - *Effects of female accessory gland ablation on fertility of screwworms, stable flies, and face flies*. - *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 74 (2): 217-221
- DELRIO G., CAVALLORO R., 1979 - *Influenza dell'accoppiamento sulla recettività sessuale e sull'ovideposizione in femmine di Ceratitis capitata Wiedemann*. - *Entomologica*, XV: 127-143.
- DETINOVA, T.S., 1962 - *Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria*. - *Monogr. Ser. WHO No. 47*, 216 pp.
- DOTTORINI T., NICOLAIDES L., RANSON H., ROGERS D.W., CRISANTI A., CATTERUCCIA F., 2007 - *A genome-wide analysis in Anopheles gambiae mosquitoes reveals 46 male accessory gland genes, possible modulators of female behavior*. - *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:16215-16220.
- DOUGHERTY M.J., HAMILTON J.G.C., WARD R.D., 1994 - *Isolation of oviposition pheromone from the eggs of the sand fly Lutzomyia longipalpis*. - *Med. Vet. Entomol.*, 8: 119-124.
- FAUSTO A.M., GAMBELLINI G., TADDEI A.R., MAROLI M., MAZZINI M., 2000 - *Ultrastructure of the seminal vesicle of Phlebotomus perniciosus Newstead* (Diptera, Psychodidae). - *Tissue Cell*, 32(3): 228-237.
- FAUSTO A.M., KHOURY C., MAROLI M., MAZZINI M., 1997 - *Ultrastructure of reproductive accessory glands in the female sandfly Phlebotomus perniciosus Newstead* (Diptera: Psychodidae). - *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 26 (2): 121-128.
- FAUSTO A.M., LAGHEZZA MASCI V., GAMBELLINI G., BELARDINELLI M., DI LUCA M., 2011 - *Morfologia ed ultrastruttura della ghiandola accessoria femminile in alcune specie del genere Anopheles* (Diptera, Culicidae). - *Atti del XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia Genova*, 13-16 giugno 2011: p 245.
- GERBER G.H., CHURCH N.S., REMPEL J.G., 1971 - *The anatomy, histology, and physiology of the reproductive systems of Lytta nuttalli Say* (Coleoptera: Meloidae). I. *The internal genitalia*. - *Can. J. Zool.*, 49(4): 523-533.
- GIEBULTOWICZ J.M., BELL R.A., IMBERSKI R.B., 1988 - *Circadian rhythm of sperm movement in the male reproductive tract of the gypsy moth, Lymantria dispar*. - *J. Insect Physiol.*, 34, (6): 527-532.
- GIGLIOLI M.E.C., 1963 - *The female reproductive system of Anopheles gambiae melas*. I. *The structure and function of the genital ducts and associated organs*. - *Riv. Malariol.*, 42: 49-179.
- GILLOTT C., 1988 - *Accessory Sex Glands*. In: Adiyodi K.G. & Adiyodi R.G. Ed., *Biology of Invertebrates. Arthropoda Insecta*, Vol. 3. New York: J Wiley & Sons. pp 319-471.
- GILLOTT C., 2003 - *Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior*. - *Annu. Rev. Entomol.*, 48:163-184.
- GILLOTT C., 2005 - *Entomology*. Springer (Ed.), Netherlands, 831 pp.
- GLITHO I.A., HUIGNARD J., 1990 - *A histological and ultrastructural comparison of the male accessory reproductive glands of diapausing and non-diapausing adults in Bruchidius atrolineatus (Pic)* (Coleoptera : Bruchidae). - *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 19(3-4): 195-209.
- GOMULSKI L.M., DIMOPOULOS G., XI Z., SOARES M.B., BONALDO M.F., MALACRIDA A.R., GASPERI G., 2008 - *Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata*. - *BMC Genomics*, 9: article number 243.
- HÄGELE B.F., OAG V., BOUAÏCHI A., MCCAFFERY A.R., SIMPSON S.J., 2000 - *The role of female accessory glands in maternal inheritance of phase in the desert locust Schistocerca gregaria*. - *J. Insect Physiol.*, 46: 275-280.
- HOSKEN D.J., UHÍA E., WARD P.I., 2002 - *The function of female accessory reproductive gland secretion and a cost to polyandry in the yellow dung fly*. - *Phisol. Entom.*, 27 (2): 87-91.
- JANG E.B., 1995 - *Effects of mating and accessory-gland injections on olfactory-mediated behavior in the female Mediterranean fruit-fly, Ceratitis capitata*. - *J. Insect Physiol.*, 41: 705-710.
- KAULENAS M.S., 1992 - *Insect Accessory Reproductive Structures*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. Ed. & Imprint, 236 pp.
- KLOWDEN M.J., 1999 - *The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior*. - *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 15: 213-220.
- LAI-FOOK J., 1982 - *Structure of the accessory glands and duplex of the internal male reproductive system of Calpododes ethlius* (Hesperiidae, Lepidoptera). - *Can. J. Zool.*, 60:1202-1215.
- LEOPOLD R.A., 1976 - *The role of male accessory glands in insect reproduction*. - *Annu. Rev. Entomol.*, 21:199-221.
- LOCOCO D., HUEBNER E., 1980 - *The ultrastructure of the female accessory gland, the cement gland, in the insect Rhodnius prolixus*. - *Tissue Cell*, 12: 557-580.
- MANETTI A.G.O., ROSETTO M., DE FILIPPIS T., MARCHINI D., BALDARI C.T., DALLAI R., 1997 - *Juvenile hormone regulates the expression of the gene encoding ceratotoxin A, an antibacterial peptide from the female reproductive accessory glands of the medfly Ceratitis capitata*. - *J. Insect Physiol.*, 43 (12): 1161-1167.
- MARCHINI D., BERNINI L.F., MARRI L., GIORDANO P.C., DALLAI R., 1991 - *The female reproductive accessory glands of the medfly Ceratitis capitata: antibacterial activity of the secretion fluid*. - *Insect Biochem.*, 21: 597-605.
- MARCHINI D., BRUNDO M.V., SOTTILE L., VISCUSO R.,

- 2009 – *Structure of male accessory glands of Bolivarius siculus (Fischer) (Orthoptera, Tettigoniidae) and protein analysis of their secretions.* - J. Morphol., 270(7): 880-891.
- MARCHINI D., DEL BENE G., 2006 – *Comparative fine structural analysis of the male reproductive accessory glands in Bactrocera oleae and Ceratitis capitata (Diptera, Tephritidae).*-Ital. J. Zool., 73(1): 15–25.
- MARCHINI D., DEL BENE G., CAPPELLIA L., DALLAI R., 2003 – *Ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the medfly Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae) and preliminary characterization of their secretions.*-Arthropod Struct. Dev., 31: 313-327.
- MARCHINI D., DEL BENE G., DALLAI R., 2010 – *Functional morphology of the female reproductive apparatus of Stephanitis pyrioides (Heteroptera, Tingidae): A novel role for the pseudospermathecae.*-J. Morphol., 271(4): 473-482.
- MARCHINI D., DEL BENE G., VISCUSO R., DALLAI R., 2012 – *Sperm storage by spermatoduses in the spermatheca of Trioza alacris (Flor, 1861) hemiptera, psylloidea, triozidae: A structural and ultrastructural study.* - J. Morphol. , 273(2): 195-210.
- MARCHINI D., GIORDANO P.C., AMOS R., BERNINI L.F., DALLAI R., 1993 – *Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly Ceratitis capitata (Insecta: Diptera).*-Insect Biochem. Mol. Biol., 5: 591-598.
- MARCHINI D., MARRI L., ROSETTO M., MANETTI A.G.O., DALLAI R., 1997 – *Presence of Antibacterial Peptides on the Laid Egg Chorion of the Medfly Ceratitis capitata.* - Biochem. Bioph. Res. Co., 240: 657-663.
- MERCER E.H., BRUNET P.C., 1959 – *The electron microscopy of the left colleterial gland of the cockroach.* - J. Biophys. - Biochem. Cytol., 5: 257-262.
- MIYATAKE T., CHAPMAN T., PARTRIDGE L., 1999 – *Mating-induced inhibition of remating in female mediterranean fruit flies Ceratitis capitata.* - J. Insect Physiol., 45: 1021-1028.
- NOIROT C., QUENNEDEY A., 1974 – *Fine Structure of Insect Epidermal Glands.* - Annu. Rev. Entomol., 19: 61-80.
- NUNES LIMA-CAMARA T., TORRES CODEÇO C., ALVES HONÓRIO N., VIEIRA BRUNO R., PEIXOTO A., LOUNIBOS L.P., 2013 – *Male accessory gland substances from Aedes albopictus affect the locomotor activity of Aedes aegypti females.* - Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 108 (Suppl. I): 18-25.
- PELLEGRINI A., BIGLIARDI E., BECHI N., PAULESU L., LEHANE M.J., AVANZATI A.M., 2011 – *Fine structure of the female reproductive system in a viviparous insect, Glossina morsitans morsitans (Diptera, Glossinidae).* - Tissue Cell, 43: 1-7.
- QUENNEDEY A., 1998 – *Insect epidermal gland cells: Ultrastructure and morphogenesis.* In: F. W. Harrison & M. Locke, Ed., Microscopic anatomy of invertebrates, insects, Wiley-Lis, London, 11A: 177-207.
- RADHAKRISHNAN P., TAYLOR P.W., 2007. – *Seminal fluids mediate sexual inhibition and short copula duration in mated female Queensland fruit flies.* - J. Insect Physiol., 53: 741-745.
- RADHAKRISHNAN P., TAYLOR P.W., 2008 – *Ability of male Queensland fruit flies to inhibit receptivity in multiple mates, and the associated recovery of accessory glands.*-J. Insect Physiol., 54: 421-428.
- RIEMANN J.B., THORSON B.J., 1979 – *Ultrastructure of the accessory glands of the Mediterranean flour moth.*-J. Morphol., 159: 355-393.
- ROGERS D.W., WHITTEN M.M.A., THAILAYIL J., SOICHOT J., LEVASHINA E.A., CATTERUCCIA F., 2008 – *Molecular and cellular components of the mating machinery in Anopheles gambiae females.* - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105(49): 19390-19395.
- ROSAY B., 1968 – *Accessory gland of female Culex quinquefasciatus Say and autogenous Culex pipiens pipiens L. (Diptera: Culicidae): appearance and behavior in relation to oogenesis.* - J. Med. Entomol., 5: 478-482.
- ROSETTO M., BELARDINELLI M., FAUSTO A.M., MARCHINI D., BONGIORNO G., MAROLI M., MAZZINI M., 2003 – *A mammalian-like lipase gene is expressed in the female reproductive accessory glands of the sand fly Phlebotomus papatasi (Diptera, Psychodidae).* - Insect Mol. Biol., 12 (5): 501-508.
- ROSETTO M., MANETTI A.G.O., GIORDANO P.C., MARRI L., AMONS R., BALDARI C.T., MARCHINI D., DALLAI R., 1996 – *Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial femalespecific peptide of the ceratotoxin family from the medfly Ceratitis capitata.* - Eur. J. Biochem., 241(2): 330-337.
- ROSSIGNOL P.A., MCIVER S.B., GOLDENBERG M., 1977 – *Accessory reproductive gland of Aedes aegypti: structure and relationship to oogenesis.* - Ann. Entomol. Soc. Am., 70: 279-281.
- SCOLARI F., GOMULSKI L.M., RIBEIRO J. M.C., SICILIANO P., MERALDI A., FALCHETTO M., BONOMI A., MANNI M., GABRIELI P., MALOVINI A., BELLAZZI R., AKSOY S., GASPERI G., MALACRIDA A.R., 2012 – *Transcriptional Profiles of Mating-Responsive Genes from Testes and Male Accessory Glands of the Mediterranean Fruit Fly, Ceratitis capitata.*-PLoS ONE, 7(10): article number e46812.
- SIROT L.K., HARDSTONE M.C., HELINSKI M.E.H., RIBEIRO J.M.C., KIMURA M., DEEWATTHANAWONG P., WOLFNER M.F., HARRINGTON L.C., 2011 – *Towards a Semen Proteome of the Dengue Vector Mosquito: Protein Identification and Potential Functions.* - Plos Neglect. Trop. Dis., 5(3): Article number e989.
- SIROT L.K., POULSON R.L., CAITLIN MCKENNA M., GIRNARY H., WOLFNER M.F., HARRINGTON L.C., 2008 – *Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, Aedes aegypti: Potential tools for control of female feeding and reproduction.* - Insect Biochem. Molec., 38: 176-189.
- SOTTILE L., BRUNDO M.V., VISCUSO R., 2009 – *Formation and rearrangement of spermatodesms in male of some Orthoptera Tettigoniidae.*-Tissue Cell., 42(1):18-23.
- SOUTH A., SIROT L.K., LEWIS S.M., 201 – *Identification of predicted seminal fluid proteins in Tribolium castaneum.*-Insect Mol. Biol., 20(4): 447-456.
- SPIEGEL C.N., BRETAS J.A.C., PEIXOTO A.A., VIGODER F.M.A., BRUNO R.V., SOARES M.J., 2013 – *Fine structure of the male reproductive system and reproductive behavior of Lutzomyia longipalpis sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).*-PLoS ONE, 8 (9): article number e74.
- SZOPA T.M., 1981-*The role of the accessory reproductive glands and genital ducts in egg pod formation in female Schistocerca gregaria.* - J. Insect Physiol., 27(1): 23-25, 27-29.
- SZOPA T.M., 1982 – *Development of the accessory reproductive glands and genital ducts in female Schistocerca gregaria.* - J. Insect Physiol., 28(6): 475-483.







## SALUTE DEGLI APOIDEI: DAI GENI ALLA COLONIA

### INTRODUZIONE

FRANCO FRILLI (\*) - FRANCESCO PENNACCHIO (\*\*)

(\*) *Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli studi di Udine, via della Scienze 206, 33100 Udine, Italy.*

(\*\*) *Dipartimento di Agraria - BiPAF, Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay", Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Università 100, 80055 Portici (Napoli), Italy.*

Introduzione alla Tavola Rotonda "Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 febbraio 2013.

L'ape e gli impollinatori selvatici rivestono un ruolo fondamentale negli ecosistemi naturali e agrari, in quanto contribuiscono alla riproduzione di molte piante. Pertanto, una parte significativa dell'alimentazione umana, e più in generale animale, dipende dall'attività di questi insetti pronubi.

L'ape ha sempre attratto l'interesse degli studiosi, sia per la sua grande importanza economica che per la stupefacente ricchezza di spunti che offre in campi scientifici quanto mai diversi. Ciò ha promosso studi sia di natura applicata sia di base, facendo di questo insetto un nuovo sistema modello.

Negli ultimi anni si è assistito a imponenti perdite di alveari determinate da varie cause, princi-

palmente di natura parassitaria, anche se ulteriori fattori di stress sembrano potere contribuire all'aggravamento dello stato di salute degli alveari. Il quadro complessivo che emerge dalla letteratura scientifica in continua crescita non consente ancora di definire in modo certo l'eziologia del collasso delle colonie, dal momento che questo fenomeno complesso non è riconducibile ad un'unica causa. Tuttavia, alcune recenti acquisizioni hanno fatto luce su dettagli funzionali e molecolari che aprono nuove prospettive di indagine scientifica.

La Tavola Rotonda cerca di fare il punto su questo argomento, toccando anche diversi aspetti ad esso correlati.



## SALUTE E DIFESA NEGLI INSETTI SOCIALI

RITA CERVO (\*) - STEFANO TURILLAZZI (\*)

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

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 febbraio 2013.

### *Health and defence in social insects*

The colonies of social insects have to face the problem of disease transmission among colony members, linked to group life and sociality. In fact, group living can potentially increase infectious diseases due to high individuals density and continuous physical social contacts among colony members. However, social insects are able to resist disease spreading as they have evolved novel collective defenses against parasites and pathogens, that sum their effects to individual defenses of single colony member. This, so called, 'social immunity' results from the cooperation of the individual group members to combat the increased risk of infection and consists of physiological, behavioral and organizational adaptations at colony level. Here, we review the principal and more common collective defensive strategies known in *Apis mellifera*.

KEY WORDS: *Apis mellifera*, social immunity, collective defense.

Le colonie degli insetti sociali, come altre società animali, devono fronteggiare il problema dell'alto rischio di trasmissione di malattie tra i membri del gruppo. Questo rischio è principalmente dovuto all'elevata densità di individui nella colonia (che in certe specie raggiunge i milioni di insetti), alle strette e frequenti interazioni che intercorrono tra i membri del gruppo ma, anche, alla ridotta variabilità genetica intra-coloniale che rende gli individui più suscettibili alle medesime infezioni (SCHMID-HEMPEL, 1998; HUGHES & BOOMSMA, 2004). Inoltre, all'interno di un nido di insetti sociali vengono mantenute delle condizioni ambientali molto ben controllate che possono facilitare il proliferare di malattie. I patogeni e i parassiti che attaccano le colonie di insetti sono numerosissimi e comprendono virus, batteri, funghi, acari e altri artropodi; per l'*Apis mellifera*, un insetto sociale di interesse economico, molti di questi patogeni sono stati identificati e la loro azione è per lo più nota (EVANS & SPIVAK, 2010; ARBIA & BABBY, 2011). Gli insetti sociali, come tutti gli altri insetti, presentano una barriera fisica (la cuticola esterna che riveste tutto il corpo dell'insetto così come le parti boccali e il tratto digerente) e un sistema immunitario innato che difendono il singolo individuo contro varie patologie. Il sistema immunitario individuale è molto ben conservato a livello molecolare tra specie diverse di insetti (MAGOR & MAGOR, 2001) tuttavia in *Apis mellifera* i geni associati a funzioni immunologiche risultano essere circa un terzo di quelli presenti in insetti solitari (EVANS

*et al.*, 2006). Questo suggerisce che l'ape, come altri insetti sociali, basi la sua immunità non solo su difese fisiche e fisiologiche a livello individuale ma che compensi la mancanza di geni che codificano per funzioni immunitarie con meccanismi di difesa legati alla socialità (WILSON- RICH *et al.*, 2009). Infatti, nonostante ci siano condizioni ideali per lo sviluppo di epidemie, queste avvengono raramente nelle colonie di insetti sociali, poiché essi hanno evoluto la capacità di attuare difese collettive contro parassiti e patogeni, difese che si sommano ai sistemi di difesa individuale dei singoli membri del gruppo. Il comportamento cooperativo e altruistico che è alla base della socialità e dell'enorme successo ecologico degli insetti sociali svolge anche un ruolo fondamentale nel ridurre sia l'ingresso di patogeni nella colonia che la trasmissione di malattie tra i suoi membri. Quindi nelle specie sociali troviamo delle difese non-immunologiche a livello coloniale capaci di limitare la trasmissione di patologie e ridurre l'intensità dell'infezioni. Questa "immunità sociale", come è stata definita da CREMER e collaboratori nel 2007, comprende specifici tratti comportamenti e difese fisiologiche (produzione di sostanze antibiotiche), la modulazione della frequenza di certe interazioni dopo l'esposizione a patogeni e, infine, la modificazione dell'ambiente interno al nido.

Per quanto riguarda il genere *Apis*, numerosi studi hanno descritto i meccanismi che regolano la trasmissione di malattie a livello collettivo (per una sintesi vedi EVANS & SPIVAK, 2009). Una delle

principali e più comuni difese collettive della colonia nei confronti di organismi patogeni è rappresentata dall'uso di secrezioni antibiotiche che vengono prodotte dai membri della colonia o raccolte dall'ambiente circostante (SADD & SCHMID-HEMPEL, 2006). E' noto che le foraggiatrici di *A. mellifera* raccolgono dalle piante resine che hanno potere antimicrobico (propoli) (LAVIE, 1968) e le incorporano in strutture del nido (SEELEY & MORSE, 1976). E' stato dimostrato che colonie al cui nido sono stati aggiunti sperimentalmente propoli mostrano una diminuzione dell'intensità dell'infezione da parte del fungo *Ascophæra apis* (patologia nota come covata calcificata) (SIMONE-FINSTROM & SPIVAK, 2012). Questo utilizzo dei propoli permette quindi una riduzione del carico del patogeno a livello coloniale limitando la necessità di un'attivazione costante della risposta immunitaria dei singoli membri della società che impone costi in termini di "fitness" alla colonia (SIMONE *et al.*, 2009). Quindi la raccolta dei propoli e il loro utilizzo all'interno della colonia porta benefici sia al singolo individuo che allo sviluppo coloniale. A tale proposito, un recente studio (SIMONE-FINSTROM & SPIVAK, 2012) ha mostrato che le colonie di api sono capaci di auto-medicazione poiché in grado di rispondere a infezioni del fungo sopraindicato aumentando il tasso di foraggiamento di propoli da utilizzare all'interno della colonia. Sebbene l'auto-medicazione, definita come la risposta individuale a infezioni con l'ingestione di composti non nutritivi o materiali vegetali, sia riportata per numerose specie, il caso dell'ape è unico poiché rappresenta il primo esempio di auto-medicazione a livello di gruppo.

Il veleno stesso rappresenta un'altra sostanza capace di limitare, potenzialmente, l'attacco di patogeni alle colonie. Mentre la funzione antimicrobica ed insetticida di alcune componenti del veleno è ben nota in alcune formiche (JOUVENAZ *et al.*, 1972; ORIVEL *et al.*, 2001) e vespe sociali (vedi TURILLAZZI *et al.*, 2006) solo recentemente si è iniziato a studiarla in *Apis*. BARACCHI & TURILLAZZI (2010) e BARACCHI *et al.* (2011) hanno dimostrato che la melittina, che costituisce circa il 50% del veleno di *Apis*, può costituire una difesa nei confronti di patogeni sia a livello individuale, con l'applicazione del veleno sul corpo da parte delle singole api, che a livello sociale se questo viene applicato sul substrato del nido.

Altra modificazione dell'ambiente coloniale di cui le api sono capaci per contrastare l'attacco di patogeni è ciò che viene chiamata "febbre coloniale". Le api, come altri insetti sociali, sono abili nel termoregolare l'ambiente interno al nido: scaldando/raffreddando e ventilando mantengono la temperatura

ideale per lo sviluppo della covata (33-36°C) e smorzano quando necessario anche le fluttuazioni di umidità (SHEELY, 1985). E' stato dimostrato che questa abilità viene utilizzata anche per contrastare particolari patogeni che sono termo-sensibili: la "febbre" dei favi di covata è stata registrata in risposta a infezioni da *Ascophæra apis* prevenendo così lo sviluppo della malattia (STARKS *et al.*, 2000).

Anche l'eliminazione di adulti morti o di rifiuti dal nido, comportamento assai pronunciato nelle formiche (DIEZ *et al.*, 2012) ma ben presente anche nelle api (VISSCHER, 1983), limitando il contatto tra potenziali fonti di patologie e i membri della colonia, rappresenta una chiara forma di immunità sociale. BARACCHI e collaboratori (2012) hanno recentemente dimostrato che le api riescono a riconoscere e rimuovere conspecifici affetti dal virus dalle ali-deformi indicando che le differenze nella miscela di idrocarburi che ricopre la cuticola di individui malati rispetto ad individui sani sono probabilmente responsabili di questo trattamento differenziale.

Ma una prevenzione ancora più efficace nel ridurre le possibilità di contatto tra individui malati e individui sani è quella di limitare o, meglio, di impedire l'ingresso a individui portatori di malattie. Uno studio condotto dal nostro gruppo di ricerca (CAPPA *et al.*, in prep.) ha dimostrato che le api guardiane riescono a percepire se api bottinatrici sperimentalmente presentate all'ingresso dell'arnia sono state a contatto, per parte della loro vita adulta, con l'acaro *Varroa destructor*; anche in questo caso, analisi della miscela degli idrocarburi epicuticolari suggeriscono che la miscela di idrocarburi cuticolari possa mediare il riconoscimento di individui che sono stati a contatto con varroa, che cercano di entrare nell'alveare (CAPPA *et al.*, in prep.). Un'altra strada che permette di ridurre le possibilità di contatto tra individui malati e individui sani è data dal non ritorno all'alveare da parte di individui affetti da patologie: è noto che foraggiatrici affette da parassitosi (es. *Varroa destructor*) o da infezioni di *Nosema* hanno difficoltà a tornare all'alveare a causa di una ridotta capacità di volo e di "homing" (KRALJ & FUSCHS, 2006, 2010). Il fatto che le api affette da questi due differenti patogeni mostrino la stessa risposta comportamentale suggerisce che questa può essere una risposta generale delle api per contrastare le infezioni (KRALJ & FUSCHS, 2010).

Ma forse una delle forme di immunità sociale più note tra le api sociali è rappresentata dal comportamento igienista. La capacità delle api di riconoscere ed eliminare prole (larve o pupe) infetta dalle cellette dei favi, è un comportamento noto da molto tempo (ROTHENBUHLER & THOMPSON, 1956); seppur descritto inizialmente come risposta alla peste ame-

ricana (malattia causata da *Paenibacillus larvae*), questo comportamento è stato successivamente individuato anche nella rimozione di prole affetta da altre patologie. Infine, analogamente a molte altre specie animali, un semplice comportamento di pulizia del proprio corpo (il “grooming” della letteratura inglese) o del corpo di un conspecifico appartenente al proprio gruppo (“allogrooming”) effettuato da molti individui in un alveare può rappresentare una risposta collettiva efficace a livello coloniale contro determinati patogeni (per una sintesi vedi EVANS & SPIVAK, 2010).

Queste capacità di difesa collettiva sono il risultato di una lunga storia co-evolutiva tra i parassiti e i loro ospiti. Parassiti e patogeni possono velocemente adattarsi ai loro ospiti, che d’altra parte sviluppano difese collettive sempre più efficienti e relativamente poco costose.

Nonostante che, come gli altri insetti sociali, anche l’*Apis mellifera* mostri queste capacità di difesa collettiva, negli ultimi anni le sue colonie stanno subendo un drastico attacco da parte di parassiti e patogeni. Sebbene il problema della “moria delle api” sia piuttosto complesso, un ruolo cruciale in questo fenomeno è svolto dall’acaro *Varroa destructor*, ectoparassita dell’ape adulta e dei suoi stadi immaturi. Questo parassita, originariamente confinato sul suo ospite ancestrale rappresentato dall’ape asiatica (*Apis cerana*), si è trasferito nella prima metà del secolo scorso sulla nostra ape occidentale, l’*Apis mellifera*, a seguito dei traffici commerciali che si sono sviluppati tra Oriente ed Occidente (MARTIN, 2001). Da allora si è diffuso a macchia d’olio e, allo stato attuale, sembra essere assente solo dal continente Australiano. Ma, mentre sul suo ospite originario la *Varroa* fa pochi danni, sull’ape da miele riesce ad annientare un’intera colonia nel giro di un paio di anni dato che prelevando emolinfa alle api, le indebolisce, provoca loro immunodeficienza e trasmette una vasta gamma di virus letali (MARTIN *et al.*, 2012). La maggior aggressività con cui l’acaro attacca il nuovo ospite è sicuramente imputabile alla mancanza - a causa del rapporto recente, in termini evolutivi, di questo sistema ospite-parassita - di quei meccanismi difensivi collettivi presenti in *Apis cerana* (ROSENKRANZ *et al.*, 2010). Poiché la lotta alla varroa nell’ape europea rappresenta uno dei principali problemi dell’apicoltura e della salvaguardia della salute dell’ape è importante prendere in considerazione quei tratti comportamentali che permettono all’ape asiatica di mantenere sotto controllo la popolazione dell’acaro all’interno dell’alveare. Il nostro gruppo di ricerca si è focalizzato in particolare, sullo studio del comportamento di “allogrooming” che rap-

presenta un tratto sociale determinante nella difesa dalla varroa del suo ospite originario (PENG *et al.*, 1987). Gli studi che stiamo conducendo su *Apis mellifera* mostrano che seppur il comportamento di allogrooming, diversamente da quanto ritenuto in precedenza (SAKAGAMI, 1960), sembra efficace nel rimuovere la varroa dal corpo delle compagne (CERVO *et al.*, in prep.), esso viene effettuato solamente da una piccola frazione di api. Quindi tra i tentativi di sviluppare sistemi di lotta alla varroa più efficaci ed ecologicamente sostenibili sembra essere auspicabile una selezione per colonie con un maggior numero di individui che praticano il comportamento di allogrooming.

Non sempre però le api mostrano un’alterazione comportamentale che rappresenta una difesa contro le patologie. E’ il caso delle operaie di *Apis mellifera* infettate dal protozoo microsporide, *Nosema ceranae*, che mostrano di preferire temperature più alte (CAMPBELL *et al.*, 2010) e quindi tendono a spostarsi al centro del favo, più caldo e più popolato, nonostante questo favorisca la riproduzione del patogeno (temperature ottimali e maggior possibilità di trasmissione per la maggior densità di ospiti) (MARTIN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009). *N. ceranae*, analogamente a quanto accaduto per *V. destructor*, si è spostato recentemente dal suo ospite originario *Apis cerana* ad *Apis mellifera* (KLEE *et al.*, 2007) per le medesime cause sopra elencate. Questa risposta comportamentale delle operaie di *A. mellifera* infettate da *N. ceranae*, probabilmente dovuto allo stress fisiologico causato dal patogeno che porta ad una peggiore capacità termoregolatrice dell’ospite, non è adattativa e va ricercata nuovamente nella recente relazione, in termini evolutivi, di questa coppia parassita-ospite.

Questi due ultimi esempi mostrano quanto sia importante il delicato equilibrio del rapporto tra l’ape e patogeni, frutto di una lunga storia co-evolutiva, che permette la messa a punto di meccanismi di immunità collettiva a livello di colonia capaci di limitare la trasmissione di patologie e ridurre l’intensità dell’infezione.

## RIASSUNTO

Le colonie degli insetti sociali devono fronteggiare il problema dell’alto rischio di trasmissione di malattie tra i membri del gruppo, derivante dalla vita di gruppo e dalla socialità, in quanto diretta conseguenza sia dell’alta densità di individui all’interno della colonia sia delle strette e frequenti interazioni che intercorrono tra essi. Nonostante ciò, epidemie non sono frequenti nelle colonie di insetti sociali, poiché essi hanno evoluto la capacità di attuare difese collettive contro parassiti e patogeni, difese che si sommano ai sistemi di difesa individuale dei singoli membri del gruppo. Questa “immunità sociale”, come viene chiamata, è il risultato della cooperazione tra i membri del gruppo per com-

battere l'aumentato rischio di trasmissione di malattie e consiste di adattamenti di tipo comportamentale, fisiologico ed organizzativo a livello coloniale. Vengono qui illustrate le principali e più comuni difese collettive descritte in *Apis mellifera*.

#### BIBLIGRAFIA

- ARBIA A., BABBAY B., 2011 – *Management strategies of honey bee diseases*. - J. Entomol., 8(1): 1-15.
- BARACCHI D., TURILLAZZI S., 2010 – *Differences in venom and cuticular peptides in individuals of Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS*. - J. Insect Physiol., 56: 366-375.
- BARACCHI D., FRANCESE S., TURILLAZZI S., 2011 – *Beyond the antipredatory defence: honey bee venom function as a component of social immunity*. - Toxicon, 58: 219-229.
- BARACCHI D., FADDA A., TURILLAZZI S. 2012 – *Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies*. - J. Insect Physiol., 58: 1589-1596.
- CAMPBELL J., KESSLER B., MAYACK C., NAUG D., 2010 – *Behavioural fever in infected honeybees: parasitic manipulation or coincidental benefit?* – Parasitology, 137: 1487-1491.
- CREMER S., ARMITAGE S.A.O., SCHMID-HEMPEL P., 2007 – *Social immunity*. - Curr. Biol., 17: 693-702.
- DIEZ L., DENEUBOURG J.-L., DETRAIN C., 2012 – *Social prophylaxis through distant corpse removal in ants*. - Naturwissenschaften, 99: 833-842.
- EVANS J.D., SPIVAK M., 2010 – *Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees*. - J. Invert. Pathol., 103: S62-72.
- EVANS J.D., ARONSTEIN K., CHEN Y.P., HETRU C., IMLER J.L., JIANG H., KANOST M., THOMPSTON G.J., ZOU Z., HULTMARK D., 2006 – *Immune pathways and defense mechanisms in honey bees Apis mellifera*. - Insect. Mol. Biol., 15: 645-656.
- HUGHES W.O., BOOMSMA J.J., 2004 – *Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies*. - Evolution, 58: 1251-1260.
- KLEE J., BESANA A.M., GENERSCH E., GISDER S., NANETTI A., TAM D.Q., CHINH T.X., PUERTA F., RUZ J.M., KRYGER P., MESSAGE D., HATJINA F., KORPELA S., FRIES I., PAXTON R.J., 2007 – *Widespread dispersal of the microsporidian Nosema ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, Apis mellifera*. - J. Invert. Pathol., 96: 1-10.
- KRALJ J., FUSCHS S., 2006 – *Parasitic Varroa destructor mites influence flight duration and homing ability of infested Apis mellifera foragers*. - Apidologie, 37: 577-587.
- KRALJ J., FUSCHS S., 2010 – *Nosema sp. Influences flight behavior of infested honey bee (Apis mellifera) foragers*. - Apidologie, 41: 21-28.
- JOUVENAZ D.P., BLUM M.S., MAC C.J., 1972 – *Antibacterial activity of venom alkaloids from the imported fire ant, Solenopsis invicta Buren*. - Antimicrob. Agents Chemother., 2: 291-3.
- LAVIE P., 1968 – *Les substances antibiotiques dans la colonie d'abeilles*. Masson et Cie, Paris.
- MAGOR B.G., MAGOR K.E., 2001 – *Evolution of effectors and receptors of innate immunity*. - Devel. & Comp. Immunol., 25: 651-682.
- MARTIN S.J., 2001 – *Biology and life-history of Varroa mites*. In: Mites of honey bee, Webster T.C. & Delaplane K.S Ed., Dadant & Sons, Hamilton, IL., pp. 131-148.
- MARTIN S.J., HIGHFIELD A.C., BRETTEL L., VILLALOBOS E.M., BUDGE G.E., POWELL M., NIKAIIDO S., SCHROEDER D.C., 2012 – *Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite*. - Science, 335: 1304-1306.
- MARTIN-HERNÁNDEZ R., MEANA A., GARCÍA-PALENCIA P., MARÍN P., BOTÍAS C., GARRIDO-BAILÓN E., BARRIOS L., HIGES M., 2009 – *Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia*. - Appl. Environ. Microbiol., 75, 2554-2557.
- ORIVEL J., REDEKER V., LE CAER J.P., KRIER F., REVOL-JUNELLES A.M., LONGEON A., CHAFFOTTE A., DEJEAN A., ROSSIER J., 2001 – *Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant Pachycondyla goeldii*. - J. Biol. Chem., 276: 17823-17829.
- PENG Y.S., FANG Y., XU S., GE L., 1987 – *The resistance mechanism of the Asian honey bee, Apis cerana Fabr, to an ectoparasitic mite Varroa jacobsoni Oudemans*. - J. Invert. Pathol., 49, 54-60.
- ROSENKRANZ P., AUMEIER P., ZIEGELMANN B., 2010 – *Biology and control of Varroa destructor*. - J. Invert. Pathol., 103: 596-5119.
- ROTHENBUHLER W.C., THOMPSON V.C., 1956 – *Resistance of the American foulbrood in honey bee: I. Differential survival of larvae of different genetic lines*. - J. Econ. Entomol., 49: 470-475.
- SAKAGAMI S.F., 1960 – *Preliminary report on the specific difference behaviour and the other ecological characters between European and Japanese honey bee*. - Acta Hymenopt., 1, 171-198.
- SADD B.M., SCHMID-HEMPEL P., 2006 – *Insect immunity shows specificity in protection on secondary pathogen exposure*. - Curr. Biol., 16: 1206-1210.
- SCHMID-HEMPEL P., 1998 – *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton, NJ, 409 pp.
- SEELEY T.D., MORSE R.A., 1976 – *The nest of the honey bee (Apis mellifera L.)*. - Insect. Soc., 23: 495-512.
- SEELEY T.D., 1985 – *Honeybee ecology: a study of adaptation in social life*. Princeton University Press, Princeton.
- SIMONE M., EVANS J., SPIVAK M., 2009 – *Resin collection and social immunity in honey bees*. - Evolution, 63: 3016-3022.
- SIMONE-FINSTROM M., SPIVAK M., 2012 – *Increased resin collection after parasite challenge: a case of self-medication in honey bees?* - PLoS One, 7: 34601.
- STARKS P.T., BLACKIE C.A., SEELEY T.D., 2000 – *Fever in honeybees*. - Naturwissenschaften, 87: 229-231.
- TURILLAZZI S., MASTROBUONI G., DANI F.R., MONETI G., PIERACCINI G., LA MARCA G., BARTOLUCCI G., PERITO B., LAMBARDI D., CAVALLINI V., DAPPORTO L., 2006 – *Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp Polistes dominulus using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-Ion Trap*. - J. Mass Spectrom., 17: 376-383.
- VISSCHER P., 1983 – *The honey bee way of death: necrophoric behavior in Apis mellifera colonies*. - Anim. Behav., 31: 1070-1076.
- WILSON-RICH N., SPIVAK M., FEFFERMAN, N.H., STARKS P.T., 2009 – *Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies*. - Annu. Rev. Entomol., 54: 405-423.

## IL COLLASSO DELLE COLONIE E L'APICOLTURA OGGI

IGNAZIO FLORIS (\*) - ALBERTO SATTA (\*)

(\*) Dipartimento di Agraria, sezione di Patologia vegetale ed Entomologia, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italy; ifloris@uniss.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 febbraio 2013.

### *The honey bee colony collapse and the beekeeping today*

The honey bee colony collapse, well known in USA as Colony Collapse Disorder (CCD), is a syndrome of the honey bee colonies not yet completely defined which has determined serious losses in the last years. The CCD, in the strict sense of pathological condition, has also been reported recently in Europe. However, the colony collapse, in the broad sense of the term, is part of the wider problem of the honey bee colony losses in USA and Europe.

A clinical description of operational cases of CCD colonies showed the simultaneous presence of the following symptoms: (I) rapid loss of adult workers as evidenced by large amounts of capped brood within a collapsing colony, (II) surviving workers are young and the queen is present, (III) lack of dead workers within or proximal to collapsed colonies, (IV) abundant food stocks in collapsed colonies, (V) delayed invasion by other hive pests and (VI) non-damaging levels of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* and/or the microsporidian endoparasite *Nosema* spp. at the time of collapse.

In Italy, the greatest efforts to clarify the causes of colony losses have been widely experienced/investigated in the APENET (currently BEENET) programme. The most significant scientific results regarded the interactions between the parasitism of *V. destructor* and the Deformed Wing Virus (DWW), as well as the impact of pesticides on agro-ecosystems, particularly Neonicotinoids.

In general, the investigations carried out both in USA and in Europe showed that none of the many quantified variables (including adult bee physiology, parasites, pathogen loads and pesticide levels) emerged as a most-likely cause of collapse. In colonies affected by the collapse, higher pathogen loads and co-infections with a greater number of pathogens were observed than in healthy ones, suggesting an increased exposure to pathogens or a reduced resistance of bees toward pathogens. Furthermore, on the basis of the distribution of the affected hives, the condition of CCD would be contagious or reflect a common risk factor within the apiaries. However, a more precise characterization and standardization of colony collapse is needed in order to allow a comparison of data at global scale.

Presently, beekeeping strongly suffers the negative economic impact of this morbidity which causes colony and yield losses. The implications at apiary level concern the technical and integrated parasite/pathogen management to avoid sources of stress that may contribute in reducing the immune defense of honey bee colonies.

KEY WORDS: Colony Collapse, Impact, Risk factors, Case definitions, Apiary Management.

Il problema del collasso delle colonie, anche nell'accezione del Colony Collapse Disorder o CCD, si inquadra nella problematica più generale del declino delle api a livello mondiale che, da alcuni decenni, sta assumendo contorni sempre più allarmanti, soprattutto in rapporto all'importanza strategica delle api come impollinatori nel conseguimento di molte produzioni vegetali. Ben 39 piante coltivate su 57, infatti, nell'ambito delle più importanti monoculture, beneficiano di questo fondamentale servizio ecosistemico (KLEIN *et al.*, 2007). L'*Apis mellifera* L. è senza dubbio l'impollinatore più importante per l'agricoltura grazie anche al suo facile allevamento e trasporto. Tant'è che nel corso del secolo scorso ad un aumento del 50% della produzione mondiale di miele ha fatto riscontro un incremento del 300% del servizio di impollinazione (AIZEN e HARDER, 2009).

Forti perdite di colonie di api, non meglio defi-

nite, si sono verificate anche in passato (es. "Isle of Wight disease" e "May Disease"), talvolta assimilabili all'attuale CCD (UNDERWOOD e VANENGELSDORP, 2007), ma l'entità e la velocità di questi recenti cali sono probabilmente senza precedenti. Spesso nei mezzi di comunicazione di massa sono stati enfatizzati aspetti scientificamente infondati come nel caso delle onde elettromagnetiche legate ai telefonini ([www.telegraph.co.uk](http://www.telegraph.co.uk)). Talvolta nella letteratura scientifica (RATNIEKS e CARRECK, 2010) le perdite di colonie di api sono state impropriamente imputate al "Colony Collapse Disorder", il quale, se ci riferiamo alla sua corretta definizione, non costituisce il fattore principale del declino delle api, posizionandosi addirittura all'8° posto dietro malnutrizione, regine, clima, parassiti, patogeni ecc. (VANENGELSDORP *et al.*, 2010).

In Europa, la perdita di colonie di api negli ultimi anni è stata in media pari al 20% (dall'1,8 al 53%)

(NEUMANN e CARRECK, 2010), con le carenze nutrizionali e i parassiti ritenuti i fattori maggiormente responsabili (Atti del Convegno "COLOSS 4°, Zagabria, Croazia, 3-4 marzo 2009", disponibile all'indirizzo [www.coloss.org/publicazioni](http://www.coloss.org/publicazioni)). Solo recentemente è stato segnalato il primo caso ufficiale di CCD in Svizzera (DAINAT *et al.*, 2012).

Gli studi volti a definire il problema del collasso delle colonie, in senso ampio, sia negli USA che in Europa hanno preso in considerazione, singolarmente o in combinazione, vari fattori: dalle parassitosi (Varroosi e Nosemosi tipo C) (HIGHERS *et al.*, 2006), agli effetti letali e sub-letali dei pesticidi utilizzati in agricoltura e per il controllo di parassiti e patogeni dell'alveare, dalla malnutrizione ai fattori climatici e allo stress da nomadismo che produrrebbero un effetto immunosoppressivo, rendendo le api più vulnerabili (MUTINELLI e GRANATO, 2007). Alcuni di questi fattori, quantificati e confrontati, hanno dimostrato di avere un forte impatto sulla salute delle api e di essere talvolta implicati in drastiche perdite, come nel caso di *Nosema ceranae* in Spagna, ma nessun singolo fattore è stato provato costantemente o sufficientemente abbondante da suggerire un unico agente causale.

In Italia, gli sforzi maggiori volti a chiarire le cause delle perdite di colonie, sono stati ampiamente profusi nell'ambito del programma ApeNet e ora proseguono con BeeNet, con risultati scientificamente significativi in materia di interazioni tra il parassitismo di *V. destructor* e il virus delle ali deformi (DWV) (NAZZI *et al.*, 2012) nonché sull'impatto di nuovi insetticidi come i Neonicotinoidi (SGOLASTRA *et al.*, 2012), già implicati in gravi morie di api e fenomeni di spopolamento in Francia a partire dai primi anni del decennio scorso.

Una vasta indagine su popolazioni in declino e sane di api, basata sull'approccio metagenomico e la PCR (Polymerase Chain Reaction), ha consentito di individuare associazioni microbiche diverse in colonie con CCD rispetto a colonie sane. Il riscontro più significativo è stato il rilevamento del virus israeliano della paralisi acuta (IAPV), il quale è risultato altamente correlato con CCD (COX-FOSTER *et al.*, 2007), anche se successive indagini non hanno confermato questa ipotesi (VANENGELSDORP *et al.*, 2009).

Gli studi epidemiologici hanno affrontato la problematica confrontando fattori di salute e di rischio in colonie predefinite "sospette" e "non", senza una specifica ipotesi, ma partendo da una definizione operativa dei casi (*operational case definitions*), basata su comuni caratteristiche cliniche, prontamente osservabili, facilmente reperibili e quasi sempre ben identificabili, ma con un basso livello di specificità. Ovvero, si è partiti da una condizione

inclusiva (ampia, generica) per giungere ad una "definizione" sempre più precisa con lo scopo di: (a) caratterizzare la distribuzione spaziale delle colonie forti, deboli e morte in apiari contenenti colonie con e senza sintomi di CCD, (b) quantificare e confrontare varie misure tra le popolazioni sospette di CCD con quelle apparentemente sane e (c) conoscere la causa del CCD. Sulla base di una preliminare definizione di casi operativi di CCD, compiuta in campo da ricercatori esperti nella diagnosi clinica delle malattie delle api, sono state quantificate oltre 200 variabili, 61 delle quali sono state registrate con una frequenza tale da consentire confronti significativi tra le popolazioni. Questa indagine ha evidenziato un numero più elevato di colonie morte e deboli negli apiari colpiti da CCD rispetto agli apiari "controllo" con una loro distribuzione non casuale, suggerendo che un agente infettivo o l'esposizione ad un fattore di rischio comune possano essere coinvolti nel collasso delle colonie. Nessun singolo patogeno o parassita è stato tuttavia trovato con una frequenza sufficiente per concludere che un unico organismo sia coinvolto nel CCD. Le colonie con CCD avevano comunque livelli di virus più elevati ed erano co-infettate con un maggior numero di agenti patogeni delle colonie "controllo", suggerendo una loro minore capacità di contrastare le infezioni dal punto di vista immunitario. L'inefficiente risposta immunitaria può essere legata a diversi fattori, tra i quali la malnutrizione e l'esposizione cronica a dosi sub-letali di pesticidi agricoli o di acaricidi applicati in apicoltura. In entrambi i casi, tuttavia, lo studio epidemiologico non ha provato un ruolo decisivo di questi fattori, evidenziando contrariamente alle attese una presenza di residui maggiore negli apiari o colonie "controllo". Non sono state altresì rilevate differenze nei livelli di *Varroa* in colonie con CCD rispetto ai controlli, anche se l'approccio epidemiologico è risultato carente nella valutazione dell'infestazione residua nella covata. Il parassitismo della *Varroa* è noto per indebolire il sistema immunitario delle api e facilitare la trasmissione di virus alla covata e alle api adulte (ROSENKRANZ *et al.*, 2010). Inoltre, i livelli di virus elevati, derivanti da un alto numero di acari, non sono sempre immediatamente soppressi dai trattamenti antivarroa, in quanto può prefigurarsi un potenziale effetto-eredità delle elevate infestazioni di *Varroa*. Anche la regolarità e vitalità della covata non ha manifestato differenze. Come in tutti i casi di studi epidemiologici descrittivi non si possono trarre conclusioni definitive, ma solo alcune considerazioni importanti per il proseguo delle ricerche e per la definizione operativa dei casi di CCD, che è riassumibile nel complesso dei seguenti sintomi: 1) rapida perdita di api operaie e con-

temporanea presenza di covata opercolata all'interno delle colonie; 2) operaie rimanenti molto giovani e presenza della regina; 3) mancanza di operaie morte all'interno o in prossimità delle colonie in fase di collasso; 4) scorte alimentari abbondanti nelle colonie collassate; 5) invasione tardiva di parassiti e intrusi dell'alveare in colonie collassate e assenza di cleptoparassitismo; 6) livelli bassi (non dannosi) di *Varroa* e/o *Nosema* spp.

Attualmente, gli sforzi per identificare la/e causa/e del declino delle colonie di api sono mirati, in particolare, verso il parassitismo della *Varroa* e le interazioni parassiti-patogeni, nonché la tolleranza e gli effetti cronici dei residui di pesticidi.

Tutti gli studi finora condotti dimostrano, in definitiva, che oggi l'apicoltura è esposta a una serie di insidie che ne minano le potenzialità produttive e la stessa immagine "ecologica". La qualità dell'ambiente è senz'altro una delle prerogative per l'esclusione di alcuni importanti fattori di rischio, quali l'esposizione a pesticidi agricoli e alla malnutrizione. Altri fattori sono legati ai differenti modelli di gestione degli apiari, per finalità "zootecniche" o per il "servizio di impollinazione", stanziale o nomade, in ambienti naturali e agricoli: estensivi o intensivi. Un'adeguata condizione ambientale potrebbe, tuttavia, non essere sufficiente a causa di altri fattori di rischio connessi alle modificazioni climatiche in atto o alla gestione tecnico-sanitaria degli alveari. Le stesse conclusioni dello studio epidemiologico sul CCD dimostrano quanto le cause patologiche indotte dal parassitismo, cui sono costantemente esposte le api, in associazione a problemi legati a residui di pesticidi, dipendenti in parte dal controllo dell'acaro *V. destructor*, siano strategici sotto il profilo pratico e scientifico per prevenire o definire le cause del collasso. In tal senso è rimarchevole il possibile effetto-eredità dell'infestazione di *Varroa*, che sottende il rischio insito in un'inadeguata gestione dell'infestazione, per cui, superando soglie non tollerate dalle colonie, si potrebbero scatenare patologie secondarie. Qui si entra in una sfera ancora scarsamente recepita dal mondo apistico, e in parte anche dal mondo scientifico, ovvero la definizione e l'applicazione di strategie di gestione sanitaria integrata, non solo nel senso entomologico della lotta "guidata" o "integrata" ai parassiti dell'alveare. Limitandoci al problema della *Varroa*, si impone l'esigenza di un monitoraggio costante dell'infestazione per mirare (*timing*) i trattamenti acaricidi così da prevenire l'instaurarsi di patologie secondarie o di condizioni di debolezza delle colonie che ne minino l'efficienza immunitaria a livello individuale e sociale.

Il collasso delle colonie, se inteso come *Colony Collapse Disorder* (CCD), è una sindrome delle api mellifiche, ancora in fase di caratterizzazione, che ha determinato nell'ultimo quinquennio allarmanti perdite di alveari negli Stati Uniti d'America. Solo recentemente, tale condizione patologica, in senso stretto, è stata segnalata anche in Europa. Sia negli USA che in Europa, tuttavia, il fenomeno del collasso delle colonie, in senso lato, si inquadra nella più ampia problematica del declino o perdita delle colonie di api (*honey bee colony losses*), per ragioni di varia natura, ambientale e patologica, o per l'interazione di vari fattori che portano ad uno stato di "morbilità" tale da compromettere la produttività e la sopravvivenza delle colonie di api. Negli USA, una descrizione su base clinica di questo fenomeno ha portato ad individuare la contemporanea presenza dei seguenti sintomi: 1) rapida perdita di api operaie e contemporanea presenza di covata opercolata all'interno delle colonie; 2) operaie rimanenti molto giovani e presenza della regina; 3) mancanza di operaie morte all'interno o in prossimità delle colonie; 4) scorte di miele e polline abbondanti nei favi; 5) invasione tardiva di parassiti e intrusi dell'alveare e assenza di cleptoparassitismo; 6) livelli non dannosi di *Varroa* e/o *Nosema* spp. In Italia, gli sforzi maggiori volti a chiarire le cause delle perdite di colonie, sono stati ampiamente esperiti nell'ambito del programma APENET (attualmente BEENET). I risultati scientifici più significativi di tale programma, hanno riguardato le interazioni tra il parassitismo di *Varroa destructor* e virus (DWV) e l'impatto dei pesticidi in aree agricole, con particolare riferimento ai Neonicotinoidi, già implicati in gravi perdite e fenomeni di spopolamento di alveari in Francia, a partire dai primi anni del decennio scorso. In generale, i confronti finora effettuati, sia in America che in Europa, hanno evidenziato l'assenza o la contraddittoria presenza di differenze quantitative dei numerosi parametri osservati in colonie con sintomi di collasso rispetto a colonie classificate sane, non escludendo che i vari agenti patogeni/parassitari o fattori di natura genetica, fisiologica, nutrizionale e ambientale, singolarmente o in combinazione, siano responsabili del collasso. È certo che il maggior carico di patogeni o di co-infezioni in colonie affette da collasso rispetto a colonie sane, dimostra una maggiore esposizione o una più ridotta difesa delle api con sintomi di collasso. Gli studi epidemiologici hanno evidenziato che, delle numerose variabili finora quantificate, nessuna è stata giudicata sufficientemente consistente da costituire un'unica causa di questo fenomeno. Inoltre, la condizione del collasso nota come CCD, sulla base della distribuzione degli alveari colpiti, risulterebbe contagiosa o rifletterebbe fattori di rischio comuni all'interno degli apiari. Permane in generale l'esigenza di una più precisa caratterizzazione e di una maggiore standardizzazione della definizione e della diagnosi del collasso delle colonie di api, per consentire un confronto dei dati su scala globale.

L'apicoltura oggi subisce questa emergenza sia in termini di impatto economico negativo dovuto alle perdite di api e al calo delle produzioni, sia per le implicazioni nella gestione tecnica e sanitaria degli apiari. Le fonti di stress e di contaminazioni a cui sono costantemente esposte le api concorrono a ridurre l'efficienza immunitaria, alterandone gli equilibri e la capacità di autodifesa a livello individuale e sociale. Per far fronte a questa situazione, si im-

ne un approccio più consapevole e qualificato all'apicoltura, orientato verso una maggiore sostenibilità sia in termini ambientali che di conduzione tecnico-sanitaria degli apiari secondo i principi della gestione integrata.

#### BIBLIOGRAFIA

- AIZEN M.A., HARDER L.D., 2009 – *The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination.* - *Curr. Biol.*, 19: 915-8.
- COX-FOSTER D.L., CONLAN S., HOLMES E.C., PALACIOS G., EVANS J.D. *et al.*, 2007 - *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder.* - *Science (Washington)*, 318: 283-286.
- DAINAT B., VANENGELSDORP D., NEUMANN P., 2012 - *Colony collapse disorder in Europe.* – *Environ. Microbiol. Rep.*, 4 (1): 123-125.
- HIGES, M., MARTIN, R., MEANA, A., 2006 – *Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe.* - *J. Invertebr. Pathol.*, 92: 81–83.
- KLEIN A.M., VAISSIÈRE B.E., CANE J.H., 2007 – *Importance of pollinators in changing landscapes for world crops.* - *Proc. Roy. Soc. Lond., B: Bio.*, 274: 303-13.
- MUTINELLI F., GRANATO A., 2007 – *La sindrome del collasso della colonia (Colony Collapse Disorder) negli USA. Un aggiornamento sulla situazione attuale.* - *Apoidea*, 4: 175-187.
- NAZZI F., BROWN S.P., ANNOSCIA D., DEL PICCOLO F., DI PRISCO G. *et al.*, 2012 – *Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies.* - *PLoS Pathogens*, 8 (6): e1002735. doi: 10.1371/journal.ppat.1002735.
- NEUMANN P., CARRECK N.L., 2010 – *Honey bee colony losses.* - *J. Apicult. Res.*, 49 (1): 1-6.
- RATNIEKS F.L.W., CARRECK N.L., 2010 – *Clarity on honey bee collapse?* - *Science*, 327: 152-153.
- ROSENKRANZ P., AUMEIER P., ZIEGELMANN B., 2010 – *Biology and control of Varroa destructor.* - *J. Invertebr. Pathol.*, 103: S96–S119.
- SGOLASTRA F., RENZI T., DRAGHETTI S., MEDRZYCKI P., LODESANI M., MAINI S., PORRINI C., 2012 – *Effects of neonicotinoid dust from maize seed-dressing on honey bees.* - *Bull. Insectology*, 65 (2): 273-280.
- UNDERWOOD R., VANENGELSDORP D., 2007 – *Colony collapse disorder: have we seen this before?* - *Bee Culture*, 35: 13-18.
- VANENGELSDORP D., EVANS J.D., SAEGERMAN C., MULLIN C., HAUBRUGE E., KIM NGUYEN B., FRAZIER M., FRAZIER J., COX-FOSTER D., CHEN Y., UNDERWOOD R., TARPY D.R., PETTIS J.S., 2009 - *Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study.* - *PLoS ONE*, 4 (8): e6481.
- VANENGELSDORP D., HAYES J., UNDERWOOD R.M., PETTIS J.S., 2010 – *A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009.* - *J. Apicult. Res.*, 49 (1): 7-14.

## API SELVATICHE: IMPORTANZA E PROBLEMATICHE

AULO MANINO (\*) - MARCO PORPORATO (\*)

(\*) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari - Università di Torino, Via Leonardo da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (Torino); aulo.manino@unito.it  
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 febbraio 2013.

### *Wild bees: importance and problems*

Bees live on resources they obtain from flowers and therefore they have evolved to adapt themselves to floral morphology, thus becoming the key pollinating agents for maintaining plant biodiversity. Beside the few species that are kept by man, wild species are of paramount significance at a global level, but they play an essential role in extremely difficult environments or on specific occasions. Climate changes, habitat reduction, landscape alterations, and crop system intensification have brought in the last few decades to a generalized wild bee decline, both as species number and insect abundance. Therefore serious concerns were raised about wild bee survival, and various initiatives and actions for their protection were stimulated.

KEY WORDS: Apoidea, biodiversity, decline, pollination, protection.

Le api sono un gruppo olofiletico di Imenotteri Aculeati, chiaramente riconoscibile per una serie di peculiari caratteri morfologici, comprendente forse 20.000 specie a livello mondiale (MICHENER, 2000), delle quali quasi 1.000 sono presenti in Italia (PAGLIANO, 1995). Dal punto di vista tassonomico le api vengono solitamente ascritte alla superfamiglia Apoidea (PAGLIANO, 1995), a volte da sole, o, più spesso, insieme con le vespe sfecoidi. In quest'ultimo caso la superfamiglia viene suddivisa in due famiglie, Sphecidae e Apidae, (GAULD e BOLTON, 1988) o in due serie, Spheciformes e Apiformes, ciascuna comprendente più famiglie (MICHENER, 2000); talvolta vengono invece adottate soluzioni intermedie (MITROIU, 2012; ATLAS HYMENOPTERA, 2013).

Le api, sia allo stadio adulto che in quello larvale, si nutrono quasi esclusivamente di nettare e di polline. Questa loro dipendenza trofica dalle piante a fiore è stata responsabile di un lungo processo di coevoluzione tra gli antenati delle specie attuali di api e i fiori, nel corso del quale le api hanno sviluppato strutture anatomiche e comportamenti che consentono loro di ottimizzare la raccolta di nettare e polline, mentre le piante hanno modificato la struttura dei fiori e la disponibilità di queste ricompense alimentari in modo da assecondare l'azione pronuba delle api. Per la raccolta del polline le api sono dotate di peli piumosi, o almeno ramificati, presenti più o meno abbondantemente su tutto il corpo, ma, in particolar modo, riuniti a formare scope sulle zampe (api podilgiche) o nella regione sternale dell'ad-

dome (api gastrogiche) delle femmine; in molti gruppi sono presenti anche strutture specializzate per il trasporto del polline dette cestelle o corbicole, le quali sono una caratteristica distintiva delle tribù Euglossini, Bombini, Meliponini e Apini, che formano, nel complesso, il gruppo delle cosiddette api corbicolate (MICHENER, 2000). L'apparato boccale delle api, partendo da una struttura simile a quella degli altri Imenotteri Aculeati, si è progressivamente specializzato, grazie a progressive modificazioni del complesso maxillo-labiale, per lambire e succhiare liquidi zuccherini; tra le specie attuali possono essere distinte quelle a proboscide corta (Stenotritidae, Colletidae, Andrenidae, Halictidae e Melittidae), con un apparato boccale più primitivo, da quelle a proboscide lunga (Megachilidae e Apidae), il cui apparato boccale altamente modificato consente di visitare efficacemente fiori a corolla tubulare non accessibili alle prime (MICHENER, 2000).

Nel corso della storia evolutiva delle api si sono più volte sviluppati comportamenti sociali, sì che ora esistono specie che esibiscono pressoché tutti i livelli di socialità noti per gli insetti (WILSON, 1971); le api selvatiche sono quindi un insostituibile campo di ricerca per gli studiosi di sociobiologia. Si va infatti dalle specie solitarie, in cui ogni femmina costruisce e approvvigiona i propri nidi pedotrofici (attività che, per altro, viene spesso già considerata di tipo presociale) a quelle subsociali, che prodigano cure parentali alle proprie larve; seguono le specie parasociali, con i successivi livelli comunitario, in cui due o più femmine utilizzano un nido comune pur

costruendo ognuna le proprie celle pedotrofiche e introducendovi le proprie uova, quasisociale, quando le celle sono approvvigionate in comune anche se molte femmine della società depongono uova, e semi-sociale, nel quale una femmina dominante monopolizza l'ovideposizione; si passa quindi alle specie primitivamente eusociali, che formano società temporanee, come quelle dei bombi, per giungere, infine, alle specie altamente sociali con le società permanenti delle api senza pungiglione e delle api mellifere (MICHENER, 2000).

La totale dipendenza delle api dai fiori comporta che le api sono, insieme con il vento, i più importanti agenti impollinatori, mentre acqua e altri animali pronubi svolgono un ruolo secondario, anche se essenziale in molti contesti specializzati. Pur essendo difficile quantificare l'apporto di api e vento nell'impollinazione della flora spontanea, le prime prevalgono nettamente nei climi tropicali e mediterranei, mentre il secondo assume maggior importanza in quelli temperati e freddi. In ogni caso il contributo delle api a livello ecosistemico non si limita al mantenimento della biodiversità vegetale, ma si esplica anche in una maggior disponibilità di frutti e semi per gli animali che se ne nutrono (O'TOOLE e RAW, 1991).

La stessa sopravvivenza dell'umanità dipende in larga misura dalle api come conseguenza dell'impollinazione delle colture (PESSON e LOUVEAUX, 1984; FREE, 1993). Le stime più attendibili portano a ritenere che il 15% degli alimenti di origine vegetale e circa altrettanto delle risorse foraggere impiegate in zootecnia (O'TOOLE e RAW, 1991) o, complessivamente, il 35% del cibo prodotto (KLEIN *et al.*, 2007) dipendano dall'impollinazione entomofila. A livello mondiale il valore complessivo degli alimenti di origine vegetale prodotti grazie all'azione dei pronubi e consumati direttamente dall'uomo ammonta a più di 150 miliardi di euro (GALLAI *et al.*, 2009); per l'Italia è disponibile una stima particolarmente accurata, anche se non recente, di circa 3.000 miliardi di lire (ACCORTI, 2000), cifra che meriterebbe forse un aggiornamento, almeno in termini monetari. In prospettiva, l'agricoltura rischia una crisi di disponibilità dei servizi di impollinazione a causa del costante aumento delle superfici coltivate, con la conseguente scomparsa degli ecosistemi naturali e del contributo dei pronubi selvatici, e della progressiva crescita della percentuale di tali superfici investita in colture che richiedono l'azione dei pronubi (AIZEN *et al.*, 2008).

Decine di specie di api, solitarie e sociali, sono state e vengono tuttora allevate per scopi applicativi, tra cui quello prevalente della produzione di miele, ma poche di esse forniscono un contributo di qualche rilievo all'impollinazione delle colture,

tanto che l'agricoltura mondiale si trova attualmente a dipendere in modo quasi esclusivo dalla sola *Apis mellifera* L. (CRANE, 1990). Il ricorso a specie allevate, soprattutto se aliene, può inoltre risultare rischioso per le api selvatiche a causa della competizione per le risorse disponibili e l'eventuale diffusione di agenti patogeni (GOULSON, 2003). Sarebbe quindi consigliabile cercare di trarre il massimo profitto dal servizio di impollinazione fornito dalle popolazioni naturali di api selvatiche.

In questi ultimi decenni si assiste, invece, a un progressivo declino degli impollinatori, che coinvolge pesantemente anche le api selvatiche (POTTS *et al.*, 2010). Purtroppo solo là dove esistono dati sufficientemente completi su composizione e abbondanza della fauna di api selvatiche è possibile verificare in modo inequivocabile il fenomeno e tentare di quantificarlo; di conseguenza esso appare particolarmente evidente in Europa Nord-occidentale e in America Settentrionale (BIESMEIJER *et al.*, 2006; PATINY *et al.*, 2009). Tuttavia, l'intensificarsi delle ricerche e il perfezionamento dei metodi di indagine (NIELSEN *et al.*, 2011; LEBUHN *et al.*, 2012) stanno evidenziando che si tratta di un fenomeno a scala planetaria, dovuto all'effetto combinato di una pluralità di cause (ROULSTON e GOODELL, 2011): i cambiamenti climatici in atto a livello globale e, soprattutto, il progressivo innalzamento delle temperature su gran parte delle terre emerse, con la conseguente modificazione delle cenosi vegetali; la trasformazione del paesaggio, insieme con la riduzione e frammentazione degli habitat adatti alla sopravvivenza delle api selvatiche; l'intensificazione delle pratiche agricole, che comporta l'eliminazione della flora spontanea, l'estensione delle monoculture e l'imponente impiego di prodotti fitosanitari. Appare quindi evidente quanto sia rilevante la componente antropica nel declino degli impollinatori (WINFREE *et al.*, 2009) e come sarebbe possibile contrastarlo con una migliore comprensione e valorizzazione dei servizi ecosistemici e con una gestione più sostenibile degli agroecosistemi e degli ambienti urbani (KREMEN *et al.*, 2007). Le api selvatiche necessitano essenzialmente di risorse alimentari, e quindi di fioriture idonee al loro sostentamento, durante tutta la stagione di attività e di siti di nidificazione non disturbati dalle attività umane; entrambe queste necessità possono, almeno in parte, essere soddisfatte da interventi diretti da parte degli agricoltori o, più in generale, di tutti coloro che hanno a cuore la conservazione della natura (O'TOOLE e RAW, 1998; TERZO e RASMONT, 2007). Per questo motivo, ricercatori delle Università di Pisa, Catania, Sassari, Torino e Udine, che da tempo si interessano delle api selvatiche, hanno recentemente dato vita a un

Gruppo di lavoro su Pronubi e Ambiente al fine di promuovere e sviluppare in comune la ricerca sull'impollinazione delle piante coltivate e spontanee, nonché sugli organismi impollinatori.

#### RIASSUNTO

Le api vivono essenzialmente di risorse che ottengono dai fiori e si sono pertanto evolute per adattarsi alla morfologia florale, diventando così i pronubi più importanti per il mantenimento della biodiversità vegetale. Accanto alle poche specie allevate dall'uomo, le specie selvatiche sono di fondamentale importanza a livello globale, ma il loro ruolo diviene essenziale in ambienti particolarmente difficili o in situazioni specifiche. Negli ultimi decenni, i cambiamenti climatici, la riduzione degli habitat, la modificazione del paesaggio e l'intensificazione delle pratiche agricole hanno provocato un generale declino delle api selvatiche sia come numero di specie sia come abbondanza di individui, destando serie preoccupazioni per la sopravvivenza di questi insetti e stimolando iniziative e interventi per la loro salvaguardia.

#### BIBLIOGRAFIA

- ACCORTI M., 2000 – *Impollinatori, economia e gestione delle risorse*. In: Api e impollinazione, Pinzauti M. Ed., Regione Toscana: Edizioni della Giunta Regionale, Firenze, pp.219-231.
- AIZEN M.A., GARIBALDI L.A., CUNNINGHAM S.A., KLEIN A.M., 2008 – *Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency*. - *Curr. Biol.*, 18: 1572-1575.
- ATLAS HYMENOPTERA, 2013 – <http://www.atlashymenoptera.net/start.htm>.
- BIESMEIJER J.C., ROBERTS S.P.M., REEMER M., OHLEMÜLLER R., EDWARDS M., PEETERS T., SCHAFFERS A.P., POTTS S.G., KLEUKERS R., THOMAS C.D., SETTELE J., KUNIN W.E., 2006 – *Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands*. - *Science*, 313: 351-354.
- CRANE E., 1990 – *Bees and beekeeping: science, practice and world resources*. Heinemann Newnes, Oxford, XVII+614 pp.
- FREE J.B., 1993 – *Insect Pollination of Crops*. Second Edition. Academic Press, London, XII+684 pp.
- GALLAI N., SALLES J.M., SETTELE J., VAISSIERE B.E., 2009 – *Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline*. - *Ecol. Econom.*, 68: 810-821.
- GAULD I., BOLTON B., 1988 – *The Hymenoptera*. Oxford University Press, Oxford, XI+332 pp.
- GOULSON D., 2003 – *Effects of introduced bees on native ecosystems*. - *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34: 1-26.
- JONES R., MUNN P. (Eds.), 1998 – *Habitat management for wild bees and wasps*. International Bee Research Association, Cardiff, 38 pp.
- KLEIN A.M., VAISSIERE B.E., CANE J.H., STEFFAN-DEWENTER I., CUNNINGHAM S.A., KREMEN C., TSCHARNTKE T., 2007 – *Importance of pollinators in changing landscapes for world crops*. - *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, 274: 303-313.
- KREMEN C., WILLIAMS N.M., AIZEN M.A., GEMMILL-HERREN B., LEBUHN G., MINCKLEY R., PACKER L., POTTS S.G., ROULSTON T., STEFFAN-DEWENTER I., VAZQUEZ D.P., WINFREE R., ADAMS L., CRONE E.E., GREENLEAF S.S., KEITT T.H., KLEIN A.M., REGETZ J., RICKETTS T.H., 2007 – *Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change*. - *Ecol. Lett.*, 10: 299-314
- LEBUHN G., DROEGE S., CONNOR E.F., GEMMILL-HERREN B., POTTS S.G., MINCKLEY R.L., GRISWOLD T., JEAN R., KULA E., ROUBIK D.W., CANE J., WRIGHT K.W., FRANKIE G., PARKER F., 2012 – *Detecting Insect Pollinator Declines on Regional and Global Scales*. - *Cons. Biol.*, 27: 113-120.
- MICHENER C.D., 2000 – *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, XIV+913 pp.
- MITROIU M.D., 2012 – *Hymenoptera, Apoidea*. Fauna Europaea version 2.5, <http://www.faunaeur.org>
- O'TOOLE C., RAW A., 1991 – *Bees of the world*. Blandford. London, 192 pp.
- NIELSEN A., STEFFAN-DEWENTER I., WESTPHAL C., MESSINGER O., POTTS S.G., ROBERTS S.P.M., SETTELE J., SZENTGYÖRGYI H., VAISSIERE B.E., VAITIS M., WOYCIECHOWSKI M., BAZOS I., BIESMEIJER J.C., BOMMARCO R., KUNIN W.E., TSCHULIN T., LAMBORN E., PETANIDOU T., 2011 – *Assessing bee species richness in two Mediterranean communities: importance of habitat type and sampling techniques*. - *Ecol. Res.*, 26: 969-983.
- PAGLIANO G., 1995 – *Hymenoptera Apoidea*. In: Checklist delle specie della fauna italiana, Minelli A., Ruffo S. & La Posta S. Ed., Fasc. 106, Edizioni Calderini, Bologna, 25 pp.
- PATINY S., PIERRE RASMONT P., MICHEZ D., 2009 – *A survey and review of the status of wild bees in the West-Palaearctic region*. - *Apidologie*, 40: 313-331.
- PESSON P., LOUVEAUX J. (Eds.), 1984 – *Pollinisation et productions végétales*. INRA, Paris, XV+664 pp.
- POTTS S.G., BIESMEIJER J.C., KREMEN C., NEUMANN P., SCHWEIGER O., KUHN W.E., 2010 – *Global pollinator declines: trends, impacts and drivers*. - *Trends Ecol. Evol.*, 25 :345-353.
- ROULSTON T.H., GOODELL K., 2011 – *The Role of Resources and Risks in Regulating Wild Bee Populations*. - *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 293-312.
- TERZO M., RASMONT P., 2007 – *Abeilles sauvages, bourdons et autres insectes pollinisateurs*. Les Livrets de l'Agriculture, 14, DGA, Ministère de la Région Wallonne, Namur, 64 pp.
- WILSON E.O., 1971 – *The insect societies*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, X+548 pp.
- WINFREE R., AGUILAR R., VAZQUEZ D.P., LEBUHN G., AIZEN M.A., 2009 – *A meta-analysis of bees' response to anthropogenic disturbance*. - *Ecology*, 90: 2068-2076.



## AGENTI DI STRESS E COLLASSO DELLE COLONIE D'API

FRANCESCO NAZZI (\*) - FRANCESCO PENNACCHIO (\*\*)

(\*) Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine, via delle Scienze 206, 33100 Udine, Italy.

(\*\*) Dipartimento di Agraria - BiPAF, Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay", Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Università 100, 80055 Portici (Napoli), Italy.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 febbraio 2013.

### *Interactions between biotic stress agents and the collapse of honeybee colonies*

The collapse of honeybee colonies represents a poorly understood problem of global importance. Here we describe how the parasitic mite *Varroa destructor* can destabilize the delicate balance between the deformed wing virus and the immune system of the honeybee, causing a fatal transition from a benign covert infection to a devastating viral outbreak.

KEY WORDS: *Apis mellifera*, deformed wing virus, immunity, synergistic interactions, *Varroa destructor*

Il collasso delle colonie d'api rappresenta un problema di grande importanza non solo per l'apicoltura ma anche per l'agricoltura nel suo complesso, in considerazione dell'attività impollinatrice svolta da questi insetti a favore di molte colture agrarie (KLEIN *et al.*, 2007). Per affrontare questo problema, che è stato oggetto di molte ricerche (RATNIEKS e CARRECK, 2010), conviene, innanzitutto, porre alcune domande di base, ovvero: cos'è il collasso delle colonie d'api, chi lo causa e come avviene.

In questa sede è superfluo soffermarsi sulla prima domanda, di cui si occupano altri autori in questo stesso volume (FLORIS e SATTÀ, 2013), salvo per specificare che, di seguito, non si parlerà di Colony Collapse Disorder (CCD), un problema apparentemente limitato agli Stati Uniti (VAN ENGELSDORP *et al.*, 2009). Nella presente comunicazione, invece, si parlerà, più in generale, del collasso delle colonie d'api, un fenomeno ben noto in Europa assai prima dell'avvento del CCD e che comporta annualmente perdite dell'ordine del 20-30% degli alveari (NEUMANN e CARRECK, 2010).

Per quanto riguarda le cause del collasso, dopo molti anni e parecchi studi, disponiamo di dati piuttosto robusti che indicano come, nella maggior parte dei casi, si registra il coinvolgimento di uno o più parassiti (tra cui l'acaro *Varroa destructor* e il virus delle ali deformi) e come ulteriori fattori possono concorrere ad aggravare il fenomeno (NEUMANN e CARRECK, 2010; GENERSCH *et al.*, 2010).

L'aspetto tuttora meno esplorato riguarda, invece, il modo in cui avviene il collasso, senza dubbio perché, dal principio, la maggior parte delle energie sono state indirizzate nella ricerca delle cause, che è stata

ritenuta prioritaria in vista della individuazione di possibili rimedi. Inoltre, i dati sul "come" sono tuttora piuttosto scarsi, poiché la maggior parte degli studi condotti fin qui sono stati di tipo correlativo. In questo caso, colonie collassate venivano confrontate con colonie ancora sane per individuare le possibili cause del fenomeno (si veda, ad esempio, COX-FOSTER *et al.*, 2006). In questo modo, la storia pregressa dell'alveare veniva ignorata e molte importanti informazioni venivano trascurate (LE CONTE *et al.*, 2010). Invece, negli studi di tipo longitudinale, le condizioni degli alveari vengono registrate periodicamente fino al sopraggiungere del collasso, che può essere provocato regolando, ad esempio, il tasso di infestazione della *Varroa* (Fig. 1); è quanto fatto nel corso di un esperimento i cui risultati sono stati pubblicati recentemente (NAZZI *et al.*, 2012). In questa nota si riassumono le principali conoscenze acquisite con questo studio, che hanno consentito di elaborare un modello di analisi delle possibili interazioni fra agenti di stress delle api.

In colonie non sottoposte a trattamenti acaricidi, a causa del peculiare ciclo biologico dell'acaro, l'infestazione da parte di *V. destructor* tende progressivamente ad aumentare con il passar del tempo; la consistenza della colonia d'api, invece, tende, in generale, a calare e tale declino accelera bruscamente alla fine dell'estate. L'esito di questo calo accelerato della forza della colonia è, per l'appunto, una popolazione d'api inferiore al livello di sostenibilità della famiglia (Fig. 2A) e il conseguente collasso che, nei nostri climi, si verifica, di solito, durante l'autunno o all'inizio della primavera successiva. Il declino accelerato delle colonie molto infestate è correlato

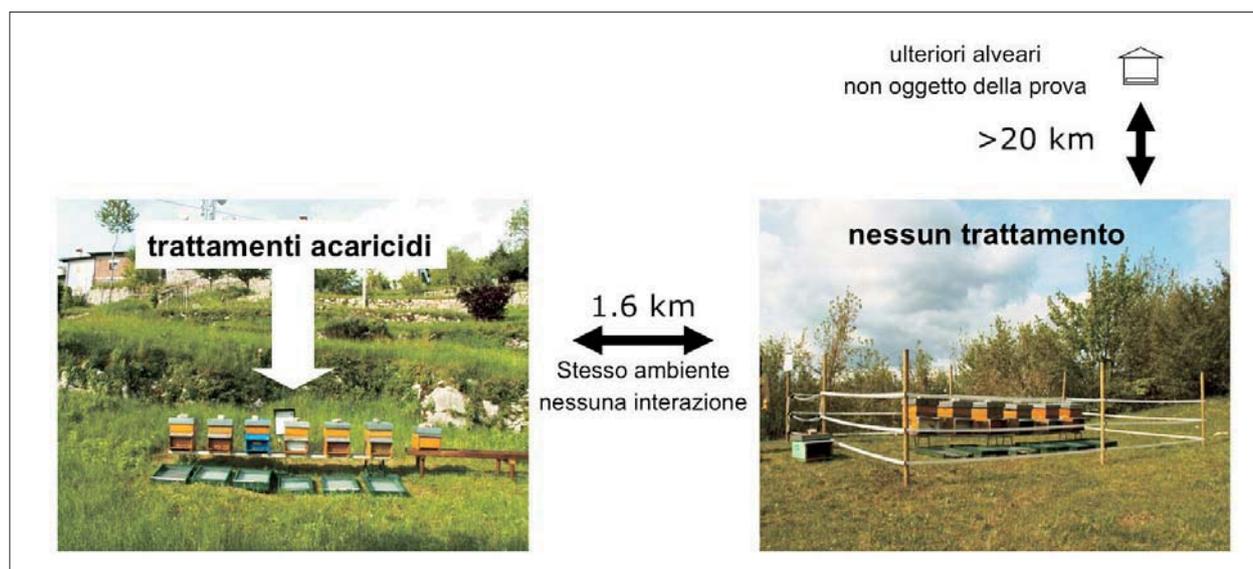


Fig. 1

Nell'esperimento longitudinale descritto nel testo sono stati confrontati due gruppi di colonie: in un gruppo l'infestazione da Varroa era mantenuta sotto controllo mediante trattamenti acaricidi, nell'altro la popolazione dell'acaro poteva aumentare liberamente.

alla mortalità delle api che aumenta bruscamente alla fine dell'estate (Fig. 2B). La mortalità delle api, a sua volta, raggiunge il picco in corrispondenza della massima infestazione. Tuttavia i due fenomeni presentano un decorso piuttosto diverso, poiché ad alti livelli d'infestazione non corrisponde necessariamente un'elevata mortalità delle api (Fig. 3A).

Se si considera la prevalenza del virus delle ali deformi, si può notare come, anche in questo caso, il picco di mortalità coincide con la massima diffusione del virus all'interno dell'alveare (Fig. 3B). Tuttavia, anche in alveari non particolarmente infestati, si osservano prevalenze elevate e non coincidenti con la mortalità delle api. Viceversa, se si considera la quantità di particelle virali presenti nelle api degli alveari molto infestati, si può notare come, in questi ultimi, il picco di mortalità coincide proprio con il picco dell'infezione, che assume valori migliaia di volte superiori a quelli registrati in precedenza negli stessi alveari e contemporaneamente negli alveari poco infestati (Fig. 3C).

Prima però di accettare la correlazione fra infezione virale e mortalità delle api occorre verificare sperimentalmente tale legame in laboratorio. Allo scopo, si possono iniettare larve d'ape con dosi crescenti di un lisato di api sintomatiche per osservare la sopravvivenza delle api adulte così ottenute (Fig. 4A). In effetti, le api infettate artificialmente mostrano i sintomi dell'infezione e, soprattutto, sopravvivono meno a lungo (Fig. 4B). Anche la correlazione fra infestazione da parte della Varroa e infezione virale, però, deve essere dimostrata. In questo caso, si possono infestare artificialmente larve d'ape con una o più varroe per verificare il

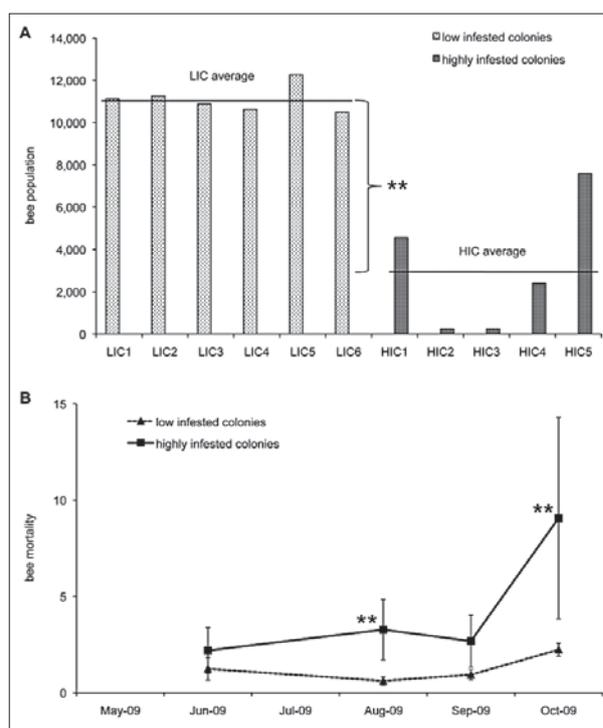


Figura 2

Le colonie molto infestate (highly infested colonies) presentano, a fine stagione, un numero di api molto ridotto in confronto alle colonie dove l'infestazione è stata controllata tramite interventi acaricidi (low infested colonies) (A). La drastica riduzione della popolazione nelle colonie molto infestate dipende dall'incremento di mortalità delle api che si registra a fine stagione (B) (NAZZI *et al.*, 2012).

tasso di infezione virale mediante PCR real time quantitativa (Fig. 5A). Operando in questo modo, si può verificare come il tasso di infezione cresca al crescere del numero di parassiti che infestano l'ape (Fig. 5B).

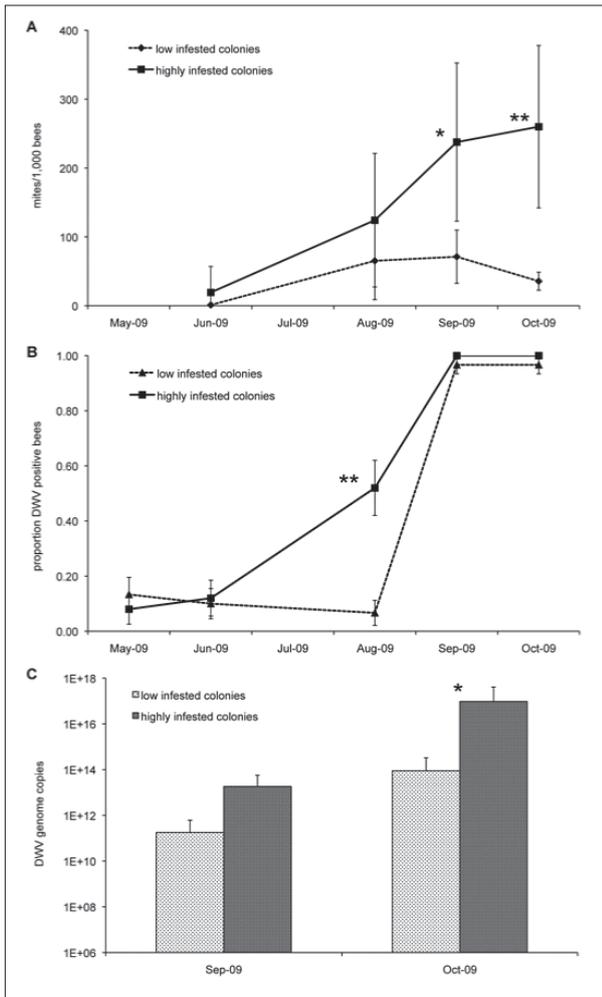


Fig. 3

l'infestazione da *Varroa* raggiunge, a fine stagione, nelle colonie non trattate, livelli particolarmente elevati (A) parallelamente ad un aumento della prevalenza del virus delle ali deformi che però aumenta altrettanto nelle colonie poco infestate (B). Invece, la quantità di copie virali risulta, a fine stagione, molto maggiore nelle colonie molto infestate (C) (NAZZI *et al.*, 2012).

Lo studio delle api provenienti dagli alveari molto infestati, in corrispondenza del picco di mortalità, effettuato mediante RNAseq (una tecnica che permette di verificare il livello di espressione di tutti i geni dell'organismo oggetto di studio), dimostra come un certo numero di geni immunitari siano sottoespressi in condizioni di elevata infezione. Tra questi geni ve ne è uno, *Dorsal 1A*, che appartiene alla famiglia NF- $\kappa$ B. Questo gene è coinvolto sia nella risposta antivirale sia nei processi di melanizzazione e coagulazione che vengono stimolati dalla parassitizzazione da parte dell'acaro (EVANS *et al.*, 2006; LEMAITRE e HOFFMAN, 2007).

L'importanza di *Dorsal 1A* nella risposta antivirale può essere verificata inibendone l'espressione mediante RNAi (RNA interference); in questo caso, si ottiene un incremento del numero di copie virali

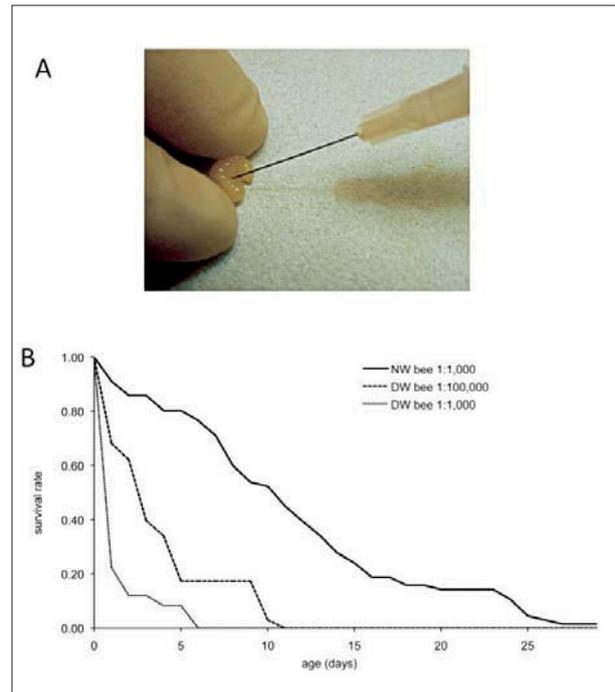


Fig. 4

Per verificare la correlazione fra infezione virale e mortalità delle api si possono iniettare larve d'ape con dosi crescenti di un lisato di api sintomatiche per osservare la sopravvivenza delle api adulte così ottenute (A: foto D. Annoscia). Le api infestate artificialmente sopravvivono meno a lungo di quelle non infestate (B: NAZZI *et al.*, 2012).

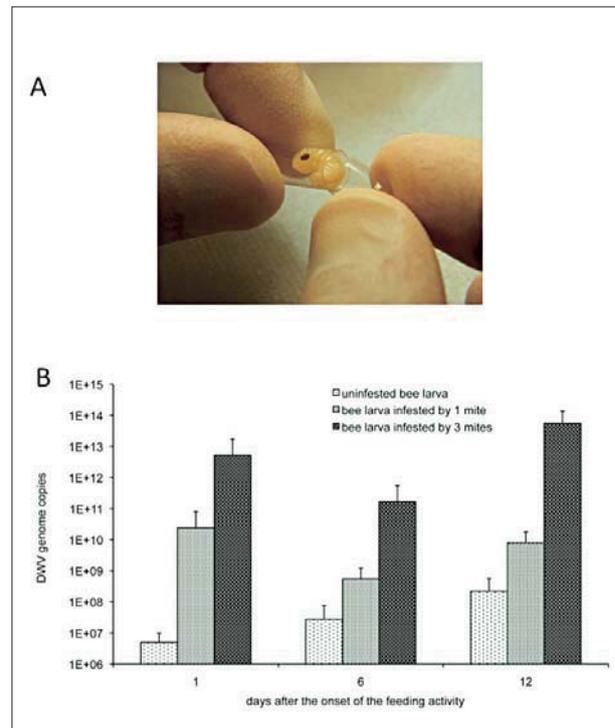


Figura 5

Per dimostrare la correlazione fra infestazione da *Varroa* e infezione virale, si possono infestare artificialmente larve d'ape con una o più varroe e verificare il tasso di infezione virale mediante PCR real time quantitativa (A: foto D. Annoscia). Operando in questo modo, si può verificare come il tasso di infezione cresca al crescere del numero di parassiti che infestano l'ape (B: NAZZI *et al.*, 2012).

nelle api trattate. Il ruolo di *Dorsal 1A* nei confronti della *Varroa*, invece, può essere meglio compreso considerando il fatto che tutti gli stadi di sviluppo dell'acaro si nutrono attraverso lo stesso foro di alimentazione, per tutta la durata della fase opercolata, e che questo fattore trascrizionale è coinvolto nell'attivazione della risposta di coagulazione e melanizzazione, in grado di interferire in modo significativo con l'attività trofica.

Possiamo pensare a questo gene come a uno snodo cruciale del sistema immunitario dell'ape. L'esistenza di simili nodi rende il classico approccio allo studio delle patologie dell'ape non molto adatto e richiede invece un'analisi di tipo multifattoriale, in cui i parassiti sono considerati nel loro complesso invece che singolarmente. In quest'ottica, può essere sviluppato un modello delle interazioni che hanno luogo tra l'ape ed il complesso dei suoi parassiti (Fig. 6). Al centro del modello c'è il sistema immunitario dell'ape; esso interagisce con il virus e l'interazione è biunivoca, nel senso che NF-kB può attivare meccanismi di contenimento della replicazione virale, mentre il virus può adottare un meccanismo di virulenza blanda, basato sulla modulazione trascrizionale negativa di *Dorsal 1A*. In queste condizioni si può instaurare un equilibrio stabile che dà luogo alle caratteristiche infezioni latenti e asintomatiche che si osservano nell'ape (DE MIRANDA e GENERSCH, 2010).

Quando a questo scenario si aggiunge la *Varroa*, accade che l'attività trofica e la conseguente risposta immunitaria impegnano questo fattore trascrizionale per l'attivazione di altre risposte di difesa. In questo modo, il virus sfugge al controllo della componente antivirale del sistema immunitario, e si innesca una replicazione che, sostenuta dall'effetto inibitorio del virus su *Dorsal 1A*, accelera progressivamente.

La conseguente esplosione virale determina un incremento della mortalità delle api e un repentino spopolamento degli alveari, ovvero il collasso di cui è detto all'inizio.

Il modello che è stato presentato prevede la possibilità che ulteriori agenti di stress, similmente al parassita *V. destructor*, influendo a loro volta sul sistema immunitario, possano interferire con il delicato equilibrio che presiede alle infezioni virali latenti.

In particolare, lo studio dell'effetto dei pesticidi ha permesso di rivelare interazioni molto interessanti fra questi ultimi e il sistema immunitario dell'ape, che risulta fortemente influenzato anche dalle condizioni nutrizionali. Pertanto, l'esposizione a particolari insetticidi e regimi alimentari inadeguati possono interferire con la risposta immunitaria dell'ape, esponendola alle possibili gravi conseguenze di patologie virali fuori controllo (DI PRISCO *et al.*, 2013).

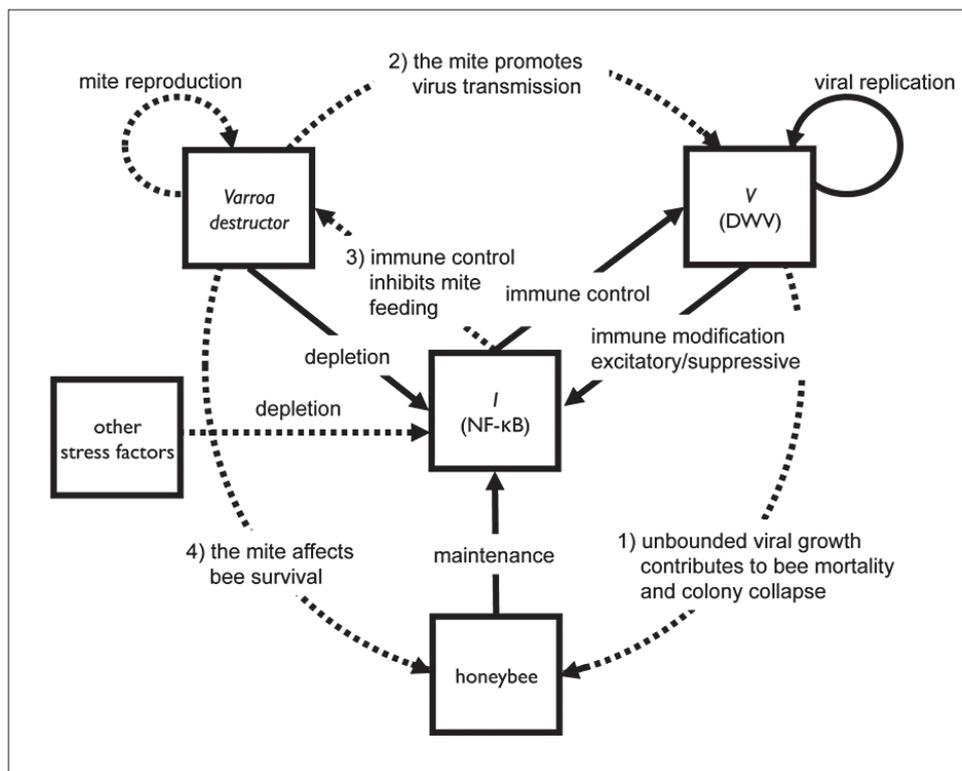


Fig. 6  
Un modello delle interazioni multiple nel sistema ape (NAZZI *et al.*, 2012).

## RIASSUNTO

Il collasso delle colonie d'api è un problema di importanza globale che non è ancora stato spiegato nel dettaglio. In questa nota si presentano alcune recenti acquisizioni in materia di interazioni fra fattori stress biotico e salute delle api. In particolare, si descrive il modo in cui l'acaro parassita *Varroa destructor* riesce a destabilizzare il delicato equilibrio tra il virus delle ali deformi e il sistema immunitario dell'ape, determinando la transizione da infezioni latenti relativamente innocue a devastanti esplosioni virali.

## BIBLIOGRAFIA

- CONTE Y.L., ELLIS M., RITTER W., 2010 – *Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?* - Apidologie, 41: 353-363.
- COX-FOSTER D.L., CONLAN S., HOLMES E.C., PALACIOS G., EVANS J.D., MORAN N.A., QUAN P.L., BRIESE T., HORNIG M., GEISER D.M., MARTINSON V., VAN ENGELSDORP D., KALKSTEIN A.L., DRYSDALE A., HUI J., ZHAI J.H., CUI L.W., HUTCHISON S.K., SIMONS J.F., EGHOLM M., PETTIS J.S., LIPKIN W.I., 2007 – *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*. - Science, 318: 283-287.
- DE MIRANDA J.R., GENERSCH H.E., 2010 – *Deformed wing virus*. - J. Invertebr. Pathol., 103: S48-S61.
- DI PRISCO G.D., CAVALIERE V., ANNOSCIA D., VARRICCHIO P., CAPRIO E., NAZZI F., GARGIULO G., PENNACCHIO F., 2013 – *Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees*. - PNAS, 110 (46): 18466-18471.
- EVANS J.D., ARONSTEIN K., CHEN Y.P., HETRU C., IMLER J.L., JIANG H., KANOST M., THOMPSON G. J., ZOU Z., HULTMARK D., 2006 – *Immune pathways and defence mechanisms in honey bees Apis mellifera*. - Insect Mol. Biol., 15: 645-656.
- FLORIS I., SATTÀ A., 2013 – *Il collasso delle colonie e l'apicoltura oggi*. - Atti Acc. Naz. It. Ent. LXI, questo volume: 69-72.
- GENERSCH E., OHE W. VON DER, KAATZ H., SCHROEDER A., OTTEN C., BERG S., RITTER W., GISDER S., MEIXNER M., LIEBIG G., ROSENKRANZ P., 2010 – *The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies*. - Apidologie, 41: 332-352.
- KLEIN A.M., VAISSIÈRE B.E., CANE J.H., STEFFAN-DEWENTER I., CUNNINGHAM S.A., KREMEN C., TSCHARNTKE T., 2007 – *Importance of pollinators in changing landscapes for world crops*. - Proc. R. Soc. B, 274: 303-313.
- LEMAITRE B., HOFFMANN J., 2007 – *The host defense of Drosophila melanogaster*. - Annu. Rev. Immunol., 25: 697-743.
- NAZZI F., BROWN S.P., ANNOSCIA D., DEL PICCOLO F., DI PRISCO G., VARRICCHIO P., DELLA VEDOVA G., CATTONARO F., CAPRIO E., PENNACCHIO F., 2012 – *Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies*. - PLoS Pathog., 8, e1002735.
- NEUMANN P., CARRECK N.L., 2010 – *Honey bee colony losses*. - J. Apic. Res., 49: 1-
- RATNIEKS F.L.W., CARRECK N.L., 2010 – *Clarity on honey bee collapse?* - Science, 327: 152-153.
- VANENGELSDORP D., EVANS J.D., SAEGERMAN C., MULLIN C., HAUBRUGE E., NGUYEN B.K., FRAZIER M., FRAZIER J., COX-FOSTER D., CHEN Y., UNDERWOOD R., TARPY D.R., PETTIS, J.S., 2009 – *Colony collapse disorder: a descriptive study*. - PLoS ONE 4, e6481.



## RELAZIONI TRA MICRORGANISMI E APOIDEI (HYMENOPTERA APOIDEA)

RINALDO NICOLI ALDINI (\*)

(\*) Istituto di Entomologia e Patologia vegetale, Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza; rinaldo.nicoli@unicatt.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 15 febbraio 2013.

### *Relationships between microorganisms and bees (Hymenoptera Apoidea)*

The relationships between microorganisms and bees include very different types of associations or interactions. Pathogens are a very relevant group of microorganisms, establishing an antagonistic and often lethal relationship with the bees, although sometimes the relation is characterized by lower virulence and, in the case of some viruses, also by chronic persistence of the pathogen, in a latent state, through several generations of the host. Some protozoa, fungi, bacteria and viruses are pathogenic for bees. Nowadays much research regarding bee health focuses on some pathogens (the microsporidian *Nosema* as well as the deformed wing virus (DWV) and other viruses) due to their possible correlation with honeybee mortality, colony population decline, colony collapse in a wide sense, and pollinator decline in ecosystems. Singly or in association with each other and, in the case of the honeybee, in connection with infestations by *Varroa destructor*, the pathogens can represent the cause or a contributing factor of these worrying phenomena. Other types of relationships, either helpful, noxious or neutral for the survival and health of bees, are those established with commensal microorganisms, mutualistic symbionts, symbionts manipulating host reproduction, microorganisms associated with cell provisions and, outside the field of bee health, phytopathogenic microorganisms accidentally carried by bees, and microorganisms antagonistic to phytopathogens, associated by man with bees for biological control purposes. The communities of commensals and symbionts hosted in the gut of *Apis mellifera* are particularly noteworthy, as their balance plays an important role in the health of the honeybee, including inhibition of pathogen development.

KEY WORDS: bee pathogens, *Nosema*, viruses, symbiotic bacteria, bee health.

### INTRODUZIONE

Le relazioni che intercorrono tra microrganismi e Apoidei sono molteplici ed eterogenee. Microrganismi di primaria importanza sono i patogeni, che stabiliscono con gli Apoidei un rapporto, per lo più temporaneo, di tipo antagonistico, con esito non di rado infausto per l'insetto. Le avversità microbiche di questi Aculeati sono numerose e talora molto gravi a causa dell'elevata infettività e virulenza, tali da comprometterne, in particolare per l'ape mellifera (*Apis mellifera*) (GENERSCH, 2010a; JAMES e LI, 2012), il benessere e la sopravvivenza stessa.

A causa del loro insostituibile ruolo di impollinatori e, nel caso dell'ape e di poche altre specie allevate, anche a motivo del miele e degli altri prodotti forniti, la buona salute degli Apoidei ha ricadute positive di enorme portata, a livello mondiale, sulla salvaguardia degli ecosistemi e della biodiversità, sulla produttività delle colture e sull'economia umana (MICHENER, 2007; MANINO e PORPORATO, 2013). Alcuni Apoidei (soprattutto Apidi del genere *Bombus*, Megachilidi dei generi *Megachile* e *Osmia*) sono allevati e rilasciati in ambiente protetto o in campo per la loro funzione pronuba (MACCAGNANI

e FELICOLI, 2005). Pertanto vi è concreto interesse anche per la patologia microbica di questi altri ausiliari, nonché per le malattie, meno note, di altri pronubi selvatici, ai quali si guarda oggi con crescente attenzione anche a causa della loro attività potenzialmente suppletiva, parzialmente compensatrice dell'attuale crisi demografica delle popolazioni di *A. mellifera* (ROULSTON e GOODELL, 2011).

### TIPICI DI RELAZIONI

Come si è detto, le relazioni tra microrganismi e Apoidei sono molto eterogenee, vantaggiose, svantaggiose o 'neutre', a seconda dei casi, in ordine alla sopravvivenza e al benessere di questi Imenotteri. Oltre ai microrganismi *patogeni*, di cui si tratterà più oltre, vi sono i *commensali* e i *simbionti mutualisti*, i *simbionti manipolatori riproduttivi*, gli *associati alle provviste* e, a margine perché esulano per lo più dalla tematica della salute degli Apoidei, i *fitopatogeni veicolati da Apoidei*, nonché gli *antagonisti di fitopatogeni* o di *parassiti*, *associati artificialmente ad Apoidei* dall'uomo per finalità di controllo biologico. In particolare, alcuni simbionti possono costi-

tuire una promettente risorsa per il controllo di agenti patogeni degli Apoidei: su di essi convergono oggi ricerche d'interesse anche applicativo.

#### *Commensali, simbiotici mutualisti, manipolatori riproduttivi*

Alcuni microrganismi sono commensali di Apoidei o stabiliscono con essi simbiosi mutualistiche. Lo studio di tali associazioni non dannose o vantaggiose per gli Apoidei ha ricevuto impulso soprattutto in anni recenti, grazie anche allo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche, applicate principalmente all'ape mellifera e al suo canale alimentare. L'ape ospita nel tratto alimentare una popolazione di microrganismi simbiotici o commensali interagenti tra loro, il cui equilibrio gioca un ruolo importante sulla salute dell'insetto, con implicazioni positive sia sul piano nutrizionale sia per il ruolo svolto nell'inibire lo sviluppo di patogeni (ad esempio *Paenibacillus*, *Melissococcus*), con varie modalità (esclusione competitiva, produzione di sostanze antimicrobiche, modificazione del pH, stimolazione del sistema immunitario) (ALMA e GONELLA, 2012). Fattori biotici e abiotici che perturbano l'equilibrio dei simbiotici possono causare dismicrobismi (disbiosi) e squilibri in grado di favorire l'insorgenza di stati patologici di natura infettiva (HAMDI *et al.*, 2011).

Studi sulla microflora intestinale di *A. mellifera*, mediante tecniche di coltura microbica, hanno evidenziato nel suo tratto alimentare *Bacillus* spp. e altre Enterobatteriacee, miceti dei generi *Penicillium* e *Aspergillus*, nonché lieviti, questi ultimi correlabili a situazioni di stress nell'ospite (GILLIAM, 1997). Indagini fondate anche su metodi diagnostici molecolari indipendenti dalla coltivazione (BABENDREINER *et al.*, 2007; PATIL *et al.*, 2010; ANDERSON *et al.*, 2011) hanno messo in luce una comunità microbica costituita da batteri tra i quali Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria; alcuni di questi ultimi sono ben noti per la capacità di produrre sostanze antibiotiche. Di particolare interesse sono microrganismi acidofili quali i batteri acetici e lattici; i lattici esercitano anche nell'ape una funzione utile nel mantenimento di una microflora sana e nell'immunomodulazione. Tra i secondi sono stati identificati nell'intestino di ape mellifera *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (MARTINSON *et al.*, 2011; VÁSQUEZ *et al.*, 2012); tra i batteri acetici sono rappresentati i generi *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Saccharibacter*. L'intestino dell'ape ha alto tasso zuccherino e pH tendenzialmente basso ed è pertanto ambiente ottimale per batteri lattici e acetici. Alterazioni nella composizione della microflora dell'intestino dell'ape, indotte da cause varie, indebolendo il sistema immunitario rendono probabilmente più suscettibile l'insetto a malattie di varia natura (ad esempio

batteriche e virali). Per il contenimento e soprattutto la prevenzione di infezioni batteriche, come la peste americana ed europea, l'uso di batteri probiotici, mediante alimentazione di larve con ceppi di batteri lattici, sembra essere una strategia promettente perché permette di modulare la loro omeostasi intestinale (YOSHIYAMA e KIMURA, 2009; ALMA e GONELLA, 2012).

Anche in *Bombus* e *Osmia* è stata evidenziata una variegata microflora intestinale che include batteri acidofili (MOHR e TEBBE, 2006). Sembra che api e bombi ricavino i batteri acidofili sia ereditandoli 'verticalmente' per via materna, sia acquisendoli e trasmettendoli 'orizzontalmente' da fonti ambientali, ad esempio i fiori (McFREDERICK *et al.*, 2012). Altri batteri comuni e recentemente studiati nel tratto alimentare dell'ape mellifera e di bombi (*Bombus terrestris*), come *Snodgrassella alvi* (Betaproteobacteria) e *Gilliamella apicola* (Gammaproteobacteria), possono essere trasmessi dalla colonia madre alle regine figlie; il contatto sociale con i compagni di nido dopo lo sfarfallamento ne favorisce la trasmissione e diffusione (KOCH *et al.*, 2013).

Altri simbiotici, detti 'egoisti', sono i manipolatori riproduttivi, capaci di influire sulla sessualità e la riproduzione dell'ospite, sbilanciandole a favore della propria trasmissione e diffusione nella popolazione dell'insetto, con vari meccanismi. Si tratta di procarioti intracellulari del genere *Wolbachia* (Rickettsiales), ampiamente diffusi negli artropodi (ALMA e GONELLA, 2012). L'infezione è trasmessa 'verticalmente' per via materna, con il citoplasma dell'uovo. Numerosi generi e specie di Apoidei appartenenti a varie famiglie (Colletidi, Andrenidi, Alittidi, Melittidi, Megachilidi, Apidi) ospitano tali microrganismi, che sembra possano, almeno in certi casi, fornire alcuni vantaggi all'ospite (GERTH *et al.*, 2011).

#### *Microrganismi associati alle provviste*

Quelli associati alle provviste sono, secondo i casi, microrganismi dannosi o utili. Le muffe sono un rischio significativo per quasi tutti gli Apoidei. È possibile che le muffe sulle provviste (come anche sulle larve) siano la principale causa di mortalità preimmaginale per molte specie che nidificano nel terreno in climi fresco-umidi (BATRA *et al.*, 1973). La complessa comunità di microrganismi (miceti e batteri) evidenziata, ad esempio, nelle celle pedotrofiche di *Megachile rotundata* può contribuire a favorire la fermentazione delle provviste e lo sviluppo di muffe (GOERZEN, 1991). Per *A. mellifera* è ben nota la 'muffa del polline', provocata dall'Ascomicete *Betsia alvei* (= *Ascosphaera alvei*) le cui spore in condizioni ambientali favorevoli germinano ricoprendo la superficie e invadendo la massa

del polline. In periodo invernale la muffa del polline talora può risultare fatale alla colonia (CONTESSI, 1990; CAMPANO *et al.*, 1999).

Gli Apoidei peraltro possono ridurre preventivamente gli attacchi di muffe o batteri sulle provviste diffondendo una microflora competitiva. Ad esempio, le masse di cibo nelle celle degli Apidi Antoforini *Anthophora* e *Amegilla* sono arricchite di lieviti che svolgono una funzione protettiva (MICHENER, 1974). Il polline raccolto e immagazzinato dalle *Apis* ha una microflora diversa (ricca di miceti e di *Bacillus*) da quella del polline florale (GILLIAM, 1997), ed è in parte preservato grazie all'abbondanza di *Lactobacillus* provenienti, come si è detto, o dalle api stesse o da fonti ambientali: la produzione di acido lattico e la conseguente modifica del pH riducono l'attacco di altri microrganismi, con effetto di inibizione competitiva anche nei riguardi di muffe. Del resto l'alveare può essere pensato come un 'organismo esteso', in cui vi è una comunità di microrganismi simbiotici che circolano in più direzioni tra distretti anatomici dell'ape, covata, riserve alimentari e altre componenti ambientali, fornendo supporto nutrizionale e difendendo dai patogeni (ANDERSON *et al.*, 2011).

Lattobacilli si trovano abbondanti anche nel polline e negli escrementi e detriti presenti nei nidi di altri Apoidei, come gli Alittidi (MCFREDERICK *et al.*, 2012). La difesa antimicrobica delle provviste è peraltro realizzata dagli Apoidei anche con altri mezzi e strategie, di natura non microbica (MICHENER, 1974; CANE *et al.*, 1983).

#### *Altre relazioni*

Esulano dal tema della salute dei nostri Imenotteri due altre modalità di 'associazione': Apoidei adulti possono essere veicolo di microrganismi fitopatogeni, come è il caso del batterio *Erwinia amylovora*, agente causale del 'colpo di fuoco batterico' delle pomacee (CARPANA *et al.*, 2006; SABATINI *et al.*, 2007). Anche la raccolta e il trasporto accidentale, e quindi la disseminazione, di patogeni fungini è un fenomeno possibile durante la normale attività bottinatrice svolta dai pronubi (BATRA *et al.*, 1973). Una modalità artificiale di associazione, realizzata con intenti applicativi, ha preso avvio in anni recenti, con la sperimentazione e l'impiego di questi insetti per distribuire microrganismi utili o preparati microbiologici per finalità di controllo biologico di avversità microbiche di piante coltivate, in serra o in campo (associazione con microrganismi utili alle colture). Ad esempio, contro *Botrytis cinerea* su fragola, l'uso di *Gliocladium roseum*, veicolato da *A. mellifera* e di *Trichoderma harzianum*, veicolato anche da *B. terrestris* (PENG *et al.*, 1992; BILU *et al.*, 2004; PINNA *et al.*, 2006).

Meritano un cenno anche le recenti sperimentazioni sull'uso di funghi patogeni ad effetto acaricida – in particolare il Deuteromicete *Metarhizium anisopliae* – distribuiti negli alveari per il controllo di *Varroa*, e che sembrano utili nel ridurre i livelli d'infestazione senza influire sull'attività delle api (KANGA *et al.*, 2003, 2006).

#### MICROORGANISMI PATOGENI

Storicamente la patologia degli insetti, e più in generale quella degli invertebrati, come disciplina di studio affonda le sue radici proprio nella descrizione di alcune avversità biotiche dell'ape, tra le quali anche stati morbosi – dei quali oggi è nota l'eziologia microbica – conosciuti fin dall'antichità (DESEÖ KOVÁCS e ROVESTI, 1992; DAVIDSON, 2012). Ne troviamo testimonianza nei testi di storia naturale di Aristotele (IV sec. a.C.) e nelle opere di alcuni autori latini: le Georgiche di Virgilio (I sec. a.C.), la *Naturalis Historia* di Plinio il Vecchio (I sec. d.C.) e gli scritti dei "rustici" Varrone (II-I sec. a.C.) e Columella (I sec. d.C.), che sono animati anche dall'intento di fornire suggerimenti pratici, come, ad esempio, distinguere api sane da api malate per non incorrere in acquisti inopportuni. Nel tardo Rinascimento Ulisse Aldrovandi (ALDROVANDUS, 1602) riepilogava nel *De Animalibus Insectis*, anche riguardo all'ape, il sapere consolidatosi in età classica e recuperato dall'umanesimo scientifico del Cinquecento, ancora ligio al principio di autorità (BODENHEIMER, 1928-29; NICOLI ALDINI, 2005). Si può affermare che da allora fino alla metà del XIX secolo le conoscenze in tema di patologia degli invertebrati hanno riguardato particolarmente l'ape mellifera e, ancor di più, un altro insetto di primaria importanza per l'uomo: il baco da seta.

Oggi l'interesse per i patogeni degli Apoidei verte soprattutto su malattie da microsporidi e da virus, che possono correlarsi non solo con i fenomeni preoccupanti, a diffusione mondiale, di morie d'api, spopolamento di alveari, collasso delle colonie in senso lato, ma in parte anche con il lamentato declino dei pronubi selvatici (*Bombus* spp., ecc.). Questi fenomeni ad eziologia complessa sono influenzati da fattori sia abiotici sia biotici, senza contare gli effetti delle attività umane. Tra i fattori biotici si annoverano anche taluni patogeni (*Nosema* e virus), da soli o in associazione tra loro o anche, nel caso dell'ape mellifera, con avversità parassitarie come la varroasi (HAUBRUGE *et al.*, 2006; BORTOLOTTI *et al.*, 2009; GENERSCH, 2010a; JAMES e LI, 2012).

Le note che seguono mirano a focalizzare principalmente alcuni aspetti salienti di affezioni micro-

biche comuni o di preoccupante attualità, e dei loro agenti.

### Protozoi

Tra i Protozoi patogeni si annoverano i generi *Malpighamoeba* (Amoebozoa), *Crithidia* (Euglenozoa) e *Apicystis* (Apicomplexa); causano stati di malattia che si manifestano negli Apoidei adulti.

L'amebiasi dell'ape mellifera, causata da *Malpighamoeba mellificae*, non di rado insorge in concomitanza con l'infezione da *Nosema*, accentuandone la gravità, con sintomatologia simile e propagazione mediante circuito oro-fecale. *Crithidia mellificae* si localizza nel piloro delle api adulte, con danni peraltro modesti o nulli per l'ospite. *C. bombi* è invece ritenuta una possibile concausa del declino dei bombi (*Bombus* spp.), soprattutto in relazione con il loro allevamento e l'importazione per l'impollinazione in serra, ma sembra avere minore virulenza rispetto a *Nosema*. Oltre che 'orizzontalmente', si trasmette anche 'verticalmente', per via matrificiale, e può avere un'influenza fortemente negativa sulle dimensioni e la riproduzione delle colonie infette quando queste soffrono privazione di cibo o altre condizioni di stress; può inoltre compromettere anche l'efficienza delle operaie nel foraggiamento (IMHOOF e SCHMID-HEMPEL, 1999; RUIZ-GONZÁLEZ e BROWN, 2006; STEEN e BLOM, 2010; ROULSTON e GOODELL, 2011).

Poco si sa sulla patogenicità di *Apicystis bombi*, che infetta, nei bombi, il canale alimentare e il tessuto adiposo; la trasmissione è matrificiale (STEEN e BLOM, 2010).

### Microsporidi

Tradizionalmente inclusi tra i Protozoi, i Microsporidia - comprendenti principalmente, come patogeno per gli Apoidei, il genere *Nosema* - presentano, secondo ricerche di biologia molecolare, maggiori affinità con i miceti unicellulari (HIRT *et al.*, 1999) e sono oggi per lo più ascritti ai Funghi. Le relative malattie si manifestano, come quelle protozoarie sopra citate, in Apoidei adulti.

*Nosema apis* e soprattutto, attualmente, *N. ceranae* (dotato, per lo meno in alcuni suoi ceppi, di notevole virulenza) sono responsabili della nosemosi (o noseмиasi) dell'ape mellifera. La seconda specie, patogena originariamente di *Apis cerana* e passata in un secondo tempo anche su *A. mellifera* (FRIES, 2010), si è progressivamente diffusa nell'area mediterranea ed è oggi prevalente in Italia. Le api (operaie, fuchi, regine) contraggono l'infezione ingerendo spore del microrganismo col cibo o con feci di api infette (trasmissione 'orizzontale'); il microsporidio si moltiplica nella parete dell'intestino medio. L'evoluzione della malattia, che si accom-

pagna sovente a dissenteria, è infausta e pertanto la colonia colpita si spopola progressivamente. La nosemosi è condizionata da variabili ambientali, tra cui il clima e l'andamento stagionale; molti altri fattori ne favoriscono la diffusione. Quadri di spopolamento degli alveari o collasso delle colonie sono stati talvolta attribuiti a *N. ceranae*, eventualmente in associazione con virus e con *V. destructor*. In Sud-America *N. ceranae* è stato segnalato anche in *Bombus* spp. (PLISCHUK *et al.*, 2009).

*N. bombi*, che può infettare colonie di *Bombus* spp. di campo e del commercio, localizzandosi non solo nell'intestino medio dell'insetto, ma anche nei tubi malpighiani e nei tessuti adiposo e nervoso, è un potenziale corresponsabile del declino di questi pronubi, con un impatto però differente a seconda delle specie: ad esempio, in Europa è più temibile per *B. lucorum*, meno per *B. terrestris* (è possibile l'infettività crociata tra specie diverse di bombi). L'allevamento di bombi, la loro diffusione in nuove aree e l'introduzione in serra per l'impollinazione sono fattori favorenti la diffusione della malattia. Questo microsporidio si trasmette 'orizzontalmente', secondo un circuito oro-fecale; ad assumerne le spore sono le larve. L'infezione riduce la longevità degli individui e può azzerare la fitness dei giovani maschi adulti e delle giovani regine (IMHOOF e SCHMID-HEMPEL, 1999; OTTI e SCHMID-HEMPEL, 2007; STEEN e BLOM, 2010; ROULSTON e GOODELL, 2011).

Un microsporidio descritto di recente, *Antonospora scoticae*, colpisce l'Andrenide *Andrena scotica* (FRIES *et al.*, 1999).

### Ascomiceti

Di un certo rilievo sono alcune specie di funghi Ascomiceti del genere *Ascospaera*, patogene per *A. mellifera* o altri Apoidei quali *Osmia* e *Megachile*, e del genere *Aspergillus*, responsabili dell'aspergilliosi dell'ape.

*Ascospaera apis* causa l'ascosferiosi o 'covata calcificata' dell'ape mellifera (CHRISTENSEN e GILLIAM, 1983; CAMPANO *et al.*, 1999). Esplosioni di questa malattia sono correlate a cattive condizioni ambientali, come ad esempio il freddo. La conseguenza è lo spopolamento progressivo della colonia; tuttavia l'affezione raramente uccide l'intera colonia, e può anche regredire spontaneamente. *Ascospaera aggregata* è responsabile invece dell'ascosferiosi o covata calcificata in *Megachile*. È il patogeno più comune per le forme giovanili di *M. rotundata*, specie eurasiatica solitaria, introdotta in Nord America dove è utilizzata e commercializzata come impollinatore della medica, e dove in passato la malattia è stata devastante. Le larve morte ripiene di spore di *A. aggregata* sono la fonte del perdurare e del diffondersi dell'infezione: gli adulti dell'insetto, venen-

done a contatto, si impolverano di spore già allo sfarfallamento e possono poi contaminare le provviste della loro stessa prole o altri conspecifici. Le due specie di *Ascosphaera* non danno luogo a infezioni crociate tra *Megachile* e *Apis* (VANDENBERG *et al.*, 1980; PITTS-SINGER e CANE, 2011).

Meno frequente dell'ascosferiosi, l'aspergillosi, detta 'covata pietrificata' dell'ape mellifera, è sostenuta da *Aspergillus flavus* e altre specie congeneri. Colpisce le larve e più raramente anche le api adulte. Come l'ascosferiosi, è una malattia diffusa soprattutto in ambienti umidi; la sua insorgenza è favorita da altri fattori che compromettano seriamente il benessere della colonia (CONTESSI, 1990; CAMPANO *et al.*, 1999; FOLEY *et al.*, 2012).

### Batteri

Peste americana e peste europea sono le due affezioni batteriche più note e diffuse per l'ape mellifera, a livello mondiale (GENERSCH, 2010a), e colpiscono anche *A. cerana*. Altre malattie batteriche di *A. mellifera*, come il mal di maggio, hanno minore frequenza, diffusione o gravità.

Malattia della covata, causata dal batterio sporigeno e Gram-positivo *Paenibacillus larvae*, la peste americana non regredisce mai spontaneamente ed è comunemente letale. La trasmissione e diffusione possono verificarsi attraverso il saccheggio di colonie malate da parte di colonie sane, con assunzione di spore, o anche con la sciamatura da colonie malate, cosicché le api possono trasportare spore e diffonderle. Inoltre ne favoriscono la diffusione sia le pratiche apistiche non corrette sia le operaie stesse che, pulendo le celle colpite, si imbrattano di spore, capaci di resistere nell'ambiente per decenni (ASHIRALIEVA e GENERSCH, 2006; GENERSCH, 2010b). Della peste europea è responsabile un altro Gram-positivo, *Melissococcus plutonius* (= *M. pluton*) (STEEN e BLOM, 2010). La malattia subentra in condizioni di carenze alimentari e di stato di salute non ottimale della colonia: una concomitante infestazione di *Varroa* la facilita. In un secondo tempo si associano facilmente batteri saprofiti. Talora può regredire spontaneamente. Le operaie che puliscono le celle contribuiscono a diffonderla, così come certe pratiche apistiche (GENERSCH, 2010a).

Come detto più sopra, l'uso di batteri probiotici sembra promettente ai fini della prevenzione di queste affezioni, perché permette di modulare l'omeostasi intestinale delle larve (ALMA e GONELLA, 2012).

### Virus

Tra le cause o concause dei fenomeni di indebolimento e spopolamento degli alveari, mortalità e collasso delle colonie in senso lato, possono avere importanza alcune virosi, o singolarmente o in associa-

zione tra loro, con altre infezioni e soprattutto in correlazione con infestazioni di *V. destructor* (PENNACCHIO e NAZZI, 2013).

I virus patogeni per *A. mellifera* attualmente noti sono oltre una quindicina; si conoscono inoltre alcuni virus patogeni anche o soltanto per altre specie di *Apis* (ad esempio *A. cerana*) o per altri Apoidei (*Bombus* spp., ecc.) (JAMES e LI, 2012). I virus possono colpire sia la casta fertile che quella sterile dell'ape mellifera e tutti i suoi stadi di sviluppo, causando stati patologici diffusi in tutta la colonia o limitati a una parte della stessa (CARPANA, 2008). Le modalità di trasmissione accertate nell'ape sono diverse: trasmissione 'sessuale' da fuco a regina con l'accoppiamento, trasmissione 'verticale' (transovarica) da regina a prole, trasmissione 'orizzontale', con varie modalità, tra individui adulti della colonia, nonché da adulti a stadi giovanili (CHEN e SIEDE, 2007).

Data la complessità dei rapporti tra virus e ospite-vittima, la persistenza e patogenicità del microrganismo nell'insetto e il grado di evidenza clinica della malattia sono alquanto variabili: infezioni croniche subcliniche possono essere sostenute anche da più virus in associazione e mantenersi nelle colonie per più generazioni; alcune infezioni virali hanno manifestazioni subdole (rallentamento dello sviluppo delle colonie, riduzione di longevità degli adulti, debilitazione e perdite di produttività che si manifestano solo a distanza di tempo). Processi infettivi acuti a volte fatali, per la moltiplicazione rapida del virus in stadi od organi sensibili, invece, insorgono talvolta improvvisamente. Fattori diversi capaci di interferire con le difese immunitarie dell'insetto, comprese le infezioni virali stesse, sono in grado di indurre la replicazione e virulentazione. I quadri clinici sono per lo più aspecifici (CARPANA, 2008; GENERSCH, 2010a; PENNACCHIO e NAZZI, 2013).

Le conseguenze più pesanti dell'attacco di *Varroa* a colonie d'api, spesso, sono l'effetto non dell'azione diretta dell'acaro, ma dello sviluppo di infezioni virali innescate dall'acaro stesso, che può esserne il vettore e/o l'attivatore, inducendo nell'ape immunosoppressione e dunque indirettamente moltiplicazione del patogeno, che passa da uno stato di latenza a uno stato di virulenza conclamata (NAZZI, 2008). In proposito sono da citare soprattutto le infezioni sostenute dal virus delle ali deformi (DWV), più volte chiamato in causa per episodi di collasso delle colonie in senso lato, e che di recente è stato evidenziato anche in *Bombus*, con quadro sintomatologico analogo a quello dell'ape (GENERSCH *et al.*, 2006; STEEN e BLOM, 2010); tuttavia anche altri virus possono essere correlati a fenomeni di rapido spopolamento di alveari. In Italia monitoraggi svolti in anni recenti (MUTINELLI *et al.*, 2011) hanno evidenziato in tutte le regioni, singolarmente in apiario

o anche in varie combinazioni, la presenza di vari virus tra i quali: virus delle ali deformi (DWV), della cella reale nera (BQCV), della covata a sacco (SBV), della paralisi cronica (CBPV), della paralisi acuta (ABPV), virus Kashmir (KBV), virus israeliano della paralisi acuta (IAPV).

#### NOTE CONCLUSIVE

Tra le varie modalità di interazione tra microrganismi e Apoidei, la relazione antagonistica patogeno-vittima indubbiamente ha rilevanza primaria. Tra i molti aspetti di attualità inerenti al tema spiccano le ricerche sui virus patogeni che, interferendo con le difese degli Apoidei, li rendono più suscettibili alle infezioni, come anche i casi di sovrapposizione e interazione di più infezioni diverse, eventualmente in associazione – nel caso di *A. mellifera* – con infestazioni di *V. destructor*, anch'essa in grado di interferire con le difese immunitarie, con aggravamento delle condizioni di malattia. Rimarchevoli, inoltre, sono i fenomeni di spostamento di ospite (host shift) da parte di un patogeno, dai quali possono sortire in breve tempo problemi nuovi e inattesi. È opportuno che la ricerca sui patogeni sappia guardare con attenzione, oltre che all'ape mellifera, anche ad altri Apoidei sui quali convergono oggi anche notevoli interessi applicativi. In proposito non va taciuto, per il rischio di diffusione di patogeni tra pronubi di allevamento e selvatici, il pericolo rappresentato da commercio, importazione, introduzione di *Bombus* spp. in nuovi Paesi, in assenza di specifiche normative e controlli.

Non bisogna dimenticare, inoltre, che nella crisi degli impollinatori negli agroecosistemi possono entrare in causa anche fattori diversi dalle malattie infettive, singolarmente o in combinazione tra loro e con esse, con possibili effetti sinergici: frammentazione degli habitat per urbanizzazione, cambiamento di destinazione del suolo, rotazione delle colture, mutamenti nelle pratiche agronomiche, tendenza alla monocoltura intensiva, tossicità da insetticidi e altri agrofarmaci, impatto dei cambiamenti climatici anche per perdita di sovrapposizione tra areali degli impollinatori da un lato, piante e fioriture competenti dall'altro (phenological disruption), ecc. (HAUBRUGE *et al.*, 2006; MEMMOTT *et al.*, 2007; GRÜNEWALD, 2010).

Accanto al settore della patologia microbica, sono in espansione le ricerche sui microrganismi che stabiliscono con gli Apoidei tipi differenti di relazione, talora utili. Si tratta di un campo d'indagine sul quale pure convergono interessi pratici. Promettenti possibilità applicative sembrano derivare, ad esempio,

dal progresso delle conoscenze su associazioni di tipo mutualistico, vantaggiose anche per l'insetto. È il caso delle applicazioni (uso di probiotici) che la ricerca sui microrganismi associati all'ape mellifera e sul ruolo di questi nel mantenere la salute della colonia pare poter fornire, in prospettiva, ai fini della prevenzione di gravi avversità ad eziologia batterica, come la peste americana.

Più in generale meritano attenzione di ricerca le comunità di simbionti ubicati nei vari distretti non solo dell'alveare e del corpo dell'ape mellifera, ma anche nei pronubi selvatici, nei loro nidi e provviste, perché la circolazione pluridirezionale di tali microrganismi e la composizione delle loro comunità ivi insediate possono giocare un ruolo significativo per il benessere, la difesa dai patogeni e la salute di questi Imenotteri.

#### RIASSUNTO

Le relazioni tra microrganismi e Apoidei comprendono tipi assai differenti di associazione o interazione. Una categoria di primaria importanza di microrganismi è quella dei patogeni, che stabiliscono con l'insetto un rapporto di tipo antagonistico spesso letale, talora invece caratterizzato da minore virulenza e, nel caso di certi virus, anche da cronica persistenza latente per più generazioni dell'ospite. Patogeni per gli Apoidei sono vari protozoi, miceti, batteri, virus. Su alcuni di questi (il microsporidio *Nosema*, il virus delle ali deformi (DWV) e alcuni altri virus) si incentra oggi l'attenzione della ricerca apistica in relazione ai fenomeni di morte d'api, spopolamento degli alveari, collasso delle colonie in senso lato, crisi degli impollinatori; fenomeni di cui questi agenti possono essere causa o concausa, singolarmente o in associazione tra loro e, nel caso dell'ape mellifera, in correlazione con infestazioni di *Varroa destructor*. Altri tipi di relazioni, di segno positivo o negativo o neutro, a seconda dei casi, in ordine alla sopravvivenza e al benessere degli Apoidei, sono quelli stabiliti con i microrganismi commensali e i simbionti mutualisti, i simbionti manipolatori riproduttivi, gli associati alle provviste e, al di fuori della tematica della salute degli Apoidei, i fitopatogeni veicolati da Apoidei nonché gli antagonisti di fitopatogeni associati artificialmente dall'uomo ad Apoidei per finalità di controllo biologico. Di sicuro interesse sono le comunità di simbionti o commensali che *Apis mellifera* ospita nel canale alimentare, comunità il cui equilibrio gioca un ruolo importante sulla salute dell'insetto anche grazie all'inibizione dello sviluppo di patogeni.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALDROVANDUS U., 1602 – *De animalibus insectis libri septem, cum singulorum iconibus ad vivum expressis*. Bononiae, apud Ioan. Baptistam Bellagambam, (10)+767+(45) pp.
- ALMA A., GONELLA E., 2012 – *I microrganismi simbionti: una risorsa per il controllo di agenti patogeni e insetti dannosi*. – Atti Accad. Naz. Ital. Entomol., LX: 159-172.
- ANDERSON K.E., SHEEHAN T.H., ECKHOLM B.J., MOTT B.M., DEGRANDI-HOFFMAN G., 2011 – *An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey*

- bee and hive* (*Apis mellifera*). - *Insect. Soc.*, 58 (4): 431-444.
- ASHIRALIEVA A., GENERSCH E., 2006 – *Reclassification, genotypes and virulence of Paenibacillus larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees – a review*. - *Apidologie*, 37 (4): 411-420.
- BABENDREINER D., JOLLER D., ROMEIS J., BIGLER F., WIDMER F., 2007 – *Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins*. - *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59 (3): 600-610.
- BATRA L.R., BATRA S.W.T., BOHART G.E., 1973 – *The mycoflora of domesticated and wild bees* (Apoidea). - *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 49 (1): 13-44.
- BILU A., RAV DAVID D., DAG A., SHAFIR S., ABU-TOAMY M., ELAD Y., 2004 – *Using honeybees to deliver a biocontrol agent for the control of strawberry Botrytis cinerea-fruit rots*. - *Management of plant diseases and arthropod pests by BCAs, IOBC/wprs Bull.*, 27 (8): 17-21.
- BODENHEIMER F.S., 1928-29 – *Materialien zur Geschichte der Entomologie bis Linné*. W. Junk, Berlin, vol. I: X+498 pp.; vol. II: 486 pp.
- BORTOLOTTI L., PORRINI C., MUTINELLI F., POCHI D., MARINELLI E., BALCONI C., NAZZI F., LODESANI M., SABATINI A.G., 2009 – *Salute delle api: analisi dei fattori di rischio. Il progetto Apenet*. - *APOidea* 6 (1): 2-21.
- CAMPANO F., FLORES J.M., PUERTA F., RUIZ J.A., RUIZ J.M., 1999 – *Fungal diseases of the honeybee* (*Apis mellifera* L.). In: *Bee disease diagnosis*, Colin M.E., Ball B.V. & Kilani M., Ed., CIHEAM, Zaragoza (Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 25), pp. 61-68.
- CANE J.H., GERDIN S., WIFE G., 1983 – *Mandibular gland secretions of solitary bees* (Hymenoptera: Apoidea): *potential for nest cell disinfection*. - *J. Kansas Entom. Soc.*, 56 (2): 199-204.
- CARPANA E., 2008 – *I virus delle api*. - *APOidea*, 5 (3): 99-116.
- CARPANA E., ALEXANDROVA M., BAZZI C., PORRINI C., MASSI S., FERRO A., SABATINI A.G., 2006 – *Sopravvivenza di Erwinia amylovora nelle api* (*Apis mellifera* L.), *nell'alveare e nei suoi prodotti*. - *APOidea*, 3 (2): 85-96.
- CHEN Y.P., SIEDE R., 2007 – *Honey bee viruses*. - *Adv. Virus Res.*, 70: 33-80.
- CHRISTENSEN M., GILLIAM M., 1983 – *Notes on the Ascospaera species inciting chalkbrood in honey bees*. - *Apidologie*, 14 (4): 291-297.
- CONTESSI A., 1990 – *Le api. Biologia, allevamento, prodotti*. Ed. Agricole, Bologna, 2<sup>a</sup> ed., XVI+317 pp.
- DAVIDSON E.W., 2012 – *History of Insect pathology*. In: *Insect pathology*, Vega F.E. & Kaya H.K., Ed., Elsevier, Amsterdam, 2<sup>a</sup> ed., pp. 13-28.
- DESEÖ KOVÁCS K.W., ROVESTI L., 1992 – *Lotta biologica contro i fitofagi - Teoria e pratica*. Edagricole, Bologna, XX+296 pp.
- FOLEY K., FAZIO G., JENSEN A.B., HUGHES W.O.H., 2012 – *Nutritional limitation and resistance to opportunistic Aspergillus parasites in honey bee larvae*. - *J. Invertebr. Pathol.*, 111: 68-73.
- FRIES I., 2010 – *Nosema ceranae in European honey bees* (*Apis mellifera*). - *J. Invertebr. Pathol.*, 103: 573-579.
- FRIES I., PAXTON R.J., TENGÖ J., SLEMENDA S.B., DA SILVA A.J., PIENIAZIEK N.J., 1999 – *Morphological and molecular characterization of Antonospora scoticae n. gen., n. sp.* (Protozoa, Microsporidia) *a parasite of the communal bee, Andrena scotica Perkins, 1916* (Hymenoptera, Andrenidae). - *Eur. J. Protistol.*, 35 (2): 183-193.
- GENERSCH E., 2010a – *Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping*. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87 (1): 87-97.
- GENERSCH E., 2010b – *American foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae*. - *J. Invertebr. Pathol.*, 103: 510-519.
- GENERSCH E., YUE C., FRIES I., DE MIRANDA J.R., 2006 – *Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees* (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) *with wing deformities*. - *J. Invertebr. Pathol.*, 91 (1): 61-63.
- GERTH M., GEISLER A., BLEIDORN C., 2011 – *Wolbachia infections in bees* (*Anthophila*) *and possible implications for DNA barcoding*. - *Syst. Biodivers.*, 9 (4): 319-327.
- GILLIAM M., 1997 – *Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees*. - *FEMS Microbiol. Lett.*, 155 (1): 1-10.
- GOERZEN D.W., 1991 – *Microflora associated with the alfalfa leafcutting bee, Megachile rotundata* (Fab.) (Hymenoptera: Megachilidae) *in Saskatchewan, Canada*. - *Apidologie*, 22: 553-561.
- GRÜNEWALD B., 2010 – *Is pollination a risk? Current threats to and conservation of bees*. - *GAIA – Ecol. Perspect. Sci. Soc.*, 19 (1): 61-67.
- HAMDI C., BALLOI A., ESSANAA J., CROTTI E., GONELLA E., RADDADI N., RICCI I., BOUDABOUS A., BORIN S., MANINO A., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D., CHERIF A., 2011 – *Gut microbiome dysbiosis and honeybee health*. - *J. Appl. Entomol.*, 135: 524-533.
- HAUBRUGE E., NGUYEN B.K., WIDART J., THOMÉ J.-P., FICKERS P., DEPAUW E., 2006 – *Le dépérissement de l'abeille domestique, Apis mellifera L., 1758* (Hymenoptera: Apidae): *faits et causes probables*. - *Notes Faun. Gembloux*, 59 (1): 3-21.
- HIRT R.P., LOGSDON J.M. JR, HEALY B., DOREY M.W., DOOLITTLE W.F., EMBLEY M.T., 1999 – *Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (2): 580-585.
- IMHOOF B., SCHMID-HEMPEL P., 1999 – *Colony success of the bumble bee, Bombus terrestris, in relation to infections by two protozoan parasites, Crithidia bombi and Nosema bombi*. - *Insect Soc.*, 46 (3): 233-238.
- JAMES R.R., LI Z., 2012 – *From silkworm to bees: diseases of beneficial insects*. In: *Insect pathology*, Vega F.E. & Kaya H.K., Ed., Elsevier, Amsterdam, 2<sup>a</sup> ed., pp. 425-459.
- KANGA L.H., JONES W.A., GRACIA C., 2006 – *Efficacy of strips coated with Metarhizium anisopliae for control of Varroa destructor* (Acari: Varroidae) *in honey bee colonies in Texas and Florida*. - *Exp. Appl. Acarol.*, 40 (3-4): 249-258.
- KANGA L.H.B., JONES W.A., JAMES R.R., 2003 – *Field trials using the fungal pathogen, Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hypomycetes) *to control the ectoparasitic mite, Varroa destructor* (Acari: Varroidae) *in honey bee, Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) *colonies*. - *J. Econ. Entomol.*, 96 (4): 1091-1099.
- KOCH H., ABROL D.P., LI J., SCHMID-HEMPEL P., 2013 – *Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees*. - *Mol. Ecol.*, 22 (7): 2028-2044.
- MACCAGNANI B., FELICOLI A., 2005 – *Allevamento e utilizzo di apoidei: problematiche e prospettive*. - *APOidea*, 2 (2): 85-96.

- MANINO A., PORPORATO M., 2013 – *Api selvatiche: importanza e problematiche*. - Atti Accad. Naz. Ital. Entomol., LXI, questo volume: 73-75.
- MARTINSON V.G., DANFORTH B.N., MINCKLEY R.L., RUEPPELL O., TINGEK S., MORAN N.Y., 2011 – *A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees*. - Mol. Ecol., 20: 619-628.
- McFREDERICK Q.S., WCISLO W.T., TAYLOR D.R., ISHAK H.D., DOWD S.E., MUELLER U.G., 2012 – *Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria?* - Mol. Ecol., 21: 1754-1768.
- MEMMOTT J., CRAZE P.G., WASER N.M., PRICE M.V., 2007 – *Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions*. - Ecol. Lett., 10: 1-8.
- MICHENER C.D., 1974 – *The social behavior of the bees. A comparative study*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, XII+404 pp.
- MICHENER C.D., 2007 – *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2° Ed., XVI+(2)+953 pp.
- MOHR K.I., TEBBE C.C., 2006 – *Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field*. - Environ. Microbiol., 8 (2): 258-272.
- MUTINELLI F., GRANATO A., GALLINA A., LEARDINI S., MANZINELLO C., PIVA E., CALDON M., FALCARO C., PORRINI C., 2011 – *La rete nazionale di monitoraggio del progetto APENET*. - Atti XXIII Congr. Naz. Ital. Entomol., Genova, 13-16 giugno 2011, p. 101.
- NAZZI F., 2008 – *Varroa e CCD: considerazioni sul possibile ruolo di Varroa destructor nella sindrome del collasso della colonia*. - APOidea, 5 (2): 64-69.
- NICOLI ALDINI R., 2005 – *Ricordando Ulisse Aldrovandi nel quarto centenario della morte*. - APOidea, 2 (3): 158-161.
- OTTI O., SCHMID-HEMPEL P., 2007 – *Nosema bombi: a pollinator parasite with detrimental fitness effects*. - J. Invertebr. Pathol., 96: 118-124.
- PATIL P.B., ZENG Y., COURSEY T., HOUSTON P., MILLER I., CHEN S., 2010 – *Isolation and characterization of a Nocardiosis sp. from honeybee guts*. - FEMS Microbiol. Lett., 312 (2): 110-118.
- PENG G., SUTTON J.C., KEVAN P.G., 1992 – *Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent Gliocladium roseum to strawberry flowers to suppress Botrytis cinerea*. - Can. J. Plant Pathol., 14 (2): 117-129.
- PENNACCHIO F., NAZZI F., 2013 – *Agenti di stress e collasso delle colonie d'api*. - Atti Accad. Naz. Ital. Entomol., LXI questo volume: 77-81.
- PINNA M., GAMBA U., SPAGNOLO S., 2006 – *Impiego di Bombus terrestris per la diffusione di antagonisti naturali di Botrytis cinerea in ambienti protetti coltivati a fragola*. - Notiz. Protez. Piante, 18 (2004): 15-21.
- PITTS-SINGER T.L., CANE J.H., 2011 – *The alfalfa leafcutting bee, Megachile rotundata: the world's most intensively managed solitary bee*. - Ann. Rev. Entomol., 56: 221-237.
- PLISCHUK S., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., PRIETO L., LUCÍA M., BOTÍAS C., MEANA A., ABRAHAMOVICH A.H., LANGE C., HIGES M., 2009 – *South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by Nosema ceranae (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (Apis mellifera)*. - Environ. Microbiol. Rec., 1 (2): 131-135.
- ROULSTON T.H., GOODELL K., 2011 – *The role of resources and risks in regulating wild bee populations*. - Ann. Rev. Entomol., 56: 293-312.
- RUIZ-GONZÁLEZ M.X., BROWN M.J.F., 2006 – *Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission*. - Ecol. Entomol., 31: 616-622.
- SABATINI A.G., CARPANA E., PORRINI C., 2007 – *L'ape e la diffusione di Erwinia amylovora*. - Proc. XXI Congr. Naz. Ital. Entomol., Campobasso 11-16 giugno 2007, p. 115.
- STEEN J.J.M. VAN DER, BLOM M.P.K., 2010 – *Pathogen transmission in insect pollinators*. Plant Research International, Business Unit 'Biointeracties en Plantgezondheid', Wageningen, 35 pp.
- VAN DEN BERG J.D., FICHTER B.L., STEPHEN W.P., 1980 – *Spore load of Ascospaera species on emerging adults of the alfalfa leafcutting bee, Megachile rotundata*. - Appl. Environ. Microbiol., 39 (3): 650-655.
- VÁSQUEZ A., FORSGREN E., FRIES I., PAXTON R.J., FLABERG E., SZEKELY L., OLOFSSON T.O., 2012 – *Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees*. - PLoS ONE, 7 (3): 1-9.
- VEGA F.E., KAYA H.K. (Ed.), 2012 – *Insect Pathology*. Elsevier, Amsterdam, 2° ed., XVIII+490 pp.
- YOSHIYAMA M., KIMURA K., (Ed.), 2009 – *Bacteria in the gut of Japanese honeybee, Apis cerana japonica, and their antagonistic effect against Paenibacillus larvae, the causal agent of American foulbrood*. - J. Invertebr. Pathol., 102: 91-96.





## INTEGRATION OF MEALYBUG SEX PHEROMONES IN MANAGEMENT STRATEGIES: REPRODUCTIVE BIOLOGY STUDIES AND APPLIED RESEARCH

ZVI MENDEL (\*) - HOFIT KOL-MAIMON (\*) - MURAD GANIM (\*) - JOSÉ CARLOS FRANCO (\*\*)  
ELSA BORGES DA SILVA (\*\*) - POMPEO SUMA (\*\*\*)

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

(\*\*) *Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal*

(\*\*\*) *Università degli Studi di Catania, Italia*

Sintesi della lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Le cocciniglie delle piante coltivate: nuove acquisizioni e possibili strategie di controllo" Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 7 giugno 2013.

**SYNTHESIS** – Mealybugs (Hemiptera, Pseudococcidae) are the second largest family of scale insects (Coccoidea), with more than 2,000 described species (about 28% of the scale insect species). They include many economically important pests; most of these are invasive species (Fig. 1). The marked sexual dimorphism, neotenic apterous females vs winged males, in scale insects reaches extremes in this family. The males use long range pheromone cues to locate the females. Mealybug management largely relies on the use of nonselective insecticides. However, this strategy is often ineffective and poses many environmental hazards. Biological control of mealybugs has also been constrained by different factors. Therefore, there is a need to develop alternative management tools which are effective, species specific and environmentally safer. Integration of mealybug sex pheromones with natural enemies, through their conservation or enhancement of their activity, offers potential ecologically friendly management alternatives. In order to pursue and to optimize such control tactics, more fundamental information is needed regarding the chemical communication in the mealybug environment, including sex attraction and pheromone-mediated host-parasitoid relationships. Our research has been focusing on two mealybug species, the citrus mealybug, *Planococcus citri* and the vine mealybug, *Planococcus ficus*, as model species. Both species are key pests in a wide range of agricultural crops and share many host plants. They are closely related genetic species and for many decades *P. ficus* has often been misidentified as *P. citri*. In this communication we present information about the mode of inter- and intra-specific pheromone attraction and its geographical variation, with respect to the populations of the vine and the

citrus mealybugs and the kairomonal attraction of two of their principal parasitoids, *Anagyrus* sp. near *pseudococci* and *Leptomastix dactylopii*. We place emphasis on the finding showing the attraction to both *P. ficus* sex pheromones among males of all tested *P. citri* populations but not vice versa, and the presence of 'hybrid females' among *P. citri* populations but not among those of *P. ficus*.

We found evidence of gene flow between *P. citri* and *P. ficus*. These species can be distinguished by morphological, behavioral, and molecular traits. We employed the sex pheromones of each respective species to study their different patterns of male attraction. The occurrence of *P. citri* males attracted to lavandulyl isovalerate, i.e. males attracted to the second compound of the sex pheromone of *P. ficus*, among the East Mediterranean populations of *P. citri* suggests a recent gene flow from *P. ficus* to *P. citri* in this particular area. Lavandulyl isovalerate is the main pheromone compound produced by *P. ficus* populations, and *P. ficus* males attracted to it were found only in East Mediterranean populations (Fig. 2). We also used nuclear ITS2 and mitochondrial COI DNA sequences to characterize populations of the two species, in order to demonstrate the outcome of a possible gene flow between feral populations of these two species. Our results showed attraction of all tested populations of *P. citri* males to *P. ficus* pheromones but not vice versa. Furthermore, ITS2 sequences revealed the presence of 'hybrid females' among *P. citri* populations but not among those of *P. ficus* 'hybrid females' from *P. citri* populations identified as *P. citri* females according to COI sequences. We offer two hypotheses that might account for these results: 1) the occurrence of phenotypic and genotypic traits of *P. ficus* in *P. citri* populations may

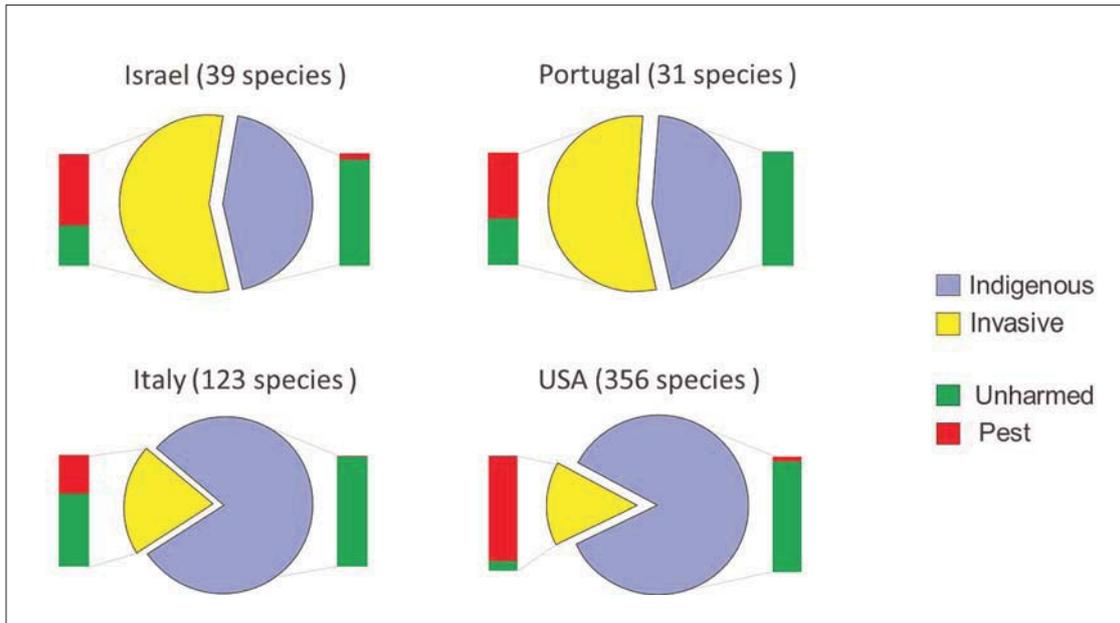


Fig. 1

Comparison of the proportion of mealybug pest species among indigenous and invasive mealybug species in four countries (mainly after Ben Dov 2012; Franco et al. 2011; Longo et al. 1995, Miller et al. 2005, Ben\_Dov et al., 2013, and Pellizzari, Mazzeo, Russo, Franco, personal communication).

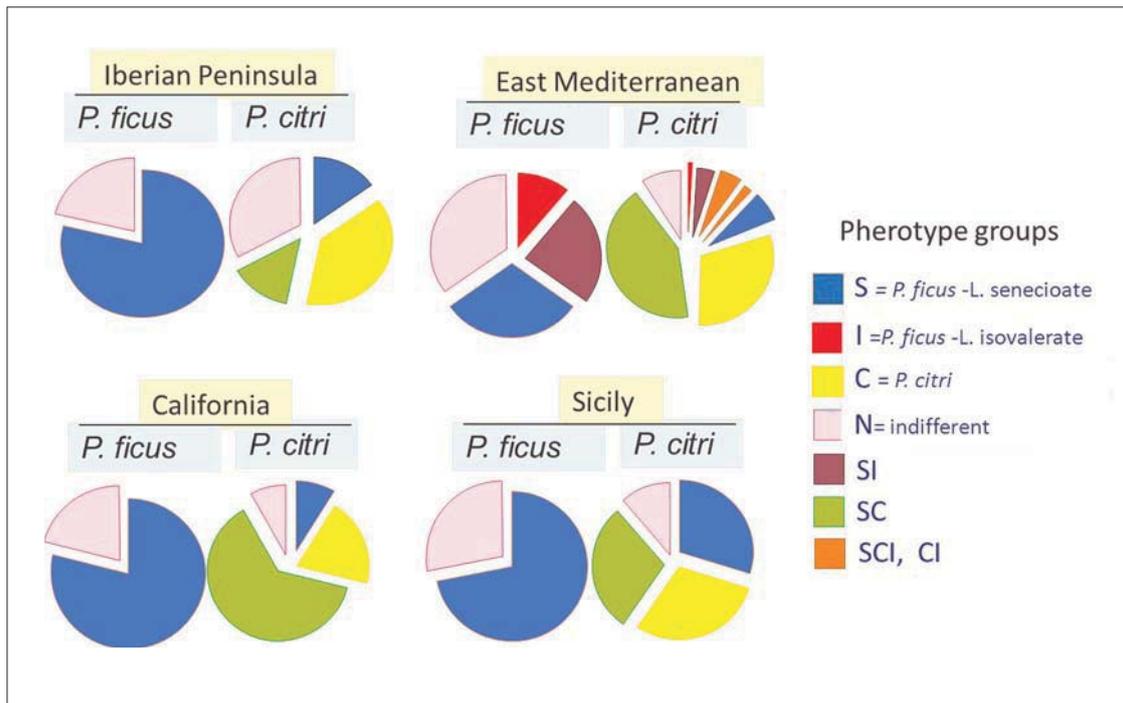


Fig. 2

Male pherotype distribution of *Planococcus citri* and *Planococcus ficus* in four different regions: east Mediterranean (Israel and Turkey) central Mediterranean (Sicily), west Mediterranean (Spain and Portugal) and California. The male pherotypes were characterized according to their specific responses to *P. ficus* and *P. citri* pheromones.

The *P. citri* pheromone consists of a single chemical component – (S+)-cis-(1R)-3-isopropenyl-2,2-imethylcyclobutanemethanol acetate (=C) whereas *P. ficus* occurs in populations whose females release one pheromone compound – lavandulyl senecioate (=S) – and in populations whose females release two pheromone compounds (S) and lavandulyl isovalerate (=I).

Individual males of the tested populations were exposed the pheromones compounds in no-choice tests, in which the compounds were presented in a random succession of three arenas. The male pherotype was determined according to the specific attraction to each of the three tested compounds. The male can respond to one, two or in few cases to all three compounds. N = no attraction of the males to any of the tested pheromones.

be attributed to both ancient and contemporary gene flow between their populations. 2) We cannot rule out that an ancient sympatric speciation by which *P. ficus* emerged from ‘ancestor type’ of *P. citri* might have led to the present situation of shared traits between these species. In light of these findings we also discuss the origin of the studied species and the importance of the pherotype phenomenon as a tool with which to study genetic relationships between congener scale insects (KOL-MAIAMON *et al.*, 2010; 2014).

#### REFERENCES

- FRANCO J.C., RUSSO A., MAROTTA S., 2011 – *An annotated checklist of scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of Portugal, including Madeira and Azores Archipelagos.* - Zootaxa, 3004: 1-32.
- BEN-DOV Y., 2012 – *The scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of Israel-checklist, host plants, zoogeographical considerations and annotations on species Israel.* - Journal of Entomology, 41-42: 21-48.
- KOL-MAIMON H., ZADA A., FRANCO J.C., DUNKELBLUM E., PROTASOV A., ELIYAHU M., MENDEL Z., 2010 – *Male behaviors reveal multiple pherotypes within Vine Mealybug Planococcus ficus (Signoret) (Hemiptera; Pseudococcidae) populations.* – Naturwissenschaften, 97:1047-1057 (DOI: 10.1007/s00114-010-0726-3)
- KOL-MAIMON H., GANIM M., FRANCO J.C., MENDEL Z., 2014 – *Evidence for gene flow between two sympatric mealybug species (Insecta; Coccoidea; Pseudococcidae).* - PLoS One, 9(2): e88433.
- LONGO S., MAROTTA S., PELLIZZARI G., RUSSO A., TRANFAGLIA A., 1995 – *An annotated list of the scale insects (Homoptera: Coccoidea) of Italy.* - Israel Journal of Entomology, 29: 113-130
- MILLER D.R., MILLER G.L., HODGES G.S., DAVIDSON J.A., 2005 – *Introduced scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of the United States and their impact on U.S. Agriculture.* - Proceedings of the Entomological Society of Washington, 107(1): 123-158.



## L'IMPIEGO DEI SEMIOCHIMICI DI SINTESI NEI PROGRAMMI DI CONTROLLO INTEGRATO DELLE COCCINIGLIE DEGLI AGRUMI

POMPEO SUMA (\*) - AGATINO RUSSO (\*) - JOSÉ CARLOS FRANCO (\*\*) - ZVI MENDEL (\*\*\*)

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

(\*\*) *Technical University of Lisbon - Center of Forestry Studies, Portogallo.*

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

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Le cocciniglie delle piante coltivate: nuove acquisizioni e possibili strategie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 7 giugno 2013.

### *Semiochemical-based tools for management of the scale insects of Citrus*

A brief revision of the insect synthetic semiochemicals applied in IPM of the scale insects infesting cultivated *Citrus* was undertaken. Although more than 300 species of scale insects are worldwide reported on *Citrus*, in Italy only 26 species were recorded as pests and less than 10 are key pests, such as the Citrus mealybug *Planococcus citri* (Risso), the California red scale *Aonidiella aurantii* (Maskell) and the Oleander scale *Aspidiotus nerii* (Bouchè).

Recently, an increased interest was shown by the scientific community on the possibility of managing these pests by means of behavioral modifying synthetic semiochemicals. For instance, the mating disruption technique applied in IPM strategies against the California red scale showed similar results to conventional oil sprays, offering growers an effective and more environmental sustainable control tactic than insecticides. Again, recent studies demonstrated that the application of a synthetic kairomone, is able to increase significantly the rate of parasitism of the citrus mealybug by the solitary endoparasitoid *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci*. Considering that semiochemicals represent an environmentally friendly tool, they have potentially high interest in IPM control programs.

KEY WORDS: pheromones, kairomones, mealybugs, mating disruption, biological control.

### INTRODUZIONE

La riduzione dell'impiego dei prodotti di sintesi nella protezione delle piante dagli attacchi dei parassiti è oggi uno dei principali obiettivi da perseguire in una agricoltura qualitativamente orientata al mercato e rispettosa degli ecosistemi naturali. Per anni il ricorso ai mezzi chimici di lotta ha sì permesso di contenere le perdite di produzione ma, al contempo, ha determinato l'insorgenza di tutta una serie di problematiche legate tanto alla salute dell'uomo, in quanto operatore agricolo o consumatore, quanto agli aspetti ambientali. Nell'ottica quindi di un razionale controllo dei principali fitofagi delle piante coltivate, si è assistito nell'ultimo decennio ad un crescente interesse verso la ricerca di tecniche di intervento eco-compatibili e, in tale contesto di certo, i semiochimici, ben si collocano tra gli strumenti di cui dispone l'odierna fitoiatria. Con il termine semiochimici (dal greco *semeion* = segnale) si definiscono quelle sostanze chimiche emesse dagli organismi viventi tali da indurre un comportamento o una risposta fisiologica in altri individui che rece-

piscono il segnale (NORLUND & LEWIS, 1976; FLINT & DOANE, 1996). Sono altamente efficaci in piccolissime quantità, dell'ordine di frazioni di microgrammo, non sono tossici e, a differenza degli agrofarmaci, non determinano effetti secondari indesiderati a carico di eventuali nemici naturali con i quali possono giungere in contatto (FRANCO *et al.*, 2009).

Questi composti sono di norma classificati in due gruppi a seconda del loro livello di azione; i semiochimici che agiscono a livello intraspecifico sono chiamati feromoni, quelli che entrano in gioco nei rapporti interspecifici sono definiti allelochimici. Inoltre, un'ulteriore suddivisione vede i feromoni classificati in base al comportamento che l'organismo recettore manifesta (es. f. sessuali, f. di aggregazione, f. traccia, etc.) così come gli allelochimici che, in base alla presenza o meno di un vantaggio adattivo delle specie interessate, vengono suddivisi in *allomoni* (vantaggiosi alla specie che li emette), *caïromoni* (benefici alla specie recettiva) e *sinomoni* (quando entrambe le specie traggono un beneficio reciproco). Tuttavia, un singolo segnale chimico può agire sia come feromone che come

allelochimico per cui, la reale separazione di queste due classi, non è sempre possibile. Tra i feromoni che trovano largo impiego nella pratica agro-forestale figurano principalmente quelli sessuali e i feromoni di aggregazione mentre, tra gli allelochimici che trovano interesse applicato, figurano principalmente i caïromoni e i sinomoni.

Dal punto di vista storico, le prime evidenze sulla presenza dei semiochimici quali composti in grado di modificare il comportamento di una specie *target* risalgono agli anni '50 quando BUTENANDT e collaboratori (1959) isolarono, dalle femmine del baco da seta (*Bombix mori* L.), il feromone sessuale. Da qui in avanti presero avvio tutta una serie di studi mirati alla ricerca e alla sintesi chimica di composti ad attività semiochimica che mostravano buone attitudini ai fini del controllo delle specie *target*, tramite cui si è giunti all'identificazione, all'isolamento e alla sintesi dei feromoni di oltre 2000 specie afferenti a circa un centinaio di famiglie diverse (COLAZZA & PERI, 2009). Già dai primi anni '70 infatti, visto l'intensificarsi delle ricerche scientifiche in tale ambito, nacque una nuova disciplina scientifica che mirava ad approfondire le conoscenze sulla comunicazione chimica degli insetti: la chimica ecologica (Insect chemical ecology) (WILSON, 1971). Importanti, in tale contesto, sono gli studi italiani che, già a metà degli anni settanta, hanno dato un contributo significativo alle prime ricerche sui semiochimici quali strumenti applicabili nei programmi di monitoraggio di importanti fitofagi dannosi in agricoltura e, tra questi, le cocciniglie (ROTUNDO & TREMBLAY 1975, 1976, 1981, 1985; TREMBLAY & ROTUNDO, 1978).

Le cocciniglie rappresentano un vasto gruppo di insetti ampiamente diffusi in tutte le zone del mondo e sono spesso un serio problema alla pratica agricola, in quanto in grado di attaccare una vastissima gamma di colture. Presentano aspetti biologici ed ecologici di notevole interesse: sono organismi sedentari, le femmine assicurano protezione alle uova e alle neanidi neonate, manifestando notevoli capacità di adattamento alle piante ospiti e alle condizioni ambientali più avverse (LONGO *et al.*, 1999). Le cocciniglie segnalate su agrumi sono oltre 180 specie, una ventina delle quali risultano ad oggi infeudate agli agrumi in Italia (VEILLEUX, 2001). Le specie più nocive nelle nostre aree sono, attualmente, lo pseudococcino *Planococcus citri* (Risso), i coccini *Saissetia oleae* (Olivier) e *Ceroplastes sinensis* (L.), nonché vari diaspini, tra i quali *Aonidiella aurantii* (Maskell) (JACAS *et al.*, 2010). Altre specie, quali le cocciniglie basse [*Coccus hesperidum* L. e *C. pseudomagnoliarum* (Kuwana)] e la "bianca-rossa" [*Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan)] non rive-

stono interesse applicato mentre preoccupanti sono, in prospettiva, le segnalate presenze, in areali agrumicoli vocati, dei diaspini *Unaspis yanonensis* (CAMPOLO *et al.*, 2010) e *Aonidiella citrina* (LONGO *et al.*, 1994) nonché di *Chrysomphalus aonidum* e del coccino *Protopulvinaria pyriformis* in fase di espansione in Sicilia (CONTI *et al.*, 2013; SUMA & COCUZZA, 2010). In senso ampio, nell'ambito delle strategie di controllo degli insetti infestanti, i semiochimici trovano largo impiego nei programmi di monitoraggio, cattura massale e confusione sessuale. In tale contesto, di seguito, si riportano le principali applicazioni dei semiochimici quali strumenti per la gestione delle infestazioni delle cocciniglie infeudate agli agrumi coltivati.

#### APPLICAZIONI PRATICHE DELL'IMPIEGO DEI SEMIOCHIMICI PER LA GESTIONE DELLE INFESTAZIONI DELLE COCCINIGLIE IN AGRUMICOLTURA

##### *Monitoraggio*

L'applicazione dei feromoni di sintesi è ancora ad oggi in gran parte mirata ai programmi di monitoraggio finalizzati ad intercettare tempestivamente le specie di nuova o temuta introduzione (es. MILLAR, 2012) e per seguire le dinamiche delle popolazioni delle specie già presenti. Relativamente al comparto agrumicolo, molteplici sono i contributi finalizzati all'ottimizzazione dei feromoni sessuali di sintesi delle cocciniglie dannose. A titolo esemplificativo, il corretto impiego delle trappole a feromoni per rilevare l'andamento dei voli maschili di *A. aurantii*, integrato dal calcolo dei gradi giorno, ha permesso di ottenere indicazioni utili ai fini di un oculato impiego dei mezzi chimici e biologici di lotta al diaspino (BENFATTO *et al.*, 1998; ZAPPALÀ *et al.*, 2008; CAMPOS-RIVELA *et al.*, 2012). Ancora, l'impiego dei feromoni sessuali di sintesi di *Pl. citri* ha consentito di definire con buoni risultati la dinamica di popolazione dello pseudococcino nei diversi comprensori agrumetati del globo, permettendo una significativa riduzione del numero dei trattamenti insetticidi effettuati venendo, questi ultimi, attentamente calibrati in stretta relazione alle reale presenza degli stadi giovanili della cocciniglia che, come noto, sono i più suscettibili ai prodotti chimici. Inoltre, considerando la laboriosità dei consueti metodi di monitoraggio delle infestazioni coccidiche che prevedono, tra gli altri, l'accurato esame di specifiche parti delle piante alla ricerca degli stadi vitali delle cocciniglie (FRANCO *et al.*, 2004), è stata più volte indagata la possibilità di definire, tramite le catture dei maschi alle trappole feromo-

niche, una soglia economica di intervento e una procedura per valutare la densità di popolazione delle specie monitorate. In tale contesto però, i diversi autori che hanno affrontato la tematica, concludono che, tanto nel caso della cocciniglia rossa forte, che per il cotonello degli agrumi, la previsione dei livelli di infestazione sui frutti non trova una significativa relazione in rapporto al numero di maschi catturati con le rispettive trappole a feromoni, per cui non è possibile formulare alcun modello previsionale delle dinamiche delle popolazioni delle predette specie (GROUT & RICHARDS, 1991; FRANCO *et al.*, 2001, 2004).

#### *Catture massali*

Studi condotti congiuntamente in Italia, Portogallo e Israele hanno dimostrato che, benché la tecnica del *mass trapping* dei maschi di *Pl. citri* in agrumeto possa condurre a una sensibile riduzione delle popolazioni dello pseudococcino, tale risultato non ha determinato un abbassamento significativo dei livelli di infestazione sui frutti (FRANCO *et al.*, 2003; 2004). Anche i tentativi effettuati nei confronti della cocciniglia rossa forte, non hanno dato indicazioni incoraggianti sull'impiego delle trappole a feromoni nei programmi di cattura massale, principalmente a causa della bassa efficacia di cattura e agli elevati costi da affrontare per l'adozione di una tale strategia (AYTA & YUMRUKTEPE, 2001). Alla luce di tali evidenze, la strategia del *mass trapping*, in base ai semiochimici ad oggi disponibili, non trova ancora applicabilità pratica nei programmi di controllo delle cocciniglie degli agrumi.

#### *Confusione e/o disorientamento sessuale*

All'impiego dei feromoni per il monitoraggio dei voli e per le catture alle trappole, oggi si va via via affiancando sempre più il loro utilizzo per ostacolare l'accoppiamento di specie dannose impedendo ai maschi della specie *target* di localizzare il feromone naturale emesso dalle femmine conspecifiche, rendendo difficile quindi l'incontro e il conseguente sviluppo della progenie. Diverse sono le tecnologie con le quali è possibile adottare il metodo della confusione sessuale: quello attualmente più in uso prevede l'impiego dei soli erogatori, di diversa tipologia, installati sulla chioma delle piante in densità variabili. Un'altra tecnologia di impiego prevede invece che, il feromone sintetico in forma micro incapsulata, venga distribuito in miscela acquosa in formulazione spray (BALDESSARI *et al.*, 2013). Recentemente, l'impiego di un dispositivo temporizzato in grado di rilasciare dosi costanti e prestabilite del feromone in meleti del Trentino per la lotta alla Carpocapsa

(*Cydia pomonella* L.) ha permesso di ottenere un buon grado di efficacia nel controllo del fitofago permettendo una sensibile riduzione degli interventi insetticidi (ANGELI *et al.*, 2013). Relativamente alle esperienze condotte in merito alle infestazioni coccidiche in agrumeto, interessanti sono i risultati ottenuti in Spagna dove la tecnica è stata impiegata per il controllo delle infestazioni di *A. aurantii*. L'analisi dei diversi componenti del feromone sessuale di sintesi della cocciniglia (ROELOFS *et al.*, 1977), ha permesso di mettere in evidenza come un solo isomero, tra quelli presenti nella formulazione, risultava biologicamente attivo (GIESELMANN *et al.*, 1980). Questi risultati hanno quindi portato allo sviluppo di nuovi metodi di controllo basati sull'impiego dei feromoni quale quello, appunto, della confusione sessuale. Le prime applicazioni del metodo benché abbiano permesso di registrare una sensibile riduzione delle catture dei maschi del diaspino, non hanno prodotto risultati precisi sull'effettiva validità della tecnica (BARZAKAY *et al.*, 1986; HEFETZ *et al.*, 1988). Solo successivamente, grazie alla messa a punto di specifici erogatori mesoporosi del feromone, è stato possibile valutare l'effettiva efficacia del metodo. Infatti VACAS *et al.* (2010) riportano come nelle parcelle trattate con il metodo della confusione, i livelli di infestazione dei frutti ad opera della cocciniglia risultavano significativamente inferiori a quelli dei frutti presenti nelle parcelle testimoni. Inoltre comparando tale metodo con i consueti interventi di controllo chimico, gli stessi autori riportano come il controllo delle popolazioni del fitomizo ottenuto con la tecnica in esame, sia assolutamente comparabile con quello ottenuto impiegando gli oli minerali quali mezzo di lotta senza, peraltro, interferire con l'entomofauna utile.

#### *Attività cairomonale*

Indagini approfondite sull'impiego dei semiochimici di sintesi hanno dimostrato come il feromone sessuale di alcune specie di cocciniglie può essere utilizzato dai rispettivi nemici naturali nei processi di localizzazione e selezione dell'ospite. Risposte di tipo cairomonale furono messe in evidenza già a metà degli anni '70 quando ROTUNDO & TREMBLAY (1975) osservarono che, trappole innescate con femmine vergini dello pseudococcino *Pseudococcus calceolariae* (Maskell), catturavano un numero significativo di esemplari dell'encirtide *Tetracnemoidea peregrina* (Compere) (= *Arhopoideus peregrinus*). Più recenti sono le evidenze all'attività cairomonale di alcuni feromoni sessuali di Pseudococcidi nei confronti dei rispet-

tivi parassitoidi. BELL *et al.* (2006, 2008) in prove di campo, riportano come sulle trappole attivate con il feromone sessuale impiegate per il monitoraggio della cocciniglia *Pseudococcus viburni* (Signoret) vi era una significativa presenza di esemplari dell'endoparassitoide *Pseudaphycus maculipennis* Mercet. Indagini effettuate in Italia, hanno dimostrato che, benché sulle trappole a feromoni sessuali di sintesi impiegate in un programma di monitoraggio del cotonello degli agrumi *Pl. citri*, fossero presenti alcuni esemplari dell'encirtide *Anagyrus pseudococci* (Girault), tale fenomeno non era direttamente imputabile alla attività determinata dal feromone di sintesi presente nelle trappole (SUMA *et al.*, 2001); tale dato è stato poi ulteriormente confermato dagli studi elettroantennografici successivamente condotti (SUMA *et al.*, 2002). È con l'identificazione e la sintesi del (S)-(+)-lavandulyl senecioate, quale feromone sessuale del cotonello della vite *Pl. ficus* (Signoret) (HINKENS *et al.*, 2001) che è stata messa in risalto una spiccata attività cairomonale di questi semiochimici nei confronti dell'encirtide endoparassitoide *A. sp. near pseudococci*. Così MILLAR *et al.* (2002) in California prima, e FRANCO *et al.* (2008) nel Bacino del Mediterraneo successivamente, hanno valutato l'effettiva capacità del feromone sessuale di sintesi quale cairomone nei confronti del predetto parassitoide. In seguito, applicazioni in campo di diffusori di un'altra formulazione del feromone sessuale di *Pl. ficus*, il (S)-(+)-lavandulyl isovalerate, sintetizzato in Israele (ZADA *et al.*, 2003), hanno permesso di mettere in evidenza come sia possibile aumentare significativamente i tassi di parassitizzazione di *A. sp. near pseudococci* a carico delle cocciniglie ospiti, ricorrendo appunto all'esposizione in campo di tali composti che permettono inoltre, una più celere localizzazione della specie ospite da parte dell'encirtide (FRANCO *et al.*, 2011).

## CONCLUSIONI

La corretta utilizzazione dei semiochimici impiegati in tecniche di monitoraggio o controllo dei fitofagi presuppone, quindi, un'approfondita conoscenza della loro azione, oltre che sugli organismi dannosi, anche sui loro nemici naturali. La consapevolezza dei rischi ambientali e di sicurezza, connessi con l'uso poco oculato dei mezzi chimici, hanno portato ad aumentare le restrizioni sul loro impiego, per cui l'individuazione di nuove tecniche di intervento eco-compatibili riveste un'importanza sempre crescente. In tale contesto, l'uso dei semiochimici di sintesi, quali strumenti della moderna fitoiatria,

rappresenta ancora oggi una area d'indagine scientifica in fase di forte sviluppo. Alla luce delle ricerche condotte negli ultimi decenni appare ormai chiaro come le tecnologie di controllo delle infestazioni degli insetti dannosi devono essere applicate in programmi coordinati e ben definiti. Il recente passato ha già dimostrato come la completa dipendenza da un'unica tecnologia di controllo delle infestazioni (vedi lotta chimica) porta ben presto ad una qualche forma di resistenza che spesso ne vanifica i risultati pertanto, l'adozione di strategie aderenti all'IPM, che prevedono l'uso combinato di tutte le misure di controllo disponibili, di riflesso, permetterà di preservare il valore di ciascuno dei metodi utilizzati.

## RIASSUNTO

Gli autori riportano una breve revisione dei semiochimici di sintesi applicati nei programmi di gestione delle infestazioni delle cocciniglie infestate ai *Citrus* coltivati. Delle 300 e più specie di cocciniglie riportate su agrumi nel mondo, in Italia solo 26 sono le specie segnalate sulla coltura, alcune delle quali assurgono al ruolo di fitofagi chiave, come il cotonello degli agrumi *Planococcus citri* (Risso), la cocciniglia rossa forte *Aonidiella aurantii* (Maskell) e la cocciniglia bianca del limone *Aspidiotus nerii* (Bouché).

Recentemente, un crescente interesse è stato mostrato dalla comunità scientifica sulla possibilità di impiego dei semiochimici di sintesi nei protocolli di gestione delle loro infestazioni. Per esempio, l'ottimizzazione della tecnica della confusione sessuale, adottata in strategie di lotta a basso impatto ambientale contro la rossa forte degli agrumi, ha permesso di raggiungere risultati comparabili a quelli ottenuti impiegando i trattamenti insetticidi convenzionali, offrendo agli agrumicoltori uno strumento di lotta efficace ed eco sostenibile. Altri studi recenti hanno inoltre dimostrato in applicazioni di campo, che l'impiego di un cairomone di sintesi, è in grado di aumentare significativamente il tasso di parassitizzazione del cotonello degli agrumi da parte dell'endoparassitoide *Anagyrus sp. nr. pseudococci*. Considerando che i semiochimici sono altamente efficaci a bassissimi dosaggi, non sono tossici e, a differenza degli agrofarmaci, sono specie-specifici, essi rappresentano uno strumento fondamentale da integrare, ove possibile, nei programmi di controllo delle cocciniglie infestanti gli agrumi coltivati.

## BIBLIOGRAFIA

- ANGELI G., RIZZI C., BALDESSARI M., DALPIAZ M., 2013 – *Difesa dalla Carpocapsa del melo con Chekmate® Puffer CM.* - L'Informatore Agrario, 42: 51-54.
- AYTA M., YUMRUKTEPE R., 2001 – *Using Pheromone Traps to Control California Red Scale Aonidiella aurantii (Maskell) (Hom.: Diaspididae) in the Eastern Mediterranean Region (in Turco, abstract in Inglese).* - Turk. J. Agric. For., 25: 97-110.
- BALDESSARI M., IORATTI C., ANGELI G., 2013 – *Il feromone spray è efficace e di facile applicazione.* - L'Informatore Agrario, 20: 38-40.
- BARZAKAY I., HEFETZ A., STERNLICHT M., PELEG B.A.,

- GOKKES M., SINGER G., ET AL., 1986 – *Further field trials on management of the California Red Scale, Aonidiella aurantii, by mating disruption with its sex-pheromone*. - *Phytoparasitica*, 14:160-161.
- BELL V.A., SUCKLING D.M., WALKER J.T.S., MILLAR J.G., MANNING L.A., EL-SAYED A.M., 2008 – *Obscure mealybug pheromone is the kairomone of an introduced parasitoid in New Zealand*. - *Proc. XXIII Int. Cong. Entomol.*, 6-12 July 2008, Durban (Abstract). Available at <http://www.ice2008.org.za/pdf/proceedings.pdf>
- BELL V.A., WALKER J.T.S., SUCKLING D.M., MANNING L.A., EL-SAYED A.M., SHAW P.W., WALLIS D.R., MILLAR J.G., 2006 – *Trapping obscure mealybug (Pseudococcus viburni) and its natural enemy Pseudophycus maculipennis (Hymenoptera: Encyrtidae) in apple orchards*. - *N. Zeal. Plant. Prot.*, 59: 364 (Abstract).
- BENFATTO D., CONTI F., TUMMINELLI R., 1998 – *Lotta biologica e chimica alla cocciniglia rossa forte degli agrumi, Aonidiella aurantii Mask., in Sicilia*. - *Atti Giornate Fitopatologiche, Scicli e Ragusa*, 3-7 Maggio 1998: 217-222.
- BUTENANDT A., BECKMANN R., STAMM D. & HECKER E., 1959 – *Über den Sexual-lockstoff des Seidenspinners Bombyx mori. Reindarstellung und Konstitution*. - *Z. Naturforsch.*, 14: 283-284.
- CAMPOLO O., MAIONE V., GRANDE S. B., PALMERI V., 2010 – *Unaspis yanonensis (Kuwana) (Hemiptera: Diaspididae) su agrumi in Calabria*. - *Terra e Vita*, 27, 14-16.
- CAMPOS-RIVELA J.M., MARTINEZ-FERRER M.T., FIBLA-QUERALT J.M., 2012 – *Population dynamics and seasonal trend of California red scale (Aonidiella aurantii Maskell) in citrus in Northern Spain*. - *Spanish J. Agric. Res.*, 10: 198-208.
- COLAZZA S., PERI E., 2009 – *Mezzi biotecnici per il controllo degli insetti fitofagi degli agrumi*. In *Citrus: trattato di agrumicoltura a cura di Vincenzo Vacante*, Francesco Calabrese. - Milano; Edagricole, 2009 XVII, 470 pp.
- CONTI F., FISICARO R., RACITI E., CARTA D., SUMA P., NUCIFORA S., MAZZEO G., SISCARO G., 2013 – *Quali sono i "nuovi" parassiti che infestano gli agrumi*. - *L'Informatore agrario*, 34: 56-59.
- FLINT, H.M., DOANE C.C., 1996 – *Pheromones and other Semiochemicals*. In: E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison & R. E. Cancelado [eds.], *Radcliffe's IPM World Textbook*, URL: <http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- FRANCO J.C., GROSS S., SILVA E.B., SUMA P., RUSSO A., MENDEL Z., 2003 – *Is mass-trapping a feasible management tactic of the citrus mealybug in citrus orchards?* - *Anais do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Tecnica de Lisboa*, vol. 49:, p. 353-367.
- FRANCO J.C., RUSSO A., SUMA P., SILVA E.B., DUNKELBLUM E., MENDEL Z., 2001 – *Monitoring strategies for the citrus mealybug in citrus groves*. - *Boll. Zool. Agrar. Bachic.*, 33:297-303.
- FRANCO J.C., SILVA E.B., CORTEGANO E., CAMPOS L., BRANCO M., ZADA A., MENDEL Z., 2008 – *Kairomonal response of the parasitoid Anagyrus spec. nov near pseudococci to the sex pheromone of the vine mealybug*. - *Entomol. Exp. Appl.*, 126:122-130.
- FRANCO J.C., SILVA E.B., FORTUNA T., CORTEGANO E., BRANCO M., SUMA P., LA TORRE I., RUSSO A., ELYAHU M., PROTASOV A., ZADA A., MENDEL Z., 2011 – *Vine mealybug sex pheromone increases citrus mealybug parasitism by Anagyrus sp. near pseudococci (Girault)*. - *Biol. control*, 58: 230-238.
- FRANCO J.C., SUMA P., DA SILVA E.B., BLUMBERG D., MENDEL Z., 2004 – *Management strategies of mealybug pests of citrus in Mediterranean countries*. - *Phytoparasitica*, 32:507-522.
- FRANCO J.C., ZADA A., MENDEL Z., 2009 – *Novel approaches for the management of mealybug pests*. In: Ishaaya I, Horowitz AR (eds.), *Biorational Control of Arthropod Pests*; Springer, Dordrecht, pp. 233-278.
- GIESELMANN M.J., HENRICK C.A., ANDERSON R.J., MORENO D.S., ROELOFS W.L., 1980 – *Responses of male California Red Scale to sex-pheromone isomers*. - *J. Insect. Physiol.*, 26:179-182.
- GROUT T.G., RICHARDS G.I., 1991– *Value of pheromone traps for predicting infestations of Red Scale, Aonidiella aurantii (Maskell) (Hom, Diaspididae), limited by natural enemy activity and insecticides used to control citrus thrips, Scirtothrips aurantii Faure (Thys, Thripidae)*. - *J. Appl. Entomol.*, 111: 20-27.
- HEFETZ A., KRONENBERG S., PELEG B.A., BAR-ZAKAY I., 1988 – *Mating disruption of the California red scale Aonidiella aurantii (Homoptera: Diaspididae)*. - *Proceedings of the Sixth International Citrus Congress (Tel Aviv, Israel)* 3: 1121-1127.
- HINKENS D.M., MCELFFRESH J.S., MILLAR J.G., 2001 – *Identification and synthesis of the sex pheromone of the vine mealybug, Planococcus ficus*. - *Tetrahedron Letters* 42, 1619-1621.
- JACAS J., KARAMAOUNA F., VERCHER R., ZAPPALÀ L., 2010 – *Citrus pest management in the Northern Mediterranean basin (Spain, Italy and Greece)*. In: *Integrated Management of Arthropod Pests and Insect Borne Diseases*. A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.), Springer: 3-26.
- LONGO S., MAZZEO G., RUSSO A., SISCARO G., 1994 – *Aonidiella citrina a new pest of citrus in Italy*. - *Informatore Fitopatologico*, 12: 19-25.
- LONGO S., MAROTTA S., PELLIZZARI G., RUSSO A., TRANFAGLIA A., 1999 – *Considerazioni su aspetti generali e applicati delle Cocciniglie (Homoptera Coccoidea)*. - *Atti Acc. Naz. It. Entom.*, 45: 281-318.
- MILLAR J.G., DAANE K.M., MCELFFRESH J.S., MOREIRA J.A., MALAKAR-KUENEN R., GUILLEN M., BENTLEY W.J., 2002 – *Development and optimization of methods for using sex pheromone for monitoring the mealybug Planococcus ficus (Homoptera: Pseudococcidae) in California vineyards*. - *J. Econ. Entomol.*, 95: 706-714.
- MILLAR J.C., 2012 – *Identification of the sex pheromone of the invasive scale Acutaspis albopicta (Hemiptera: Diaspididae), arriving in California on shipments of avocados from Mexico*. - *J. Econ. Entomol.*, 105: 497-594.
- NORDLUND D.A., LEWIS W.J., 1976 – *Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions*. - *J. Chem. Ecol.*, 2: 211- 220.
- ROELOFS W.L., GIESELMANN M.J., CARDE A.M., TASHIRO H., MORENO D.S., HENRICK C.A., ANDERSON R.J., 1977 – *Sex-pheromone of California Red Scale, Aonidiella aurantii*. - *Nature*, 267: 698-699.
- ROTUNDO G., TREMBLAY E., 1975 – *Sull'attrattività delle femmine vergini di due specie di pseudococcidi (Homoptera: Coccoidea) per un Imenottero parassita (Hymenoptera Chalcidoidea)*. - *Boll. Lab. Entomol. Agrar. F. Silvestri, Portici*, 32: 172-179.
- ROTUNDO G., TREMBLAY E., 1976 – *Osservazioni sull'attività di volo dei maschi di Pseudococcus calceolariae (Mask.) (Homoptera: Coccoidea)*. - *Boll. Lab. Entomol. Agrar. F. Silvestri, Portici*, 33: 108-112.

- ROTUNDO G., TREMBLAY E., 1981 – *Scent trailing by virgin females of Pseudococcus calceolariae*. - J. Chem. Ecol., 7: 85-88.
- ROTUNDO G., TREMBLAY E., 1985 – *Field evaluation of female sex pheromone of the artichoke moth, Gortyna xanthenes*. - Entomol. Exp. et Appl., 38: 201-204.
- SUMA P., RUSSO A., DUNKELBLUM E., ZADA A., MENDEL Z., 2001 – *Pheromonal and kairomonal activity of Planococcus citri pheromone and some of its analogs*. - Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura, 33: 305-312.
- SUMA P., DE CRISTOFARO A., RUSSO A., 2002 – *Osservazioni sull'attività di semiochimici di sintesi di Planococcus citri (Risso)*. - Atti XIX Congr. Naz. Ital. Ent. Catania 2002: 541-546.
- SUMA P., COCUZZA G.E., 2010 – *Grave infestazione su limone da Protopulvinaria pyriformis*. - L'Informatore agrario, 18: 72-74.
- TREMBLAY E., ROTUNDO G., 1978 – *La specificità feromonica quale meccanismo di isolamento riproduttivo in alcune Cocciniglie (Homoptera Coccoidea)*. - Atti XII Congr. Naz. Ital. Ent. Portici-Sorrento 1976: 135-138.
- VACAS S., ALFARO C., NAVARRO-LLOPIS V., PRIMO J., 2010 – *Mating disruption of California red scale, Aonidiella aurantii Maskell (Homoptera: Diaspididae), using biodegradable mesoporous pheromone dispensers*. - Pest Manag Sci., 66 (7): 745-751.
- VEILLEUX K., MILLER D.R., BEN-DOV Y., 2001 – *ScaleNet, Scales on a Host, Natural Enemies and Associates of a Scale*. <http://www.sel.barc.usda.gov/scalecgi/scaleson.exe?family=&scafamily=All&genus=Citrus&scalegenus=&species=>
- WILSON E.O., 1971 – *The insect societies*. Cambridge, MA, USA: The Belknap Press of Harvard University Press.
- ZADA A., DUNKELBLUM E., ASSAEL F., HAREL M., COJOCARU M., MENDEL Z., 2003 – *Sex pheromone of the vine mealybug, Planococcus ficus in Israel: occurrence of a second component in a mass-reared population*. - J. Chem. Ecol., 29: 977-988.
- ZAPPALÀ L., CAMPOLO O., SARACENO F., GRANDE S.B., RACITI E., SISCARO G., PALMERI V., 2008 – *Augmentative releases of Aphytis melinus (Hymenoptera: Aphelinidae) to control Aonidiella aurantii (Homoptera: Diaspididae) in Sicilian citrus groves*. - IOBC/wprs Bulletin, 38: 49-54.

## PROBLEMS WITH SCALE INSECTS IN VINEYARDS

CARLO DUSO (\*)

(\*) Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE), Università di Padova, Italia.  
Sintesi della lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Le cocciniglie delle piante coltivate: nuove acquisizioni e possibili strategie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 7 giugno 2013.

**SYNTHESIS** – A number of scale species can reach the status of pests in vineyards. Among them, *Parthenolecanium corni* (Bouché) (Coccidae) and *Planococcus ficus* (Signoret) (Pseudococcidae) proved to be the most important in Italy and elsewhere. Sometimes mixed populations of *P. corni* and *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon) (Coccidae) are recorded in vineyards.

*Parthenolecanium corni* is a polyphagous species that completes two generations in Italian vineyards. Damage is caused by sap feeding (reduction in vigour, defoliation) associated to honeydew and sooty mould on leaves and berries. *P. corni* can transmit a number of virus, i.e. the Leafroll complex (GLRaV-1) and the Rugose wood complex (GVA). Outbreaks in Italy are recorded from the 1990s. Among factors affecting them we can mention the disruption of biological control by pesticides, and the spread of some cultural practices (e.g., mechanical pruning, irrigation and fertilization). A number of predators (Coccinellidae and Chrysopidae) and parasitoids (Encyrtidae, Aphelinidae and Pteromalidae) can affect *P. corni* populations. However, the impact of parasitoids in vineyards seems to be not significant in the short term. Moreover, knowledge of pesticide effects on scales and their antagonists is limited. In North-eastern Italy, infestation levels of *P. corni* and *N. innumerabilis* were reduced on experimental vines where access to ants was hindered. Implications of this practice for coccid control should be considered.

*Planococcus ficus* occurs throughout the Mediterranean region, South Africa, parts of Asia, Mexico, and California (since 1994). It has been misidentified with *Planococcus citri* (Risso) for a long time. In the 1950s it was the most important pest of vines in Northern Italy. Currently infestations are recorded in several regions (e.g. Veneto, Emilia-Romagna, Tuscany, Sicily and Sardinia). Damage is associated to feeding on

phloem sap (reduction in plant vigour, defoliation, contamination of clusters, honeydew and sooty moulds) and the transmission of viruses such as Leafroll complex viruses (e.g. GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-5 and Rugose wood complex (including "Corky bark"). In Europe, GLRaV has not been considered a serious problem. This point of view has changed after recent *P. ficus* outbreaks in the Western USA, Israel and elsewhere. Moreover, the presence of *P. ficus* in vineyards could increase the risk of ochratoxins (OTA) occurrence on grapes. It has been reported that *Aspergillus* section *Nigri* incidence and the mean OTA concentration can be significantly higher in damaged berries than in undamaged ones.

The invasion of California vineyards by *P. ficus* has promoted a large number of studies. Sex pheromone has been identified and used for monitoring the pest. The identity of *P. ficus* and its parasitoids, in particular *Anagyrus pseudococci* (Girault) has been deeply investigated. Regarding *P. ficus* various techniques (e.g., RAPD-PCR, PCR-RFLP, DNA markers) proved to be useful to discriminate this species from *P. citri*. Regarding *A. pseudococci*, cultures of different origin (e.g. Argentina, USA, Israel, Italy, Spain) were established in the laboratory. The Argentine population proved to be reproductively incompatible with and genetically different from all other populations tested. The other form, which was established in California from previous introductions, belonged to a different species (*Anagyrus* sp. near *pseudococci*) that coexists with *A. pseudococci* in some areas (e.g., Sicily). The role of the sex pheromone in the host selection by *Anagyrus* sp. near *pseudococci* has been widely investigated in Portugal, Italy and Israel. Additional effects of pheromone components have been noticed on the rate of parasitism and host location.

The influence of temperature on *Anagyrus pseudococci* development and overwintering has

been investigated in California. Laboratory-data suggest that seven to eight *A. pseudococci* generations can occur during the vegetative season. Key biological parameters of *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci* reared on *P. citri* have been determined in Italy. Further research showed that *P. ficus*, *P. citri* and *Pseudococcus calceolariae* (Maskell) were able to encapsulate the eggs of *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci*; the rates of parasitism and encapsulation were higher in *P. citri* than in *P. ficus*. Investigations carried out in Sardinia showed that *P. ficus* is a suitable host for the parasitoid *Leptomastix dactylopii* Howard. However, this species produces less offspring when reared on *P. ficus* than on *P. citri*.

Several strategies have been explored to manage *P. ficus* populations in California: classical and augmentative biological control, mating disruption, chemical control against mealybugs and ants. At the same time studies on mealybug vector - virus type

specificity and transmission efficiency are planned to understand the epidemiology of Grape Leafroll disease.

The knowledge of side-effects of pesticides on mealybug natural enemies is crucial for IPM. Studies on this topic were performed on *A. near pseudococci* and *Coccidoxenoides perminutus*. Buprofezin and spirotetramat proved to be less toxic than cypermethrin and chlorpyrifos-ethyl. Pest management strategies regarding method and timing of pesticide applications where parasitoids constitute part of the pest management program should be refined.

Antagonistic interactions between ants and *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci* were assessed in the laboratory. Parasitism of vine mealybug by *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci* was negatively affected by ants. An adequate control of ants is recommended before any release of mealybugs' natural enemies.

## DISTRIBUZIONE E SIGNIFICATO DELLA SIMBIOSI FRA DIASPIDIDAE (RHYNCHOTA COCCOIDEA) E SEPTOBASIDIUM (FUNGI)

FRANCESCO PORCELLI (\*)

(\*) Dipartimento di Scienza del 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 "Le cocciniglie delle piante coltivate: nuove acquisizioni e possibili strategie di controllo".  
Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 7 giugno 2013.

### *Distribution and meaning of Diaspididae (Rhynchota) - Septobasidium spp. (Fungi) symbiosis*

Armoured scales exhibit a peculiar way of interaction with their habitat. This contribution focuses on the symbiosis between Diaspididae and *Septobasidium*, a Genus of Fungi. The phenomenon, healthy or infected armoured scales embedded into a thick and often two layered epiphytic fungal mat, is scarcely reported in, despite the large amount of Diaspididae collection in the country. The meaning of symbiosis is unclear, being the fungus considered a true symbionts (mutualist) or a parasite (entomopathogenic). Collection and accurate scrutiny of perennial smooth-bark trees and shrubs in resulted in abundant material and searching-dependent findings of the wanted association. Studies on the growth of fungal patch demonstrates that the fungus is a true entomopathogenic antagonist of armoured scales, whose species depends on its host-plant preference.

KEY WORDS: Natural biological control, *Aonidia lauri*; *Lepidosaphes flava*; *Sabaraspis ceardi*; *Suturaspis archangelskyae*; *Epidiaspis leperii*; *Diaspidiotus marani*.

### INTRODUZIONE

L'associazione fra numerose specie di Diaspididae e i funghi del genere *Septobasidium* è ampiamente documentata nei paesi equatoriali e tropicali caldo umidi. Il fenomeno è descritto come la presenza di un certo numero, spesso elevato, di cocciniglie incluse in uno spesso feltro fungino che cresce epifita sulle parti epigee di una pianta perenne. L'interpretazione di questa interazione è varia, di volta in volta gli Autori hanno parlato di simbiosi mutualistica (COUCH, 1931; 1938; WILLIAMS & BROOKES, 1995), di *Septobasidium* come entomopatogeno (CHAZEAU, 1981; EVANS & PRIOR, 1990; NAGARKATTI & SANKARAN, 1990; TANADA & KAYA, 1993) o come fitopatogeno (WHITTLE, 1992; KALSHOVEN, 1981; RATTAN, 1974). Molto spesso il fenomeno è stato, prudentemente descritto come associazione (BALACHOWSKY, 1947; BEN-DOV, 1988; DANZIG, 1993; DANZIG & KONSTANTINOVA, 1990; DE BOER & VALENTINE, 1977; DEKLE, 1976; FERRIS, 1952; MCKENZIE & NELSON-RESS, 1962; MILLER & DAVIDSON, 2005; MURAKAMI, 1970; TAKAGI *et al.*, 1988; WILLIAMS, 1980; WILLIAMS, & WATSON, 1988).

Le cocciniglie, maschi e femmine, sono avvolte più o meno strettamente da ife che possono o meno infettare i singoli individui. A quanto pare le femmine sono infettate in percentuali elevate, intorno al 50%, mentre i maschi sarebbero essenzialmente

indenni dal fungo. Le femmine infette raggiungono l'età adulta ma vengono rese sterili dal fungo che ne modifica anche la morfologia. Le femmine sane si riproducono normalmente e generano neanidi che si disperdono sul tallo alla ricerca di un riparo. Le neanidi neonate trovano spesso riparo al margine di questo e si fissano sul pavimento di feltro fungino e iniziano a nutrirsi. Il fungo, avanzando, le include nel proprio tallo.

Il fenomeno è stato interpretato come simbiosi mutualistica (COUCH, 1938) ovvero come entomopatogeno (TANADA & KAYA, 1993). Tali interpretazioni sono state riprese negli anni senza che vi sia chiarezza sull'interpretazione del fenomeno.

### L'ASSOCIAZIONE DIASPIDIDAE - SEPTOBASIDIUM

In Italia non è difficile individuare Diaspididae associati e inclusi in talli epifiti di *Septobasidium*, a patto di cercare su piante ospiti perenni con corteccia liscia che vivano in situazioni di elevata umidità locale. In effetti, un cespuglio denso di *Phyllirea latifolia* o di *Pistacia lentiscus* di una macchia mediterranea, una siepe anche urbana di *Laurus nobilis* e perfino piante in vaso della stessa specie, possono ospitare questa simbiosi.

Anche le foreste di Lauraceae delle Isole Canarie

sono ricche di campioni, addirittura associati a diaspidini infestanti le foglie. Naturalmente gli ambienti di foresta pluviale equatoriali o tropicali, sono prodighi di abbondanti raccolte.

I talli osservati in Italia sono di colore grigio-marrone, quelli di molte specie tropicali sono, invece, vivacemente colorati di rosso-arancio o grigio-blu.

Se i diaspidini che vivono sulla pianta si individuano con la sola lente d'ingrandimento, possiamo sospettare di avere a che fare con un *Septobasidium* epifita già in campo, quando lo spessore delle ife è considerevole, intorno o oltre il millimetro. Altre caratteristiche proprie del fungo si trovano sulla regione marginale del tallo che avanza sulla corteccia con un "pavimento" di ife e si ricopre poi con un "tetto" dai lobi confluenti.

In laboratorio, con un binoculare, si vedranno le neanidi che si sono appena fissate sul pavimento, fra pilastri di ife che congiungono i due strati del tallo.

In Italia le simbiosi di maggiori dimensioni sono quelle sostenute da *Aonidia lauri* (Bouché) e *S. michelianum* Pat. (HENK & VILGALYS, 2007) sui tronchi e branche di *Laurus nobilis* dove il diaspidino e il fungo occupano superfici vaste fino a circa , sebbene come risultato della confluenza di più talli. Peraltro non è raro incontrare simbiosi piccole, quasi puntiformi e subcircolari con diametri al di sotto del centimetro (Fig. 1).

#### I RAPPORTI SPAZIO-TEMPORALI FRA I DIASPIDIDAE E IL *SEPTOBASIDIUM*

Esplorando i talli si trovano numerose femmine circondate dalle ife fungine, alcune di queste femmine sono state infettate dal fungo, altre sono sane. Nei talli si trovano anche maschi che non vengono in genere infettati.

La densità delle ife è maggiore intorno alle femmine infettate, dove il fungo forma uno stroma fungino che le incapsula. Dallo stroma si separano poche decine di ife centripete che attraversano il vano fra gli scudetti per raggiungere la femmina inclusa, infettandola per via transcuticolare o transvulare.

Una volta montate su vetrino, le femmine infettate mostrano il gran numero di austeri a spirale (coiled) o moniliformi (sausage-like) che infarcano il loro corpo. Attraverso queste ife modificate il fungo estrae nutrienti dalla cocciniglia e ne influenza lo sviluppo. Infatti, le femmine infette subiscono una castrazione parassitaria e sono morfologicamente molto diverse da quelle sane.

Le femmine sane di Diaspididae sono circondate

da ife lasse e sono spesso incompletamente immerse nel tallo, dal quale sporgono con parte degli scudetti. Le femmine sane sono prolifiche e generano neanidi che evadono dagli scudetti materni per disperdersi sulla loro pianta ospite (Fig. 2).

I demi dei diaspidini sono già presenti sulla pianta quando vengono raggiunti dal fungo, normalmente veicolato da una neanide femminile infettata durante la dispersione. Da questa singola femmina, che viene castrata e uccisa, il tallo del *Septobasidium* si espande in senso centrifugo a ondate stagionali che corrispondono alla contemporanea presenza di acqua in forma liquida e di temperature di diversi gradi sopra lo zero centigrado.

L'infezione di nuove cocciniglie dovrebbe avvenire allo stadio di neanide sia a partire da basidiospore, che aderiscono alla cuticola dove germinano producendo brevi rami miceliari che restano latenti in attesa dello sviluppo dell'ospite, sia perché il tallo ingloba nuove neanidi che si fissano sulla pianta al proprio bordo.

In effetti, il tallo circonda, fra il proprio pavimento e il tetto sostenuto da pilastri (pillars), dei vani particolarmente graditi alle neanidi che sono in cerca di ripari. Queste neanidi, una volta fissate, saranno velocemente incluse dal fungo che potrà infettarle, eventualmente.

Non sappiamo se il *Septobasidium* possa infettare anche femmine di seconda età. Le femmine adulte non sono infettate perché le trasformazioni morfologiche sono già evidenti all'atto dell'ultima muta.

Ogni tallo ha, quindi, una regione centrale più matura e un margine più giovane e magari in crescita. I talli studiati in regioni pluviali tropicali o equatoriali tendono a bi-tri stratificare la propria crescita, mentre quelli incontrati in regioni meno calde e umide sono, normalmente, monostratificate.

Il voltinismo della specie di diaspidino regola la simbiosi dal punto di vista dell'insetto, mentre la crescita perenne del fungo segue ritmi stagionali. Non è difficile leggere sui talli la storia della loro crescita, che appare come cerchie di un tronco tagliato, e poter ricostruire le sciamature delle neanidi e la storia dell'infezione delle cocciniglie.

#### LE SPECIE DI DIASPIDIDAE COINVOLTE NELLA SIMBIOSI CON *SEPTOBASIDIUM* IN ITALIA

Cercando in habitat con elevatissima UR% per almeno alcune ore al giorno, ho facilmente trovato Diaspididae regolarmente associati a *Septobasidium* prope *michelianum*. Anzi, la simbiosi è tanto comune che i ritrovamenti sono pressoché proporzionali alle ricerche. Un minimo di esperienza

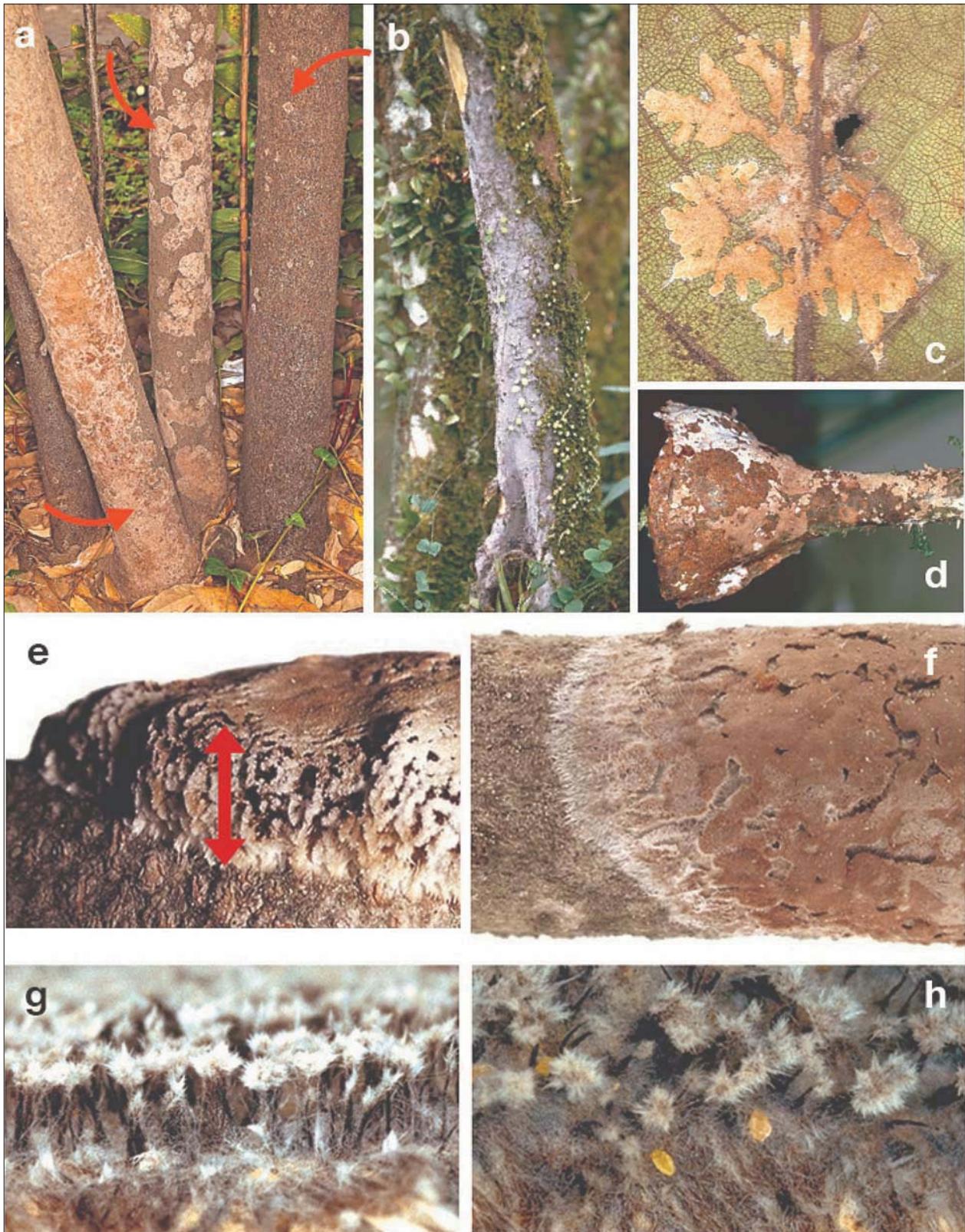


Fig. 1

Aspetto della simbiosi fra Diaspididae e *Septobasidium*: a) tronchi di alloro (*Laurus nobilis* L.) infestati da *Aonidia lauri* (Bouché) in simbiosi con *S. michelianum*, Bari Campus Universitario. Le frecce rosse indicano, da sinistra a destra, talli confluiti, talli isolati e talli piccoli; b) branca di *Citrus reticulata* Blanco infestata da *Unaspis* sp. e ricoperta da un *Septobasidium* sp. La Selva Biological Station, Costa Rica; c) Tallo di *Septobasidium* sp. associato a *Aonidiella lauretorum* (Lindinger) (?) ex *Heberdenia excelsa* (Ait.) Banks, Tenerife, Isole Canarie; d) base di peziolo fogliare di *Cyathea* sp. (Filices) popolata da Diaspididae e da un *Septobasidium* non identificati, Wilson Botanical Garden, San Vito Coto Brus, Puntarenas Costa Rica; e) margine estivo di *Septobasidium* sp. su *Pistacia lentiscus* L. Castellaneta Marina (TA), la doppia freccia indica lo spessore del tallo; f) margine in crescita di *Septobasidium* sp. su *Phyllirea latifolia* L. Chiatona (TA); g, h) due inquadrature dello stesso tratto di margine in crescita di un *Septobasidium* sp. dalla Costa Rica (La Selva Biological Station), per mostrare i pilastri che terminano con un fiocco di ife, bianche, e le neanidi gialle di un diaspino non identificato.

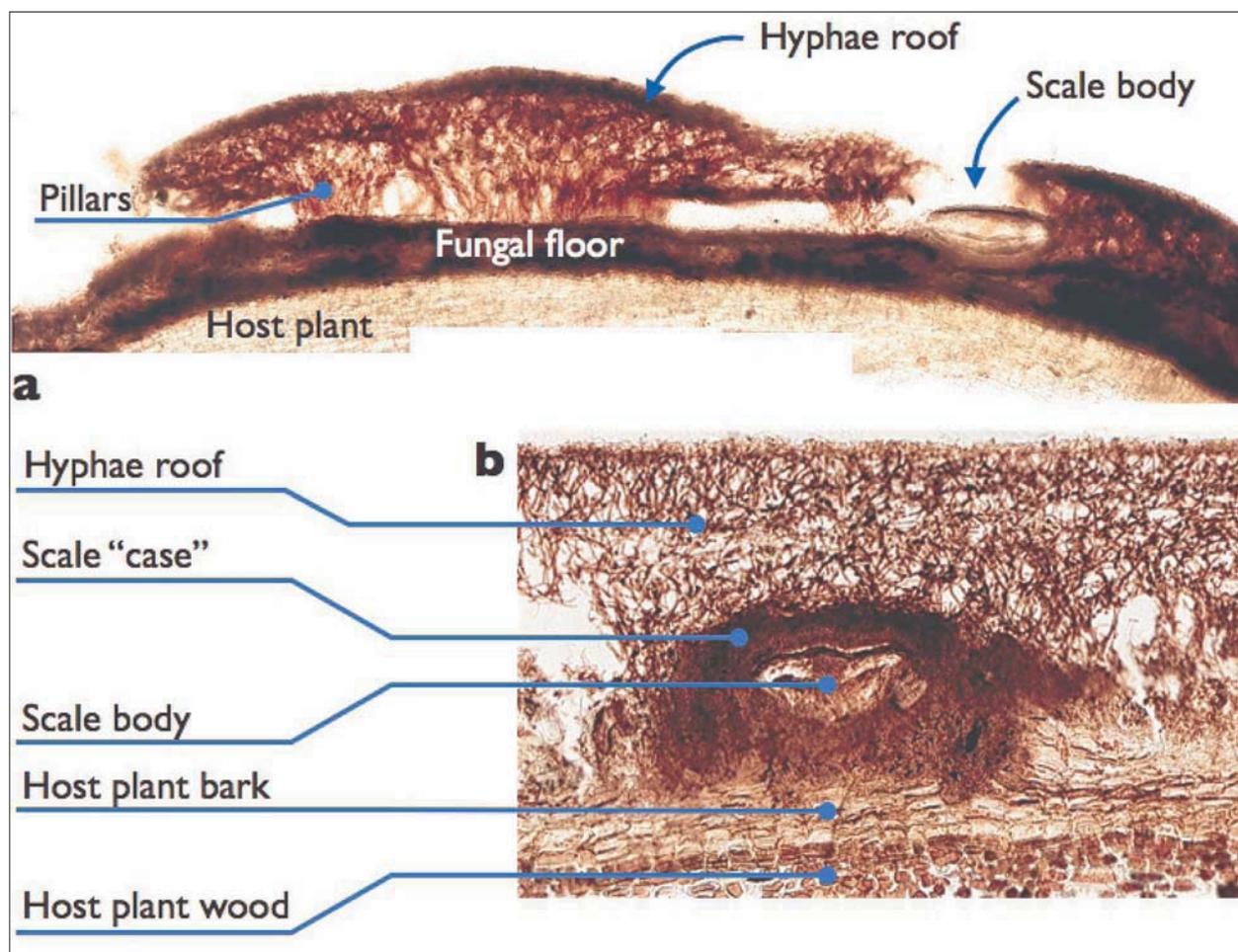


Fig. 2

Due sezioni della simbiosi fra Diaspididae e *Septobasidium*: *Sabaraspis ceardi* (Balachowsky) e *Septobasidium michelianum* Pat. ex *Pistacia lentiscus* L., Pineta di Patemisco Gallio, nei pressi di Ginosa Marina (TA). Le sezioni trasversali di un rametto di alcuni anni mostrano: a) circa 60° della circonferenza del ramo infestato dal diaspino e ricoperto dal tallo del fungo; b) una femmina inclusa nello stroma e infettata dal fungo.

insegna che le specie di diaspini coinvolte dipendono dalla pianta ospite, mentre il fungo si aggiunge in qualche modo all'associazione fitofago-pianta ospite. Di seguito elenco le specie e i reperti più comuni della simbiosi (Fig. 3).

*Aonidia lauri* (Bouché) infesta praticamente ogni pianta di *Laurus nobilis*. La simbiosi con il fungo si trova su piante molto popolate, addirittura incrostate, dal diaspino. Ampi talli, spesso confluenti, ricoprono il tronco e le branche principali degli allori, in particolare dove l'*Aonidia* si stratifica sulla corteccia. Molto più difficile è trovare infezioni da *Septobasidium* sulle foglie.

*Lepidosaphes flava* (Signoret) infesta frequentemente l'olivo e altre Oleaceae. Sulle branche di alcuni anni si trovano talli color beige, irregolari perché seguono le asperità del ramo. Il fungo include nel proprio spessore numerose femmine di *L. flava*, quasi tutte infettate. Talli raccolti su altre piante di olivo contenevano numerose femmine adulte tutte infettate e uccise da un aspidiotino

riferibile a *Diaspidiotus marani* (Zahradník). Non avendo trovato nemmeno una femmina sana non posso essere certo dell'identificazione, per le ricordate modificazioni morfologiche indotte dal fungo. Una simile associazione si trova su *Phyllirea latifolia* L., dove i talli sono evidenti su rametti e rami dei cespugli che abbiano almeno 5 millimetri circa di diametro. Su quest'ultima pianta, negli stessi talli ho raccolto anche molte *Epidiaspis leperii* (Signoret) infette. Evidentemente le due specie vivono e muoiono in demi misti sotto la stessa coltre fungina. Ulteriori notizie sulla presenza di *Septobasidium michelianum* associato a Diaspididae su olivo si trovano in PERROTTA & PACETTO (1973).

*Sabaraspis ceardi* (Balachowsky) è una specie di diaspino comune e diffusa sul lentisco (*Pistacia lentiscus* L.) del quale infesta la corteccia. Il diaspino è poco visibile, nonostante gli scudetti bianchi, per le piccole dimensioni e perché gli individui non sono numerosi e nemmeno aggregati sulla pianta. Un

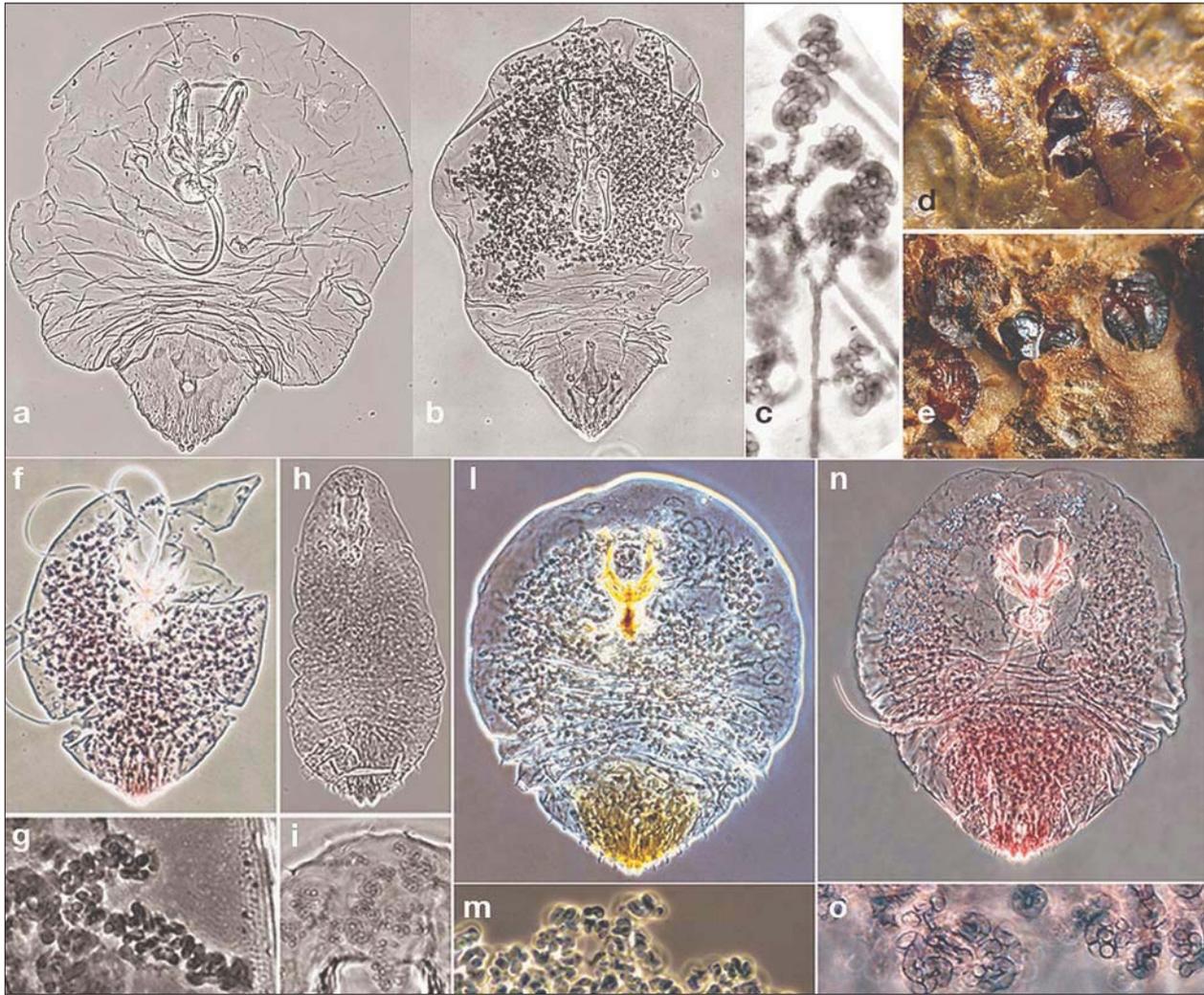


Fig. 3

Le specie di Diaspididae trovate, in Italia, incluse nel tallo di *Septobasidium* e infettate: *Aonidia lauri* (Bouché) ex *Laurus nobilis* L., a) femmina sana per confronto con b) femmina infettata e c) dettaglio degli austori del fungo; d) *Suturaaspis archangelskyae* (Lindinger) ex *Prunus persica* (L.) Batsch, tre femmine adulte incluse dal fungo; e) *Sabaraspis ceardi* (Balachowsky) ex *Pistacia lentiscus* L. femmine adulte incluse dal fungo; f) femmina infettata e g) austori; h) *Lepidosaphes flava* (Signoret) ex *Olea europaea* L. femmina infettata e i) austori; *Epidiaspis leperii* (Signoret) ex *Phillyrea latifolia* L., l) femmina infettata e m) suoi austori; n) *Diaspidiotus marani* (Zahradník) ex *Olea europaea* L. femmina infettata e o) austori.

*Septobasidium* rosso ruggine cresce in grandi talli lunghi fino a venti centimetri e contiene i diaspini a densità maggiori di quelle che la cocciniglia raggiunge se libera sulla corteccia. L'esame del tallo rivela molti individui di *S. ceardi* inclusi e infettati dal fungo.

Talli di un *Septobasidium* non identificato, associato a *Suturaaspis archangelskyae* (Lindinger) sono stati raccolti su pesco (*Prunus persica* (L.) Batsch), e su numerose altre drupacee in coltura. Dissecando i talli si trovano numerosissime femmine per lo più infette. Anche in questo caso la densità dei diaspini inclusi nel tallo è molto superiore a quella delle femmine libere sulla pianta. Nelle stesse situazioni *S. archangelskyae* è anche soggetta al controllo biologico naturale da *Fusarium larvarum* (PORCELLI & FRISULLO, 1998).

## CONCLUSIONI

La raccolta e lo studio della simbiosi fra Diaspididae e funghi del Genere *Septobasidium* in Italia si rivela particolarmente interessante per l'inaspettata quantità di campioni raccolti anche in ambienti urbani o di agricoltura intensiva, la complessità dell'interazione di un rapporto perenne del tipo uno/popolazione, l'ampio coinvolgimento delle specie di cocciniglie e delle piante ospiti, anche d'interesse economico (Fig. 4).

Nel complesso il fenomeno presenta molteplici aspetti interessanti sia per la ricerca di base che per quella applicata in ambienti naturali, disturbati o antropizzati.

Questo contributo riassume e aggiorna le scarse conoscenze sulla presenza dell'associazione fra

Diaspididae (Rhynchota) e funghi del genere *Septobasidium* in Italia. L'associazione fra insetti e funghi è molto più frequente di quanto non si creda ed è modulata dalla pianta ospite, che condiziona la

specie di diaspino. Il fungo si aggiunge alle altre due specie ove esistano le opportune condizioni ambientali, rappresentate da elevata umidità ambientale, fino alla condensazione, temperature

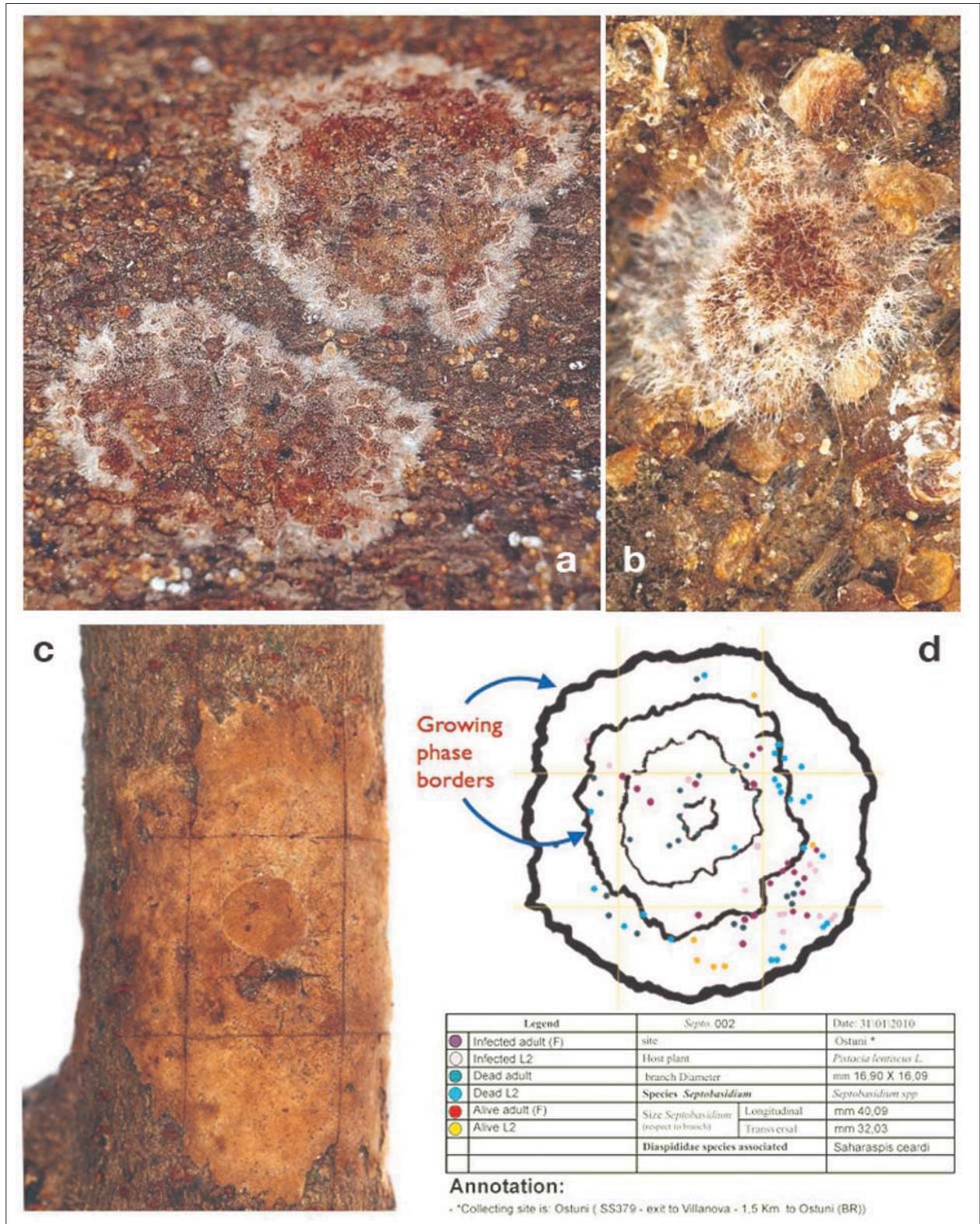


Fig. 4

*Septobasidium michelianum* Pat. e *Aonidia lauri* (Bouché) ex *Laurus nobilis* L. a) giovani talli in espansione; b) individuo "0" portatore dell'infezione e ucciso dal fungo. Ai margini del tallo si distinguono le esuvie del diaspino, incrostante sulla pianta ospite; c, d) esempio di analisi demografica della simbiosi.

minime superiori a 0°C e caratteristiche fisiche della corteccia della pianta ospite.

Le specie di Diaspididae osservate sono: *Aonidia lauri* (Bouché), *Lepidosaphes flava* (Signoret), *Diaspidiotus marani* (Zahradník), *Epidiaspis leperii* (Signoret), *Saharaspis ceardi* (Balachowsky) e *Suturaspis archangelskyae* (Lindinger). L'unica specie di *Septobasidium* identificata con certezza in questa indagine è *S. michelianum* Pat.

L'interazione fra i tre componenti di questa simbiosi è complessa e raffinata e culmina con la castrazione parassitaria delle femmine adulte di Diaspididae incluse ed infettate dal fungo.

#### BIBLIOGRAFIA

- BALACHOWSKY A.S., 1947 – *Sur un Rugaspidiotus nouveau associe a Septobasidium xylostroma Heim en Indo-Chine*. - Bulletin de la Société Entomologique de France, 52(2): 21-23.
- BEN-DOV Y., 1988 – *A taxonomic Analysis of the Armored Scale Tribe Odonaspidinae of the World (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae)*. - U.S. D.A., Agricultural Research Service, Technical Bulletin 1723, 142 pp.
- CHAZEAU J., 1981 – *La lutte biologique contre la cochenille transparent du cocotier Temnaspidiotus destructor (Signoret) aux Nouvelles-Hébrides (Homoptères Diaspididae)*. - Cahers O.R.S.T.O.M., sér. Biologique, 44: 11-22.
- COUCH J.N., 1931 – *The Biological Relationship between Septobasidium retiforme (B. & C.) Pat. and Aspidiotus Osborni New. and Ckll.* - Quarterly Journal of Microscopical Science: 383-438.
- COUCH J.N., 1938 – *The Genus Septobasidium*. - The University of North Carolina Press, 479 pp.
- DANZIG E.M., 1993 – *Fauna of Russia and neighbouring countries*. - Russian Academy of Sciences Zoological Institut, new series n° 144, 452 pp.
- DANZIG E.M., KONSTANTINOVA G.M., 1990 – *Coccoidea fauna (Homoptera, Coccinea) of Vietnam*. - USSR Academy of Sciences Proceedings of the Zoological Institute, Leningrad, 209: 38-52.
- DE BOER J.A.; VALENTINE E.W.; 1977 – *The identity of Leucaspis gigas (Homoptera: Diaspididae), with descriptions of four similar species in New Zealand*. - New Zealand Journal of Zoology, 4: 153-164.
- DEKLE G.W., 1976 – *Florida Armored Scale Insects. Arthropods of Florida and Neighboring Land Areas. 3*. - Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Gainesville, 345 pp.
- EVANS H.C., PRIOR C., 1990 – *Entomopathogenic fungi*. In: Armored scale insects their biology, natural enemies and control; World Crop Pest 4B, Rosen, Ed. Elsevier, Amsterdam, 3-17.
- FERRIS G.F., 1952 – *Report upon scale insects collected in China (Homoptera: Coccoidea)*. - Microentomology, 17: 7-9.
- HENK D.A., VILGALYS R., 2007 – *Molecular phylogeny suggests a single origin of insect symbiosis in the Pucciniomycetes with support for some relationships within the genus Septobasidium*. - American Journal of Botany, 94(9): 1515-1526.
- KALSHOVEN L.G.E., 1981 – *Pests of crops in Indonesia*. - P. T. Ichtiar Baru-Van Hoeve, Jakarta. 701 pp.
- MCDADE L.A., BAWA K.S., HESPENHEIDE H.A., HARTSHORN G. S. (Eds.), 1994 – *La Selva: ecology and natural history of a neotropical rainforest*. - Chicago: The University of Chicago Press, 486 pp.
- MCKENZIE H.L., NELSON-RESS W.A., 1962 – *Two new species and additional collection records for the genus Protodiaspis (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae)*. - Hilgardia, 33: 133-139.
- MILLER D.R., DAVIDSON J.A., 2005 – *Armored scale insect pests of trees and shrubs*. - Cornell University Press, 442 pp.
- MURAKAMI Y., 1970 – *A Review of Biology and Ecology of Diaspine Scales in Japan (Homoptera, Coccoidea)*. - Mushi, 43(7): 65-114.
- NAGARKATTI S., SANKARAN T., 1990 – *Tea*. In: Armored scale insects their biology, natural enemies and control; World Crop Pest 4B, Rosen, D. Ed. Elsevier, Amsterdam: 553-562.
- PERROTTA G., PACETTO M., 1973 – *Septobasidium michelianum, fungo simbiote di cocciniglie, osservato su piante di olivo, in Sicilia*. - Tecnica Agricola, 25(6): 421-426.
- PORCELLI F., FRISULLO S., 1998 – *The fungus Nectria aurantiicola Berk. et Br. (Fusarium larvarum Fuckel) a biocontrol agent of the armored scale Suturaspis archangelskyae (Lindinger) in Apulia (Southern Italy)*. - Entomologica, Bari, 32: 109-119.
- RATTAN S.C., 1974 – *Velvet blight*. - Quarterly News Letter, Tea Research Foundation of Central Africa, 35: 8 (Abstract).
- TAKAGI S., THO Y.P., KHOO S.G., 1988 – *Does Africaspis (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae) Occur In Asia?*. - Insecta Matsumurana, 39: 1-34.
- TANADA Y., KAYA H.K., 1993 – *Insect Pathology*. Academic Press, 666 pp.
- WHITTLE A.M., 1992 – *Diseases and pests of Citrus in Vietnam*. - FAO Plant Protection Bulletin, 40(3): 75-81.
- WILLIAMS D.J., 1980 – *Andaspis dasi Williams identical with A. numerata Brimblecombe (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) a species found on tea and associated with the fungus Septobasidium*. - Bulletin of Entomological Research, 70: 259-260.
- WILLIAMS D.J., BROOKES H.M., 1995 – *A review of the scale insect subtribe Andaspidina (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) and a new genus, Notandaspis, for two Australian species*. - Transactions of the Royal Society of South Australia, 119(3-4): 183-189.
- WILLIAMS D.J., WATSON G.W., 1988 – *The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region. 1. The Armoured Scales (Diaspididae)*. - C.A.B. International, Wallingford, UK. 290 pp.



## PSEUDOCOCCUS COMSTOCKI (KUWANA) SU FRUTTIFERI E ORNAMENTALI NELL'ITALIA NORD-ORIENTALE E IN ALTRI PAESI EUROPEI

GIUSEPPINA PELLIZZARI (\*) - NICOLA MORI (\*)

(\*) *Università di Padova, Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente DAFNAE, viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italy; giuseppina.pellizzari@unipd.it; nicola.mori@unipd.it*  
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Le cocciniglie delle piante coltivate: nuove acquisizioni e possibili strategie di controllo".  
Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 7 giugno 2013.

*Pseudococcus comstocki (Kuwana) on fruit trees and ornamentals in North eastern Italy and other European countries.*

*P. comstocki* (Kuwana) is a polyphagous mealybug native to Eastern Asia and incidentally introduced in many countries. It was first recorded in Western Europe (Italy and France) in 2004 on ornamental mulberry trees and later detected in other European countries. It is presently a pest in peach and apple orchards both in Italy and France. Damages consist mostly in fruit quality deterioration. Information on its distribution, host plants, phenology, ethology, damages and natural enemies in north-eastern Italy are reported. In North eastern Italy the species develops three annual generations and overwinters mostly in the egg stage. The parasitoid *Clausenia purpurea* (Ishi) (Encyrtidae) is an active natural enemy of the mealybug presently distributed in the Veneto region. A comparison with the natural enemies of *P. comstocki* recorded in France and in Japan, the native area of the mealybug, is reported,

KEY WORDS: *The Comstock mealybug*, peach and apple orchards, ornamentals, mulberry trees Europe.

### INTRODUZIONE

La cocciniglia asiatica *Pseudococcus comstocki* (Kuwana) (Hemiptera, Pseudococcidae) si è progressivamente diffusa nell'Italia nord orientale a partire dal 2004, anno della sua prima segnalazione su gelso (PELLIZZARI, 2005). Nello stesso anno la specie veniva segnalata in Francia, sempre su gelso (KREITER & GERMAIN, 2005). Pochi anni dopo si osservavano le prime infestazioni in pescheti del veronese, in meleti dell'Emilia-Romagna (PELLIZZARI *et al.*, 2008; VISIGALLI *et al.*, 2008; MASI *et al.*, 2010) e in meleti francesi (HANTZBERG *et al.*, 2008).

Dopo le recenti infestazioni verificatesi nel 2012 e nel 2013 in meleti biologici veronesi appare opportuna una rassegna su quanto noto sinora riguardo questa cocciniglia e sui possibili mezzi di contenimento.

### DISTRIBUZIONE

Individuato su gelso in Giappone e descritto da Kuwana (1902), *P. comstocki* è considerato originario dell'Asia orientale (Giappone, Corea, Cina), ed è presente anche in Cambogia Vietnam, Indonesia, Malesia. Si è progressivamente diffuso nelle

repubbliche centro-asiatiche (Afghanistan, Azerbaijan, Kazakistan, Kirgizstan, Tajikistan, Turkmenistan, Uzbekistan, Iran), in Russia e in paesi dell'ex Unione Sovietica (Armenia, Georgia, Moldavia, Ucraina) (ROMANCHENKO & BELSKAYA, 1981; BEN-DOV *et al.*, 2013); recentemente è stato segnalato in Turchia (KAYDAN & KOZAR, 2010).

Introdotta accidentalmente in California e New York (1918) e osservata dapprima su Catalpa e gelso, ha successivamente invaso anche molti altri Stati e il Canada (Ontario) dove si è dimostrato dannoso, oltre che a ornamentals, anche ai fruttiferi (melo, pero, pesco e albicocco), con pullulazioni verificatesi soprattutto tra gli anni '20-'40 e '70-'90 del secolo scorso (HOUGH, 1925; WOODSIDE, 1936; COX, 1940; PHILLIPS, 1961; MEYERDIRK & NEWELL, 1979; AGNELLO *et al.*, 1992; KOSZTARAB, 1996).

Occasionali segnalazioni riguardano Brasile e Argentina, le isole della Micronesia (BEN-DOV *et al.*, 2013).

In Italia *P. comstocki* si è diffuso in pochi anni nel Veneto, dall'iniziale focolaio in provincia di Verona e anche nelle province di Padova, Treviso e Venezia, ed in Emilia Romagna (province di Parma, Modena, Bologna, Ferrara), sia in ambiente urbano su ornamentals che in pieno campo (REGGIANI *et al.*, 2011; PELLIZZARI *et al.*, 2012).

In Francia è presente nei meleti delle regioni Provence-Alpes-Côte d'Azur e Languadoc-Roussillon, (HANTZBERG *et al.*, 2008; GROUSSIÉROUBOUT *et al.*, 2011).

In Europa, oltre ad Italia e Francia la cocciniglia è stata individuata, mediante trappole a feromoni, in Austria e Svizzera (KOZÁR, 2013, *in litteris*). In Croazia, è recente l'accidentale introduzione tramite importazione di frutta infestata dalla Cina (MASTEN MILEK & SIMALA, 2008; MASTEN MILEK *et al.*, 2009).

*P. comstocki* è quindi da considerare tra i “serial invaders”, cioè tra le specie che progressivamente e in breve tempo invadono paesi diversi a partire dall'areale di origine.

#### PIANTE OSPITI

*P. comstocki* è una specie altamente polifaga. Un elenco delle 47 famiglie botaniche che comprendono piante ospiti della cocciniglia è riportato in tab. 1 (BEN-DOV *et al.*, 2013); vi predominano specie appartenenti alle Rosaceae, ma non mancano segnalazioni su conifere e anche su *Ginkgo biloba*.

Il gelso e la catalpa sono ovunque le piante arboree più comunemente e intensamente infestate, mentre tra i fruttiferi sono da ricordare melo, pero, pesco nelle regioni temperate, agrumi, melograno, vite e svariate piante subtropicali nelle regioni più calde (MEYERDIRK & NEWELL, 1979).

In Italia *P. comstocki* è stato riscontrato su nume-

rose ornamentali (tab. 2) mentre le infestazioni economicamente dannose interessano pesco, melo e pero, sia in frutteti convenzionali che biologici; molto recentemente (2013) *P. comstocki* è stato individuato in provincia di Treviso anche su vite, già nota come pianta ospite della cocciniglia (MEYERDIRK & NEWELL, 1979; KAYDAN & KOZÁR, 2010).

#### IDENTIFICAZIONE

L'identificazione specifica basata sulla morfologia di femmine adulte montate su vetrino è spesso un ostacolo per la rapida determinazione di pseudococcidi, caratterizzati da similarità morfologiche le cui differenze possono essere colte solo da specialisti. *P. comstocki* è morfologicamente simile a *P. viburni* Signoret con il quale può essere confuso (Fig. 1) (COX, 1977).

Recenti lavori di analisi molecolare delle specie di pseudococcidi più comuni e dannose permettono di superare tale ostacolo. Lavori relativi a DNA barcodes di *P. comstocki* e altre specie affini sono stati messi a punto da MALAUSA *et al.* (2011), BELTRÀ *et al.* (2012), ABD-RABOU *et al.* (2012).

#### CICLO BIOLOGICO E FENOLOGIA

Lo svernamento è sostenuto dalle uova, deposte entro ovisacchi cerosi a partire dall'autunno; tal-

Tabella 1 – Famiglie botaniche che comprendono piante ospiti di *P. comstocki*.

Aceraceae	Loranthaceae
Amaryllidaceae	Lythraceae
Anacardiaceae	Meliaceae
Aquifoliaceae	Moraceae
Araceae	Musaceae
Araliaceae	Oleaceae
Asteraceae	Pandanaceae
Berberidaceae	Philadelphaceae
Betulaceae	Pinaceae
Bignoniaceae	Pittosporaceae
Buxaceae	Platanaceae
Cactaceae	Poaceae
Caprifoliaceae	Punicaceae
Celastraceae	Rhamnaceae
Crassulaceae	Rosaceae
Elaeagnaceae	Rubiaceae
Ericaceae	Rutaceae
Fabaceae	Salicaceae
Fagaceae	Sapindaceae
Ginkgoaceae	Taxaceae
Hippocastanaceae	Theaceae
Hydrangeaceae	Ulmaceae
Hypericaceae	Vitaceae
Lauraceae	

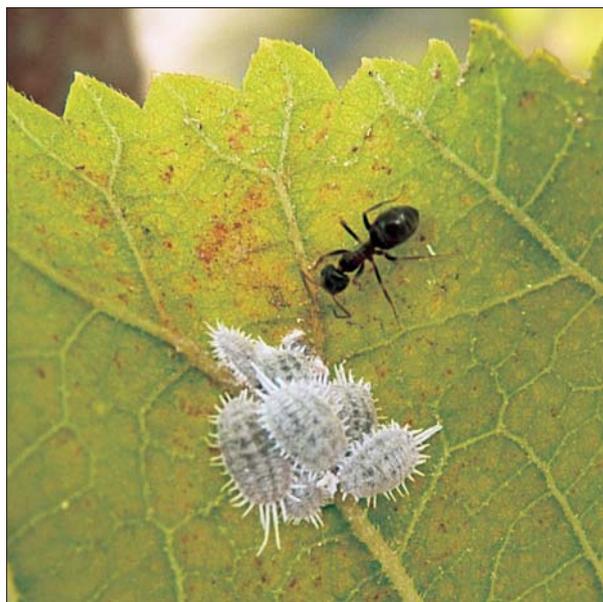


Fig. 1  
Femmine adulte di *P. comstocki*

Tabella 2 – Piante ospiti e località di reperimento di *P. comstockie* in Veneto e Emilia Romagna.

Pianta ospite	Località	Provincia	Anno
<b>Anacardiaceae</b>			
<i>Cotinus</i> sp.	Treviso	Treviso	2008
<b>Araliaceae</b>			
<i>Hedera helix</i>	Treviso	Treviso	2008
<b>Berberidaceae</b>			
<i>Mabonia aquifolium</i>	Treviso	Treviso	2008
<b>Betulaceae</b>			
<i>Carpinus betulus</i>	Treviso	Treviso	2008
<b>Bignoniaceae</b>			
<i>Catalpa bignonioides</i>	Castelnuovo del Garda	Verona	2007
<b>Caprifoliaceae</b>			
<i>Viburnum tinus</i>	Treviso S. Martino Buon Albergo Ca di David Verona	Treviso Verona Verona Verona	2006, 2008 2007 2008 2008
<b>Elaeagnaceae</b>			
<i>Elaeagnus</i> sp.	Treviso	Treviso	2008
<b>Hypericaceae</b>			
<i>Hypericum calycinum</i>	Castelnuovo del Garda	Verona	2006
<b>Moraceae)</b>			
<i>Morus alba</i>	Verona Dossobuono	Verona Verona	2004 2008
<i>Morus nigra</i>	Dossobuono Rizza Castel d'Azzano Alpo, Ca' di David Marchesino Bovo Verona Paese	Verona Verona Verona Verona Verona Verona Treviso	2008, 2009 2008 2008 2008 2008 2008 2011
<i>Morus pendula</i>	Castelnuovo del Garda	Verona	2009
<b>Oleaceae</b>			
<i>Jasminum</i>	Parma	Parma	2013
<b>Pittosporaceae</b>			
<i>Pittosporum tobira</i>	Treviso	Treviso	2008
<b>Rosaceae</b>			
<i>Cotoneaster horizontalis</i>	Treviso	Treviso	2008
<i>Malus communis</i>	Legnaro Ronco all'Adige Zevio	Padova Verona Verona	2007, 2008, 2011 2012 2013
<i>Prunus persica</i>	Alpo di Villafranca Dossobuono Lugagnano-Sona Verona- Dieci Bine Buttapietra Treviso	Verona Verona Verona Verona Verona Treviso	2006, 2007, 2013 2008, 2009 2007, 2008, 2009 2008 2008, 2010 2010
<i>P. laurocerasus</i>	Treviso Villafranca	Treviso Verona	2006, 2008 2008
<i>Pyracantha coccinea</i>	Treviso	Treviso	2008
<i>Pyrus communis</i>	Legnaro Cavarzere	Padova Venezia	2007, 2008, 2011 2012
<i>Pyrus</i>	Novi di Modena	Modena	2006-2009
<i>Pyrus</i>	Cavenazzo	Modena	2006-2009
<i>Pyrus</i>	San Felice	Modena	2006-2009
<i>Pyrus</i>		Bologna	2007, 2011
<i>Pyrus</i>		Ferrara	2011
<b>Vitaceae</b>			
<i>Vitis vinifera</i>	Meolo	Treviso	2013

volta sono state osservate anche rare femmine o rari stadi giovanili negli anfratti della corteccia nei mesi invernali (MEYERDIRK & NEWELL, 1979; PELLIZZARI *et al.*, 2012; MALUMPHY, *in litteris*).

La durata del ciclo biologico e il numero di generazioni annuali (2-4) sono influenzati dalle condizioni meteorologiche dei diversi paesi. In Cina e in Corea del Sud la specie svolge tre generazioni all'anno (JEON *et al.*, 2003; LIU, 2004; ZHENG, 2006).

Negli Stati Uniti, dove *P. comstocki* è presente da quasi un secolo, si verificano in California da tre a quattro generazioni per anno (BARTLETT & CLANCY, 1972; MEYERDIRK & NEWELL, 1979), in Virginia tre (HOUGH, 1925; KOSZTARAB, 1996), mentre nello Stato di New York, caratterizzato da clima più freddo, ne avvengono solo due, con presenza di femmine adulte tra luglio e agosto (prima generazione) e da fine agosto in poi (seconda generazione) (AGNELLO *et al.* 1992).

Anche in Ucraina sono state osservate due generazioni annuali (ROMANCHENKO & BELSKAYA, 1981).

In Francia, nelle due località di studio site in Vaucluse e Alpes-Maritimes, secondo FLEISCH *et al.* (2011) si svolgono due generazioni annuali, con picchi presenze di neanidi di 1° età a metà luglio e in settembre

In Italia, dove la biologia di CMB è stata studiata in dettaglio in screenhouse e verificata in un pescheto commerciale in provincia di Verona (PELLIZZARI *et al.*, 2012), *C. comstocki* compie tre generazioni annuali. La schiusura delle uova svernanti avviene da marzo ad aprile, in concomitanza con l'emissione delle foglie (es. su gelso) delle piante ospiti o la caduta dei petali (su melo) e le neanidi neonate si spostano dal legno alla pagina inferiore delle foglie o dei mazzetti fiorali. Le prime femmine adulte compaiono all'inizio di giugno e si osservano fino a metà luglio circa.

La deposizione delle uova, che avviano la seconda generazione, avviene tra l'ultima decade di giugno e l'inizio di luglio.

Le femmine adulte di seconda generazione sono presenti dall'inizio di agosto fino a metà settembre circa e ovidepongono fino a settembre avanzato.

Le prime femmine adulte della terza e ultima generazione compaiono dall'inizio di ottobre in poi, mentre la deposizione delle uova destinate a svernare inizia all'incirca a metà ottobre e può proseguire a ritmo decrescente fino alla prima decade di novembre quando ancora si possono trovare sul legno rare femmine ovideponenti. Questa tardiva deposizione di uova viene confermata nei paesi dove la fenologia di *P. comstocki* è stata studiata all'aperto nel corso dell'intera annata (HOUGH,

1925; JEON *et al.*, 2003; PELLIZZARI *et al.*, 2012) mentre può sfuggire dove i campionamenti vengono interrotti in ottobre, a raccolta avvenuta, e vengono perciò identificate solo due generazioni.

Riguardo alla fecondità in una preliminare prova di laboratorio condotta in Italia (RAINATO, 2009) è emerso che alla temperatura di 25° la fecondità media è stata di 214 uova/ femmina (minimo 68, massimo 321), mentre a 30 °C di sole 29 uova/ femmina (minimo 3, massimo 69). Questi dati sono in accordo con uno studio di HEIDARI, (1999) in cui, sempre in laboratorio, la fecondità media a 26° e 30° è stata rispettivamente di 226 e 58 uova/femmina. In Francia, secondo uno studio di HANTZBERG *et al.*, (2008) a 23° la fecondità media è di 200 uova (minimo 65, max 420 uova/femmina).

## ETOLOGIA

*P. comstocki* è una specie molto mobile e il ciclo biologico è caratterizzato dagli spostamenti delle neanidi della linea femminile e maschile e delle femmine preovigere dal legno alle foglie e viceversa.

Le uova svernanti vengono deposte sul tronco e sui rami delle piante ospiti, in ovature dall'aspetto cotonoso, inserite sotto la corteccia, entro anfrattuosità del legno o altri luoghi protetti. In primavera, in coincidenza con lo sviluppo delle nuove foglie, le neanidi neonate si spostano dal legno e si localizzano sui mazzetti fiorali del melo e sulla pagina inferiore delle foglie, generalmente vicino alla nervatura principale, iniziando a nutrirsi. Raggiunta la seconda età, le neanidi della linea maschile abbandonano in buona parte le foglie e si spostano sul legno dove, in luoghi protetti formeranno un incospicuo pupario entro il quale completano il loro sviluppo, sfarfallano, per poi morire entro due giorni. Per tale motivo i maschi sono difficilmente visibili in pieno campo nel corso di ispezioni, mentre i loro voli sono ben identificabili con l'impiego di trappole a feromoni.

Le neanidi, soprattutto quelle di 3<sup>a</sup> età, e le femmine adulte, manifestano una chiara tendenza ad abbandonare le foglie per ricercare anfrattuosità del tronco dove completare il ciclo e deporre le uova (Fig. 2). In questa fase di ricerca di zone protette, molte si insediano stabilmente nella cavità peduncolare e calicina dei frutti, sia immaturi che prossimi alla raccolta, ove vengono anche deposte le uova (Fig. 3, 4). Su piante giovani, con corteccia liscia, che non offre ripari, le femmine scendono fino alla base della pianta e possono deporre al colletto, sulle radici affioranti o anche tra le erbe o sul terreno.

Una quota della popolazione tuttavia permane



Fig. 2  
Ovisacchi su tronco di pesco durante l'estate.



Fig. 3  
Pesca infestata da femmine e stadi giovanili in giugno.

sulle foglie fino alla deposizione delle uova, che vengono deposte a ridosso dalla nervatura principale in ammassi che spesso comprendono ovature di più femmine (Fig. 5).

#### SINTOMATOLOGIA E DANNI

I danni sono causati dalla suzione di linfa, dall'emissione di abbondante melata e dal conseguente sviluppo di fumaggini. Sintomi dell'attacco e



Fig. 4  
Pesca infestata da femmine in agosto.



Fig. 5  
Ovisacchi di femmine della prima generazione sulla pagina inferiore di una foglia di melo.

danni possono essere osservati sulle diverse parti della pianta.

- Su foglie: imbrattamento da cera bianca (ovisacchi, esuvie), melata, fumaggini, caduta anticipata.
- Su parti legnose (tronco, rami, rami dell'anno): visibile presenza di ammassi di cera bianca (ovisacchi) su rami e tronchi, melata e fumaggini; aggregazione di cocciniglie su tagli di potature cicatrici, ecc.; sviluppo di pseudogalle su giovani rami di gelso (Fig. 6).
- Su frutti immaturi e maturi: malformazione e disseccamento di frutticini (su melo), presenza di stadi giovanili, femmine e ovature nelle cavità peduncolari e calicine, imbrattamento di melata e fumaggine (Fig. 7), sviluppo di marcescenza a partire dalle cavità peduncolare e calicina.

L'attività della cocciniglia ha un impatto economico diverso a seconda che siano attaccate piante



Fig. 6  
Aggregazioni di pseudococcidi su rametti e ferite di potatura.



Fig. 7  
Fumaggine su mela in settembre, alla raccolta.

fruttifere o ornamentali. Sui frutti di pesco e melo i danni derivano, oltre che dalle lesioni di nutrizione, soprattutto dallo sviluppo di fumaggini, in quanto i frutti imbrattati subiscono un notevole deprezzamento economico se destinati al consumo fresco.

Su gelso e ornamentali il danno è estetico in quanto, con forti infestazioni, vi è annerimento della vegetazione e caduta anticipata delle foglie.

#### DISPERSIONE

Le formiche concorrono attivamente alla diffusione della cocciniglia. In campo le formiche trasportano cocciniglie tra le mandibole, dalle foglie o dai rami fino alla zona del colletto, dove, sulle prime radici si formano piccole colonie, continuamente accudite dalla formiche che provvedono a

coprire tale zona con uno straterello terroso protettivo. Queste piccole colonie passano del tutto inosservate in quanto mascherate dalla terra e, in caso di lotta chimica, sfuggono all'azione della sostanza attiva eventualmente distribuita sulla chioma (Fig. 8).

La dispersione passiva ha un ruolo notevole, ed è favorita dalla mobilità delle femmine che spesso per ovideporre sulle parti basali della pianta, si lasciano cadere dalle foglie, cadendo possono casualmente posizionarsi su oggetti che vengono poi movimentati su lunghe distanze. Le foglie con ovisacchi, annerite e cadute a terra, vengono facilmente disperse con il vento contribuendo a diffondere la specie. La raccolta di frutti infestati e lo spostamento dei cassoni di raccolta della frutta da un'azienda all'altra concorrono a disperdere la specie tra i frutteti mentre il commercio di frutti infestati assume un ruolo minore (BARTLETT & CLANCY, 1972; MASTEN MILEK *et al.*, 2009).

In questo contesto non è da trascurare la diffusa presenza del gelso nel paesaggio agrario del Veneto, dove la sericoltura era un tempo molto diffusa. Il gelso è ovunque la pianta ospite più comune di *P. comstocki* e queste piante agiscono perciò come centri di mantenimento e di dispersione della specie che da questi alberi può passare ai frutteti confinanti.

#### NEMICI NATURALI

In Giappone, areale originario di *P. comstocki*, sono soprattutto tre i parassitoidi più frequenti ed efficaci della cocciniglia: *Clausenia purpurea*



Fig. 8  
Colonia di *P. comstocki* nella zona del colletto, su melo

(Ishii), parassitoide solitario di *P.comstocki* e pochi altri pseudococcidi (NOYES & HAYAT, 1994), *Pseudaphycus malinus* Gahan, *Allotropa burrelli* Muesebeck e *A. convexifrons* Muesebeck, parassitoidi specifici e gregari (MURAKAMI *et al.*, 1967).

In Cina DONG (1993) riporta l'elevata predazione da parte di *Cryptolaemus montrouzieri* sia a carico di stadi mobili sia a carico di uova di *P. comstocki* con una riduzione dell'88% e del 91% rispettivamente.

In seguito agli insuccessi della lotta chimica contro *C. comstocki*, i parassitoidi *A. burrelli* e *P. malinus* sono stati importati a più riprese dal Giappone alla California e impiegati con successo in programmi di lotta biologica. *C. purpurea* invece è arrivata insieme al suo ospite negli Stati Uniti dell'Est, dove risulta frequente ed efficace, in particolare contro la terza generazione di *C. comstocki*, mentre ha difficoltà di insediamento in California dove è stato introdotto (COX, 1940; CLANCY, 1944; HAEUSSLER & CLANCY, 1944; BARTLETT & CLANCY, 1972; MEYERDIRK & NEWELL, 1979a; MEYERDIRK *et al.*, 1981).

In provincia di Verona e Treviso le indagini condotte nel 2007 e 2008 hanno evidenziato la presenza di 4 specie di parassitoidi a carico di *P. comstocki* (tab. 3) (GUERRIERI e PELLIZZARI, 2009); tra questi, la specie più diffusa e importante è *Clausenia purpurea* (Ishii). La stessa è stata trovata in Francia pochi anni dopo (FLEISCH *et al.*, 2011). In entrambi i casi questo parassitoide, mai segnalato prima in Europa, è arrivato insieme al suo ospite, senza quindi introduzioni intenzionali.

In Francia, le indagini effettuate su gelsi infestati dalla cocciniglia hanno permesso il ritrovamento anche di *P. malinus* (FLEISCH *et al.*, 2011).

I Coccinellidi *Harmonia axyridis* (Pallas) e *Cryptolemus montrouzieri* sono stati osservati solo occasionalmente rispettivamente in Italia e

Francia meridionale (MASI *et al.*, 2010; FLEISCH *et al.*, 2011).

I parassitoidi e predatori di *P. comstocki* noti in Italia, Francia e Giappone sono riportati in tab. 3.

#### CONCLUSIONI

*P. comstocki* è un fitofago emergente già presente in alcuni paesi europei e dannoso ai fruttiferi e piante ornamentali in Francia e Italia. Le recenti infestazioni (2012, 2013) verificatesi nel Veneto in meleti biologici sono probabilmente da imputare ai ripetuti trattamenti con insetticidi a largo spettro d'azione che, eliminando il parassitoide, hanno consentito l'aumento delle densità di popolazione della cocciniglia. Il caso opposto si è verificato in un pescheto a conduzione tradizionale ed in un parco urbano, dove la diminuzione dei trattamenti chimici (PELLIZZARI *et al.*, 2012) ha permesso il ripopolamento naturale da parte del parassitoide e il contenimento di *P. comstocki* a livelli numerici non dannosi. La presenza di *C. purpurea* nel territorio è assicurata dalle piante di gelso che fungono da serbatoi naturali sia della cocciniglia ma anche del suo parassitoide. In caso forti infestazioni, con conseguente presenza di un elevato numero di uova svernanti sui tronchi, si consiglia, nell'annata successiva, di intervenire con prodotti neurotossici (ammessi per le specifiche colture), attivati o meno con oli minerali paraffinici, in presenza di neanidi di prima età, della prima generazione. Negli ambienti monitorati del Veneto queste sono presenti all'incirca da metà aprile a metà maggio, e si localizzano sulla pagina inferiore delle foglie. In ambiente urbano su ornamentali è risultato efficace anche l'impiego di neonicotinoidi applicati per fertirrigazione alla comparsa delle prime neanidi. Il comportamento migratorio delle neanidi di età più avanzata e delle

Tabella 3 – Nemici naturali di *P. comstocki* riscontrati rispettivamente in Giappone, Italia e Francia.

	Giappone	Italia	Francia
Encyrtidae	<i>Pseudaphycus malinus</i> Gahan.	<i>Pseudaphycus maculipennis</i> Mercet	<i>Pseudaphycus malinus</i> Gahan.
	<i>Clausenia purpurea</i> Ishii	<i>Clausenia purpurea</i> Ishii	<i>Clausenia purpurea</i> Ishii
	<i>Anagyrus</i> sp <i>Anagyrus subalbipes</i> Ishii	<i>Anagyrus</i> sp. near <i>pseudococci</i> (Girault)	<i>Anagyrus</i> sp
		<i>Chrysoplatycerus splendens</i> (Howard)	<i>Leptomastidea bifasciata</i> Mayr <i>Leptomastix epona</i> Walker
Platygasteridae	<i>Allotropa burelli</i> Muesebeck <i>Allotropa convexifrons</i> Muesebeck		
Coccinellidae	<i>Cryptolemus montrouzieri</i> Mulsant	<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas)	<i>Cryptolemus montrouzieri</i> Mulsant

femmine adulte, assieme all'attività insidiosa delle formiche, potrebbero rendere meno efficaci trattamenti eseguiti in epoche diverse.

#### BIBLIOGRAFIA

- AGNELLO A.M., SPRANGLER S.M., REISSIG W.H., LAWSON D.S., WEIRES R.W., 1992 - *Seasonal development and management strategies for Comstock mealybug (Homoptera: Pseudococcidae) in New York pear orchards.* - Journal of Economic Entomology, 85, 212-225.
- BARTLETT B.R., CLANCY D.W., 1972 - *The Comstock Mealybug in California and observations on some of its natural enemies.* - Journal of Economic Entomology, 65: 1329-1332.
- BELTRÀ, A., SOTO, A. & MALAUSA, T., 2012 - *Molecular and morphological characterisation of Pseudococcidae surveyed on crops and ornamental plants in Spain.* - Bulletin of Entomological Research, 102:165-172
- BEN-DOV Y., MILLER D.R., GIBSON G.A.P., 2013 - ScaleNet: a database of the scale insects of the world. <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm> (Accessed September 2013).
- BURGIO G., SANTI F., LANZONI A., MASETTIA., DE LUIGI V., MEANDRI M., REGGIANI A., RICCI C., LOOMANS A. J. M., MAINI S., 2008 - *Harmonia axyridis recordings in northern Italy.* - Bulletin of Insectology, 61: 361-364.
- CLANCY D.W., 1944 - *Hyperparasitization of Clausenia purpurea Isbii, an important parasite of the Comstock mealybug.* - Journal of Economic Entomology, 37(3): 450-451.
- COX J.A., 1940 - *Comstock's mealybug on apple and catalpa.* - Journal of Economic Entomology, 44: 445-447.
- COX J. M., 1977 - *Status of New Zealand records of Pseudococcus comstocki and P. maritimus (Homoptera: Pseudococcidae).* - New Zealand Journal of Zoology, 4:2, 165-166
- DELGADO M., 2008 - *Cochenille farineuse: la lutte biologique à l'essai.* - L'arboriculture Fruitière, 624: 30-31.
- DONG, H., 1993 - A preliminary study on the occurrence of *Pseudococcus comstocki* (Hom.: Pseudococcidae) on *Clivia miniata* and its control with inundative release of *Cryptolaemus montrouzieri* (Col.: Coccinellidae). (In chinese, Summary in inglese). - Chinese Journal of Biological Control 9 (1): 12-14.
- FLEISCH A., KREITER P., PEDIO J., HANTZBERG H., GIUGE L., PEREZ L., RIS N., MALAUSA T., BRANCACCIO F., GROUSSIER-BOUT G., WAROT S., KREITER P., 2011 - *Lutte biologique contre Pseudococcus comstocki Kuwana (Hemiptera, Pseudococcidae) en France: état de lieux des recherches.* AFPP-Les cochenilles: ravageur principal ou secondaire. Montpellier, 25 Octobre 2011 (ISBN: 978-2-905550-25-5, AFPP, octobre 2011): 1-10.
- GROUSSIER-BOUT G., FLEISCH A., KREITER P., GERMAIN J.F., BRANCACCIO L., BESSAC M., WAROT S., RIS N., MALAUSA T., 2011 - *Etat des lieux en France de la repartition de Pseudococcus comstocki (Hemiptera, Pseudococcidae) en 2011.* AFPP, Les cochenilles: ravageur principal ou secondaire. Montpellier, 25 Octobre 2011 (ISBN: 978-2-905550-25-5, AFPP, octobre 2011):1-9.
- GUERRIERI E., PELLIZZARI G., 2009 - *Parasitoids of Pseudococcus comstocki in Italy: first records of Clausenia purpurea and Chrysoplatycerus splendens from Europe.* - Bulletin of Insectology, 62 (2): 179-182.
- HAEUSSLER, G.J. & CLANCY, D.W., 1944 - *Natural enemies of Comstock mealybug in the eastern states.* Journal of Economic Entomology 37(4): 503-509.
- HANTZBERG H., GILI A., GIUGE L., KREITER P., 2008 - *Etude des traits d'histoire de vie de Pseudococcus comstocki (Hemiptera, Pseudococcidae) et inventaire faunistique préliminaire dans le Sud de la France.* AFPP - 8ème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture. Montpellier, 22 et 23 Octobre 2008: 573-580.
- HEIDARI M., 1999 - *The intrinsic rate of increase and temperature coefficients of the Comstock mealybug, Pseudococcus comstocki (Kuwana) (Hemiptera Coccoidea Pseudococcidae).* - Entomologica, 33: 297-303
- HOUGH W.S., 1925 - *Biology and control of Comstock's mealy bug on the umbrella catalpa.* - Virginia Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 29, 27 pp.
- JEON H.Y., KIM D.S., CHO M.R., CHANG Y.D., YIEM M.S., 2003 - *Temperature-dependent development of Pseudococcus comstocki (Homoptera: Pseudococcidae) and its stage transition models.* - Korean Journal of Applied Entomology, 42 (1): 43-51.
- KAYDAN, M.B. & KOZAR, F., 2010 - *New and rare mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae, Putoidae) from Eastern Anatolia (Turkey).* - Zoosystematica Rossica 20 (1): 28-39
- KREITER P., GERMAIN J.F., 2005 - *Pseudococcus comstocki, espèce nouvelle pour la France et Aonidiella citrina, nouvelle pour la Corse (Hem., Pseudococcidae et Diaspididae).* - Bulletin de la Société entomologique de France, 110: 132.
- MALAUSA T., FENIS A., WAROT S., GERMAIN J.-F., RIS N., PRADO E., BOTTON M., VANLERBERGHE-MASUTTI F., SFORZA R., CRUAUD C., KREITER P., 2011 - *DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae).* - Journal of Applied Entomology 135: 142-155
- MASI A., REGGIANI A., MAINI S., 2010 - *Indagini su Pseudococcus comstocki su pero in provincia di Modena.* - Atti delle Giornate Fitopatologiche 2010, I: 89-92.
- MASTEN MILEK T., SIMALA M., KORI B., 2009 - *The scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of imported fruits in Croatia.* Lectures and papers presented at the 9th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation, Nova Gorica, 4-5 March, 2009: 385-388.
- MEYERDIRK D.E., NEWELL I.M., 1979 - *Seasonal development and flight activity of Pseudococcus comstocki in California.* - Annals of the Entomological Society of America, 72: 492-494.
- MEYERDIRK D.E., NEWELL I.M., 1979a - *Importation, colonization, and establishment of natural enemies on the Comstock mealybug in California.* - Journal of Biological Control 72(1): 70-73.
- MEYERDIRK D.E., NEWELL I.M., WARKENTIN R.W., 1981 - *Biological control of Comstock mealybug.* - Journal of Economic Entomology, 74: 79-84.
- MURAKAMI Y., MORIMOTO R., KAJITA H., 1967 - *Possibility of biological control of Pseudococcus comstocki in Japan.* - Mushi, 39 (Suppl.): 85-96.
- PELLIZZARI G., 2005 - *Cocciniglie nuove o poco note potenzialmente dannose per l'Italia: Fiorina pinicola Maskell, Pseudococcus comstocki (Kuwana), Peliococcus turanicus (Kiritshenko).* - L'Informatore Fitopatologico, 6: 20-25.
- PELLIZZARI G., DUSO C., RAINATO A., VISIGALLI T., 2008 -

- Pseudococcus comstocki* (Kuwana) (Hemiptera Pseudococcidae) pest of peach in north-eastern Italy. Proceedings of the XI International Symposium on Scale Insects Studies, Oeiras, Portugal, 24-27 September 2007, ISA Press, Lisbon: 158.
- PELLIZZARI G., DUSO C., RAINATO A., POZZEBON A. ZANINI G., 2012 – *Phenology, ethology and distribution of Pseudococcus comstocki, an invasive pest in north-eastern Italy.* - Bulletin of Insectology 65 (2): 209-215.
- PHILLIPS J.H.H., 1961 – *An infestation of Comstock mealybug, Pseudococcus Comstocki (Kuw.) (Homoptera: Coccoidea) on peach in Ontario.* - Proceedings of the Entomological Society of Ontario, 91: 268-270.
- RAINATO A., 2009 – *Morphological and ecological studies on Hemiptera Coccoidea.* - Tesi di Dottorato, XXI ciclo, Università di Padova, Dottorato in Scienze delle Produzioni Vegetali, 161pp.
- REGGIANI A., BARISELLI M., MAINI S., 2011 – *Una cocciniglia esotica insidia la frutticoltura.* - Agricoltura-Mensile della Regione Emilia-Romagna, 4: 93-95.
- ROMANCHENKO A.A., BEL'SKAYA N.M. 1981 – *The Comstock mealybug in the Odessa region (in Russo).* - Zashchita Rastenii, 4, 41 pp.
- VISIGALLI T., PELLIZZARI G., RAINATO A., TOSI L., MARCHESINI E., 2008 - *Pseudococcus comstocki (Kuwana) (Hemiptera, Pseudococcidae): una nuova minaccia per la frutticoltura veneta.* - Atti Giornate Fitopatologiche 2008, 1: 121-124.
- WOODSIDE A.M., 1936 - *Comstock's mealybug as an apple pest.* - Journal of Economic Entomology, 29 (3): 544-546.
- ZHENG, Y., 2006 – *The occurrence of Pseudococcus comstocki on bagged fruit of Huangguan pear cultivar and its control.* - China Fruits, 3, 56-57.



## LE COCCINIGLIE ESOTICHE DELLE ORNAMENTALI RECENTEMENTE INTRODOTTE IN ITALIA E IN EUROPA

GAETANA MAZZEO (\*) - SANTI LONGO (\*) - GIUSEPPINA PELLIZZARI (\*\*)  
FRANCESCO PORCELLI (\*\*\*) - AGATINO RUSSO (\*)

(\*) *Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali (DiGeSA). Università di Catania. Via S. Sofia, 100. 95123, Catania, Italy; gamazzeo@unict.it*

(\*\*) *Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE). Università di Padova. Agripolis, viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

(\*\*\*) *Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (DiSSPA). Università di Bari. Via G. Amendola, 165/A 70126 Bari, Italy*

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Le cocciniglie delle piante coltivate: nuove acquisizioni e possibili strategie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 7 giugno 2013.

### *Scale insects of ornamental plants recently introduced in Italy and Europe*

Ornamental plants perform different roles beyond the purely aesthetic, providing shade, privacy and making pleasant places inhabited by men. They often come from tropical and subtropical countries carrying out several insects, and among these mainly scale insects. Scale insects have small size and morphological and biological features that allow them to hide and camouflage between all parts of the plants, eluding any control. In Italy, the introduction of alien insects was studied since the end of the Second World War, when commerce and transports increased giving to insects more opportunities of diffusion. The Authors analyze this phenomenon with particular regard to scale insects on ornamentals introduced in Italy since 1945. Until now, 49 are the recorded species that have been reported with a more and more increasing rate. In the last decade the rate of introduction was almost reduplicated due to easier and faster transports, to increased efficiency of controls and to the intensification of research. More than 50% of alien scale insects species are acclimated in the new areas, finding favorable conditions for their establishment in relation to the changed climatic conditions probably linked to global warming. The authors report, in addition, the alien species of scale insects recently introduced or intercepted on ornamental plants in Europe.

KEY WORDS: Hemiptera Coccoidea, alien species, phytosanitary importance.

### INTRODUZIONE

Le piante ornamentali, coltivate principalmente per le loro peculiarità estetiche, assolvono diversi altri ruoli legati all'idea del benessere e pertanto, sia a livello privato sia a livello pubblico, le essenze sono scelte per offrire ombra, protezione e svago, oltre che per abbellire e completare le strade e i luoghi abitati dall'uomo.

Le essenze utilizzate spesso provengono da aree geografiche lontane, principalmente tropicali e subtropicali. Nei giardini privati, si assiste spesso a una continua introduzione di vegetali e, soprattutto nel settore delle ornamentali succulente, gli appassionati sono soliti scambiarsi piante o porzioni di queste, eludendo qualsiasi controllo da parte degli organi preposti.

Gli scambi commerciali e/o amatoriali costituiscono in tal modo un veicolo preferenziale per organismi animali quali gli insetti e tra questi, ancor più per quelli che riescono in qualche modo a "passare inosservati", come le cocciniglie. Tale ampio gruppo di Sternorrhinchi, che comprende in tutto il mondo oltre 7.700 specie (BEN DOV *et al.*,

2013), è caratterizzato da individui di piccole dimensioni, con femmine attere e legate strettamente alle piante delle quali sono in grado di colpire tutti gli organi e con le quali sovente viaggiano, perfettamente mimetizzate o nascoste tra foglie, brattee, frutti, radici.

Molte di tali specie arrivano nei nostri areali riuscendo, in diversi casi, anche ad insediarsi più o meno stabilmente, in virtù delle loro caratteristiche biologiche che consentono l'acclimatazione nell'ambiente in cui arrivano. Vari fattori agiscono favorendone l'insediamento: clima, presenza di piante ospiti, assenza di specifici nemici naturali, strategie riproduttive (JUCKER & LUPI, 2011). Con molta probabilità anche il riscaldamento globale gioca un ruolo importante in tale fenomeno, modificando le condizioni climatiche e, di conseguenza, la stessa fenologia delle piante ospiti nonché creando condizioni di sopravvivenza per specie provenienti da aree tropicali e sub tropicali, che riescono più facilmente a insediarsi e svilupparsi nelle nuove condizioni ecologiche.

L'Italia, inoltre, posta al centro del Mediterraneo rappresenta un punto nodale del commercio e del

turismo consentendo la colonizzazione attiva e passiva per numerose specie esotiche; ciò è evidenziato dal fatto che numerosi insetti alieni ritrovati in Italia sono compresi tra le 100 specie più invasive in Europa e in molti casi la prima segnalazione è stata fatta proprio in Italia (JUCKER & LUPI, 2011).

IL RITMO DI INTRODUZIONE DELLE COCCINIGLIE IN ITALIA

Nel corso degli anni si è assistito a un crescente numero di insetti alieni che è arrivato nel nostro Paese; essi sono costituiti per il 57,7% da Hemiptera, di cui il 97% rappresentato da Sternorrinchi, introdotti principalmente attraverso le piante ornamentali (JUCKER & LUPI, 2011).

Facendo particolare riferimento alle cocciniglie che vivono su piante ornamentali, nel tempo si è verificato un aumento delle specie introdotte e segnalate.

TREMBLAY (1988) ha pubblicato una lista di insetti introdotti in Italia in 25 anni, dal 1960 al 1985, che comprendeva oltre 40 specie, costituite per il 75 % da Hemiptera Sternorrinchi e, tra questi, principalmente da cocciniglie (20 entità). Più precisamente, nel lavoro citato, l'Autore riferiva che il più alto numero di specie esotiche è stato ritrovato proprio su piante ornamentali: 31 specie, 11 delle quali Coccoidea.

PELLIZZARI & DALLA MONTÀ un decennio dopo (1997) riprendevano tale lavoro considerando un periodo più ampio, dal 1945 al 1995, tale da consentire loro di mettere in relazione l'aumento della frequenza e celerità dei traffici e il ritmo di introduzione di nuove specie.

Gli Autori stimavano che nel cinquantennio considerato le specie introdotte ammontavano a circa un centinaio, la metà delle quali legata alle piante ornamentali. Per quanto riguardava le cocciniglie delle ornamentali, erano state introdotte in tale periodo 32 specie che costituivano il 37% degli insetti introdotti. Il 50% di tali specie era costituito complessivamente da Pseudococcidae e Rhizoecidae, il 28% da Diaspididae (Tabella 1).

Un ulteriore aggiornamento si è avuto nel 2005, con il lavoro di PELLIZZARI *et al.* (2005) riferito a un periodo di sessanta anni, dal 1945 al 2005, in cui venivano elencate altre 6 specie di cocciniglie aliene: i coccidi *Ceroplastes stellifer* (Westwood) e *C. ceriferus* (Fabricius); gli pseudococcidi *Trochiscococcus speciosus* (De Lotto) e *Phenacoccus solani* Ferris; i diaspidini *Lopholeucaspis japonica* (Cockerell) e *Entaspidiotus lounsburyi* (Marlatt). A tale lista si è aggiunta la specie *Mercetaspis isis* (Hall), riscontrata su tamerice in Sicilia (NUCIFORA

Tabella 1 – Specie di cocciniglie introdotte in Italia nel periodo 1945-1995.

FAMIGLIA	SPECIE
PSEUDOCOCCIDAE	<i>Chaetococcus bambusae</i> (Maskell, 1892)
	<i>Delottococcus euphorbiae</i> (Ezzat & McConnell, 1956)
	<i>Dysmicoccus brevipes</i> (Cockerell, 1893)
	<i>Dysmicoccus mackenziei</i> Beardsley, 1965
	<i>Dysmicoccus neobrevipes</i> Beardsley, 1959
	<i>Hypogeococcus pungens</i> Granara de Willink, 1981
	<i>Nipaeococcus nipae</i> (Maskell, 1893)
	<i>Phenacoccus madeirensis</i> Green, 1923
	<i>Planococcus halli</i> Ezzat & McConnell, 1956
	<i>Pseudococcus microcirculus</i> McKenzie, 1960
RHIZOECIDAE	<i>Vryburgia rimariae</i> Tranfaglia, 1981
	<i>Rhizoecus americanus</i> (Hambleton, 1946)
	<i>Rhizoecus cacticans</i> (Hambleton, 1946)
	<i>Rhizoecus dianthi</i> Green, 1926
	<i>Rhizoecus latus</i> (Hambleton, 1946)
ERIOCOCCIDAE	<i>Ripersiella hibisci</i> (Kawai & Takagi, 1971)
	<i>Eriococcus coccineus</i> (Cockerell, 1894)
COCCIDAE	<i>Ovaticoccus agavium</i> (Douglas, 1888)
	<i>Ceroplastes japonicus</i> Green, 1921
	<i>Cryptinglisia lounsburyi</i> Cockerell, 1900
HALIMOCOCCIDAE	<i>Protopulvinaria pyriformis</i> (Cockerell, 1894)
	<i>Limacoccus brasiliensis</i> (Hempel, 1934)
PHOENICOCOCCIDAE	<i>Phoenicococcus marlatti</i> Cockerell, 1899
DIASPIDIDAE	<i>Aspidiotus destructor</i> (Signoret, 1869)
	<i>Aulacaspis tubercularis</i> (Newstead, 1906)
	<i>Gymnaspis aechmeae</i> Newstead, 1898
	<i>Odonaspis greeni</i> Cockerell, 1902
	<i>Pinnaaspis strachani</i> (Cooley, 1899)
	<i>Pseudaonidia paeoniae</i> (Cockerell, 1899)
	<i>Pseudaulacaspis cockerelli</i> (Cooley, 1897)
	<i>Selenaspis albus</i> McKenzie, 1953
<i>Umbaspis regularis</i> (Newstead, 1911)	

& WATSON, 2001), portando a 39 entità il numero di specie introdotte fino al 2005.

Negli ultimi anni, altre segnalazioni hanno accresciuto il numero di cocciniglie aliene. In particolare sono state introdotte le specie riportate nella tabella 2.

Il ritmo di introduzione ha subito delle variazioni negli anni: nel cinquantennio 1945 – 1995 sono state introdotte 32 specie di cocciniglie, circa 0,64 specie/anno, nel decennio successivo ne sono state introdotte 7 (0,7/anno) e negli ultimi 8 anni il numero di specie segnalate è stato di 10 entità, portando a 1,25 il numero di specie/anno.

Ciò può essere messo in relazione da un lato con le aumentate possibilità di movimento e scambio, dall'altro all'approfondirsi degli studi che consente di scoprire specie presenti già da tempo nel territorio.

Le specie introdotte hanno manifestato diverse modalità di diffusione e un diverso esito, risultando per circa il 50% acclimatate con distribuzione limitata o ampia. Alcune di esse vengono sinteticamente trattate.

LE SPECIE PIÙ SIGNIFICATIVE INTRODOTTE IN ITALIA

Fam. PSEUDOCOCCIDAE

***Hypogeococcus pungens*** Granara de Willink

Originario del Sud America, è stato segnalato in Italia nel 1986 come *Hypogeococcus foersterianus* Lyzer y Trelles (SÜSS & TREMATERRA, 1986) e successivamente trovato anche in Francia, Grecia e

Spagna (BEN-DOV *et al.*, 2013). In ambiente protetto lo pseudococcino ha comportamento omodinamo; infesta cactacee ornamentali del genere *Cereus* provocando abnorme proliferazione dei tessuti e arresto della fioritura e della fruttificazione; vive sulla parte aerea e sulle radici delle piante ospiti. La specie, diffusa nei primi anni dalla sua introduzione, sembra oggi relegata ad un ruolo marginale. È stata utilizzata con successo in Australia come agente di controllo biologico delle cactacee (MAZZEO *et al.*, 2008).

***Ferrisia virgata*** (Cockerell)

Intercettata nel 2005 su piante di *Codiaeum variegatum*, importate dalla Costa Rica in un vivaio in provincia di Livorno (Toscana), non è più stata riscontrata.

***Phenacoccus defectus*** Ferris

Specie nordamericana, è stata intercettata diverse volte a partire dal 2009 in Veneto su crassulacee in vaso. Segnalata per la prima volta in Europa in Gran Bretagna nel 1997, è stata in seguito ritrovata in Francia, in entrambi i casi su materiale proveniente dall'Italia (PELLIZZARI & PORCELLI, 2013). Si sviluppa su piante appartenenti a numerose famiglie, tra le quali Acanthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Crassulaceae dei generi *Echeveria*, *Sempervivum*, *Sedum*, *Crassula*. A Padova, *P. defectus* è stato raccolto su varie crassulacee e *Senecio citriformis* (Asteraceae).

La specie è molto simile a *Phenacoccus solani* Ferris, che dopo la prima segnalazione per il bacino del Mediterraneo in Sicilia su *Encephalartos*, nel 1999 (MAZZEO *et al.*, 1999), viene riportata per Israele (BEN-DOV, 2005), Turchia (KAYDAN *et al.*, 2008) e Spagna (BELTRÀ & SOTO, 2011); questa specie è polifaga e infesta numerose piante ornamentali.

***Phenacoccus madeirensis*** Green.

Specie cosmopolita, diffusa in Africa, America del Nord, Centro e Sud, Caraibi, Oceania, Europa, Giappone, è stata segnalata in Europa nel 1923 nelle Isole Madeira (PELLIZZARI & GERMAIN, 2010b); è presente in Italia dal 1987 (MAROTTA, 1987), in Francia dal 2004 (MATILE-FERRERO & GERMAIN, 2004), in Grecia dal 2010 (PAPADOPOULOU & CHRYSOHOIDES, 2012). In Italia è stata segnalata in Campania, Basilicata, Calabria e successivamente in Sicilia (LONGO *et al.*, 1995) e nel 2009 a Sanremo su ibisco (PELLIZZARI & SACCO, 2010).

Specie polifaga, attacca piante afferenti a 47 famiglie. Infesta numerose essenze arboree ed erbacee di interesse agrario e ornamentale, tra le quali *Lantana*, *Pelargonium* e diverse cactacee.

Le sue infestazioni con cospicue popolazioni,

Tabella 2 – Specie di cocciniglie introdotte in Italia dal 2005 a oggi.

FAMIGLIA	SPECIE
PSEUDOCOCCIDAE	<i>Balanococcus kwoni</i> Pellizzari & Danzig, 2007
	<i>Ferrisia virgata</i> (Cockerell, 1893)
	<i>Phenacoccus defectus</i> Ferris, 1950
	<i>Phenacoccus peruvianus</i> Granara de Willink, 2007
	<i>Pseudococcus comstocki</i> (Kuwana, 1902)
	<i>Vryburgia brevicurvis</i> (McKenzie)
ERIOCOCCIDAE	<i>Acanthococcus mariannae</i> Pellizzari & Germain, 2010
	<i>Ovaticoccus agavearum</i> Pellizzari & Kozar 2011
	<i>Ovaticoccus exoticus</i> Pellizzari & Kozar 2011
DIASPIDIDAE	<i>Fiorinia pinicola</i> Maskell, 1897

hanno causato inizialmente danni elevati alle piante ornamentali che venivano completamente defogliate e talora disseccavano; l'azione dei numerosi nemici naturali, tra i quali il coccinellide *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant) e diversi imenotteri parassitoidi controllano attualmente le sue pullulazioni.

***Phenacoccus peruvianus*** Granara de Willink

La cocciniglia della Bougainvillea, *Ph. peruvianus*, è stata segnalata in Europa per la prima volta nel 1999 in Spagna (Almeria) e successivamente, nel 2002 in Italia (Sicilia). Inizialmente confusa con altre congeneri, quali *P. madeirensis*, la specie è stata correttamente identificata dopo la pubblicazione della revisione di GRANARA DE WILLINK & SZUMIK (2007) e le diverse segnalazioni in Sicilia e in Europa sono state ricondotte a tale specie. In seguito, è stata segnalata in altre località della Spagna, oltre quella del primo rinvenimento, Isole Baleari, Gran Bretagna, Francia (Corsica inclusa), Monaco, Portogallo. Le piante ospiti sono costituite nella maggior parte dei casi da Nyctaginaceae (genere *Bougainvillea*), ma la specie è riportata anche su Acanthaceae, Amaranthaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Aucubaceae, Myoporaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae e può essere considerata una specie polifaga (BELTRÀ *et al.*, 2010).

La rapida espansione indica che potrebbe essersi diffusa con il commercio di piante ornamentali. La specie è acclimatata e le infestazioni si ripropongono in primavera, sebbene l'azione dei nemici naturali abbia ridimensionato la sua presenza. In Spagna, numerosi parassitoidi e predatori svolgono una buona azione di contenimento (BELTRÀ *et al.*, 2013).

***Vryburgia brevicurvis*** (McKenzie)

Considerata da Williams di origine australiana, è presente in diversi Paesi europei e in Israele; in Italia è stata ritrovata su *Stapelia*, a Padova, nel 2008 (PELLIZZARI, 2010a).

Fam. RHIZOECIDAE

Le specie di tale famiglia sono di piccole o piccolissime dimensioni; fitomizi ipogei, vivono a spese delle radici delle piante ospiti, eludendo spesso, in tal modo, i controlli fitosanitari in fase di importazione delle piante.

***Rhizoecus americanus*** (Hambleton)

Descritto per l'America meridionale, è diffuso in diversi stati dell'America settentrionale e centrale (Messico, USA, Thailandia, Costa Rica, Cuba,

Ecuador, Honduras, Jamaica, Martinique, Panama, Porto Rico, Trinidad e Tobago, Isole Vergini Americane). Intercettato in Italia nel 1992 (RUSSO & MAZZEO, 1992) su radici di piante allevate in serra di *Saintpaulia* sp., di cui rappresenta uno dei principali fitofagi, non è stato ulteriormente rinvenuto.

***Rhizoecus cacticans*** (Hambleton)

Specie subcosmopolita pantropicale, è stata segnalata in Italia nel 1981 (TRANFAGLIA, 1981) su radici di piante allevate in serra. MAROTTA (1987) ha riportato le seguenti piante ospiti: *Aloe* sp., *Echeveria* sp., *Echinocactus* sp., *Mammillaria* sp., *Notocactus* sp., *Zygocactus* sp., *Aloinopsis schooneesii*, *Mammillaria multiceps*, *Trichocereus* sp. (in serra). La specie è presente in America centrale e meridionale, Australia e Bacino del Mediterraneo; vive su numerose piante ornamentali producendo danni notevoli; in Sicilia è stata riscontrata su radici di *Senecio* sp. in pien'aria (MAZZEO *et al.*, 2008). Recentemente è stata riportata per altri Paesi europei: Francia, Grecia, Ungheria, Norvegia, Olanda (KOZÁR & KONCZNÉ BENEDICTY, 2007), Russia (DANZIG & GAVRILOV, 2009).

***Rhizoecus dianthi*** Green

Segnalato in Italia da Marotta nel 1995 su violetta africana (*Saintpaulia* sp.), è polifago di piante ornamentali e rappresenta uno dei fitofagi primari della *Saintpaulia*, nei confronti della quale le infestazioni possono causare avvizzimento e caduta delle foglie. Dannoso nei vivai e nelle serre, si diffonde con il terriccio o attraverso i fori di drenaggio dei vasi. La specie, diffusa in Australia, Nuova Zelanda, Canada, Stati Uniti d'America, è presente in Europa in Repubblica Ceca, Danimarca, Italia, Gran Bretagna, Polonia e, più recentemente, in Francia (GERMAIN *et al.*, 2002), Olanda (KOZÁR & KONCZNÉ BENEDICTY, 2007), Russia (DANZIG *et al.*, 2008).

***Ripersiella hibisci*** (Kawai & Takagi)

Specie descritta in Giappone nel 1971, si è diffusa in Nord America e Europa. In Italia è stata intercettata su bonsai importati dal Giappone nel 1994 (PELLIZZARI & PAVAN, 1994). Sugli oltre 20 ospiti noti, produce i danni più seri alle piante ornamentali in serra. La sua presenza è significativa di condizioni di allevamento non adeguate, poiché si sviluppa bene su quelle piante, come le palme, a lento accrescimento che rimangono parecchio tempo indisturbate. Nel 2001 è stata inserita nella lista di Allerta A2 dell'European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, 2005).

***Rhizoecus latus*** (Hambleton)

Intercettata per la prima volta in Italia nel napoletano in due serre su radici di *Ficus benjamina* che non mostravano danni apprezzabili, la specie è attualmente presente in Colombia, Ecuador, Isole Galapagos e Italia (MAROTTA, 1995; BEN-DOV *et al.*, 2013).

Fam. *ERIOCOCCIDAE*

Recenti introduzioni riguardano le specie:

***Acanthococcus mariannae*** Pellizzari & Germain

Rinvenuta nel 2004 in Italia (Liguria) e due anni dopo in Francia (Corsica) su *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) (PELLIZZARI & GERMAIN, 2010a), questa specie è stata probabilmente introdotta accidentalmente dall'Australia o dalla Nuova Zelanda in Europa su *Leptospermum*.

***Ovaticoccus exoticus*** Pellizzari & Kozár

Segnalato e descritto nel 2011 in Sicilia (isola di Mozia), su *Agave americana*, sarebbe in realtà presente da diverso tempo e può ritenersi acclimatato (PELLIZZARI & KOZÁR, 2011).

***O. agavacearum*** Pellizzari & Kozár

Riscontrato su *Yucca* in serra a Valenzano (Bari) nel 2008 (PELLIZZARI & KOZÁR, 2011).

Fam. *COCCIDAE*

***Ceroplastes* spp.**

***C. ceriferus*** (Fabricius)

Di origine asiatica, è specie cosmopolita. Segnalato in Italia, per la prima volta in Europa nel 2001 (MORI *et al.*, 2001) è polifago e ritenuto da TREMBLAY (1988) specie di temuta introduzione, nonché inserito nello stesso anno da TRANFAGLIA & VIGGIANI (1988) in un elenco di specie di temuta introduzione in Italia e nella Comunità europea. È presente nella lista delle specie dannose per le piante ornamentali. La sua diffusione è probabilmente da mettere in relazione all'elevata fecondità e polifagia nonché alla capacità di acclimatazione. È una specie in lenta espansione al Nord Italia, dove convive con la congenere *C. japonicus* Green, che risulta altrettanto se non più aggressiva e temibile per i danni arrecati alle piante colpite e costituisce, anche in altri Paesi dell'Europa, un serio problema per le piante ornamentali in pien'aria (PELLIZZARI & CAMPORESE, 1994).

***C. stellifer*** (Westwood)

Intercettato in Italia e in Gran Bretagna non risulta acclimatato e in Europa la sua presenza è limitata alle intercettazioni.

***Protopulvinaria pyriformis*** (Cockerell)

Coccide facilmente riconoscibile dalla particolare morfologia della femmina adulta, è di origine neotropicale e ampiamente diffuso in numerosi Paesi dell'America centrale e settentrionale, in Africa e in Asia. Nel bacino del Mediterraneo è presente in Portogallo, Spagna, Francia, Israele, Italia e Grecia. Nel nostro Paese la specie è stata segnalata nel 1993 a Roma, successivamente in Sicilia nel 1995 (LONGO, MAROTTA *et al.*, 1995). Nel 2003 è stata segnalata in Liguria (PELLIZZARI, 2003), dove è tuttora ampiamente presente all'aperto su alloro e altre ornamentali; nel 2012 è stata trovata in Sardegna.

*P. pyriformis* si è diffusa negli ultimi anni su numerose essenze ornamentali e di interesse agrario (segnalata anche su limone in agrumeti della Sicilia orientale nel 2010) (SUMA & COCUZZA, 2010).

Sulle piante ospiti produce danni cospicui legati alla sottrazione di linfa e all'emissione di abbondante melata che ostacola i processi fisiologici della pianta causandone filloptosi, accartocciamento fogliare e deperimento generale.

***Parasaissetia nigra*** (Nietner)

La specie vive in serra in Europa centrale e settentrionale, sviluppandosi in pien'aria nel sud. Il coccide, presente da parecchi anni in Italia su piante ornamentali, è stato segnalato in Toscana su *Bambusa* sp., *Ficus* spp., *Hakea* sp., *Hibiscus* sp. e *Psidium* sp. (MAROTTA, 1987) ed è acclimatato in Costa Azzurra da oltre vent'anni (GERMAIN & BERTAUX, 2003). È presente all'aperto in Liguria (PELLIZZARI, 2010a). Normalmente il livello di infestazione non è preoccupante, ma essendo una specie potenzialmente dannosa, dovrebbe essere oggetto di appositi programmi di monitoraggio. In Europa è classificata come: II/A1 (EPPO, 2002).

Fam. *DIASPIDIDAE*

***Fiorinia pinicola*** Maskell

Rinvenuta su *Pittosporum* in Liguria nel 2005 (PELLIZZARI, 2005) la specie è tuttora presente (2012) dimostrando di essere ormai acclimatata, essendo numerose e diffuse le piante infestate dalla cocciniglia. *F. pinicola* è diffusa in Cina, Taiwan, Giappone, USA; in Europa è presente anche in Portogallo (FRANCO *et al.*, 2011).

LE SPECIE PIÙ SIGNIFICATIVE INTRODOTTE  
IN EUROPA

In Europa, le cocciniglie aliene rappresentano oltre il 30% della coccidiofauna europea (PELLIZZARI & GERMAIN, 2010b). Esse sono comprese principal-

mente nelle famiglie Diaspididae, Pseudococcidae, Coccidae, nonché nella famiglia Dactylopidae cui afferisce la specie aliena *Dactylopius coccus* Costa. Introdotta nel 1800 per la produzione del colorante rosso carminio in Sardegna e Sicilia, non è riuscita ad acclimatarsi; in Europa è presente solo nelle isole Canarie (RUSSO *et al.*, 2001).

Su ornamentali sono segnalate oltre 40 specie, alle quali negli ultimi anni se ne sono aggiunte numerose altre.

I diaspididi rappresentano il gruppo più consistente. Nelle serre europee sono presenti specie che nelle aree più meridionali sono riscontrate in pien'aria, dove talora risultano acclimatate, come nel caso di *Chrysomphalus aonidum* (Linnaeus). Tale specie, in Sicilia, presente da lungo tempo e riscontrata nel 1994 su *Cycas* in vivaio (LONGO *et al.*, 1994), si è acclimatata, spostandosi su altri ospiti quali gli agrumi, per i quali rappresenta attualmente un serio pericolo in Italia meridionale. In Liguria *C. aonidum* è presente su numerose essenze ornamentali.

Altre specie segnalate in Europa negli ultimi anni rappresentano un potenziale pericolo per la possibile introduzione anche in Italia; tra queste le seguenti assumono particolare rilievo.

*Aulacaspis yasumatsui* Takagi, di origine asiatica, è diffusa negli Stati Uniti e nelle isole Canarie. In Europa è stata segnalata in Francia, nel 2002 su *Cycas* proveniente dal Vietnam (GERMAIN, 2002) e successivamente in Croazia nel 2008. Gli ospiti preferenziali sono le cycas dei generi: *Cycas* (preferibilmente), *Dioon*, *Encephalartos*, *Microcycas* e *Stangeria*. Attacca tutte le parti della pianta, comprese le radici, ove può nascondersi passando inosservata ai controlli e diffondersi in tal modo in altre aree geografiche. Le piante colpite mostrano aree decolorate con presenza di cera e possono arrivare alla morte.

*Chionaspis wistariae* Cooley è specie asiatica; è stata ripetutamente intercettata in Europa tra il 1981 e il 1990 in Gran Bretagna su piante bonsai di *Wisteria* spp. importate dal Giappone ed eradicata (Malumphy, 2010, *in litteris*). Probabilmente la specie è stata ripetutamente introdotta in Europa e attualmente risulta presente in Romania (Cluj Napoca) in pien'aria su vecchie piante di *Wisteria* (PELLIZZARI, 2010b).

*Comstockiella sabalis* (Comstock), riscontrata su palme del genere *Sabal*, nel 2005 in Francia (GERMAIN & MATILE FERRERO, 2006).

*Fiorinia phoenicis* Balachowsky, trovata su *Phoenix dactylifera* in Spagna, è la prima segnalazione europea di questa specie, nota finora solo per Iran e Saudi Arabia (SELJAK & MATILE-FERRERO, 2012).

Per quanto riguarda gli Pseudococcidi, tra le specie recentemente introdotte, oltre al già citato *Ph. peruvianus* in espansione verso altri Paesi, sono annoverate:

*Antonina pretiosa* Ferris ritrovata in Portogallo per la prima volta in Europa (PELLIZZARI *et al.*, 2013) su bambù; presente in Asia, USA e Cuba.

*Balanococcus kwoni* Pellizzari & Danzig, originario della Corea, è stato segnalato in Italia ove è presente in Veneto e Liguria su *Pseudosasa* (PELLIZZARI & DANZIG, 2007); nel 2012 è stato ritrovato in Gran Bretagna, dove sembra acclimatato da tempo, su *Bambusa*, *Fargesia*, *Pharus*, *Phyllostachys*, *Pleioblastus*, *Pseudosasa* e *Sinarundinaria thamnocalamus* (MALUMPHY & BADMIN, 2012). La specie sembrerebbe in espansione verso Francia e Germania.

*Ferrisia malvastra* (McDaniel) segnalata su *Mirabilis jalapa* in Spagna nel 2011 (BELTRÀ & SOTO, 2011).

*Palmicultor lumpurensis* (Takahashi), individuato in Francia su materiale di *Bambusa*, proveniente da un vivaio portoghese (Germain, *in litteris*) e in Portogallo su *Phyllostachys* vegetante all'aperto (PELLIZZARI *et al.*, 2013).

Tra i Rhizocidae, le specie *Rhizoecus maasbachi* Jansen, ritrovata ripetutamente su bonsai importati in Olanda, nel 2003 (JANSEN, 2003) e *Ripersiella multiporifera* Jansen, riscontrata su radici di *Sansieveria* provenienti dall'Indonesia e di *Hoya kerrii* provenienti dalla Thailandia, rappresentano un potenziale pericolo di introduzione date le caratteristiche morfologiche e biologiche di tali insetti radicolari (JANSEN, 2008).

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Dalla breve (e sicuramente non esaustiva) sintesi si evidenzia un incalzante ritmo di introduzione di specie di cocciniglie aliene. Ciò è da mettere senz'altro in relazione da un lato alle sempre più facili e veloci modalità di trasporto e di invio di materiale in uno scenario di globalizzazione del commercio e degli scambi e libera circolazione di merci e persone, dall'altro a una maggiore sensibilità e conoscenza, quindi maggiore efficacia, anche da parte dei servizi fitosanitari che ricevono le merci.

Il trend sembrerebbe lasciar ipotizzare una crescita ulteriore e rapida del numero di specie aliene. Soprattutto ciò sembra facilmente immaginabile per quelle specie tropicali o subtropicali che, arrivate nel bacino del Mediterraneo, trovano condizioni climatiche che permettono loro di sopravvivere e di insediarsi stabilmente. Il *global warming*, gioca in tal senso un ruolo importante, influen-

zando direttamente la fisiologia degli insetti e indirettamente quella delle piante di cui si nutrono (STANGE & AYRES, 2010).

#### RIASSUNTO

Le piante ornamentali, utilizzate per le loro caratteristiche morfologiche, assolvono diversi ruoli oltre quello squisitamente estetico, fornendo ombra, riparo e contribuendo a rendere più abitabili i luoghi frequentati dall'uomo. Esse provengono spesso da paesi tropicali e subtropicali e diventano veicoli preferenziali per diverse specie di insetti, quali le cocciniglie, di piccole dimensioni e con caratteristiche morfologiche e biologiche che consentono loro di mimetizzarsi e passare inosservate ai controlli. In Italia l'introduzione di insetti alieni è stata studiata a partire dalla fine della seconda guerra mondiale, allorché gli scambi commerciali e i trasporti si sono intensificati consentendo una sempre più veloce introduzione di insetti. Gli autori analizzano la situazione riguardante, in particolare, l'introduzione di cocciniglie dannose alle piante ornamentali in Italia a partire dal 1945. Le specie aliene segnalate sono state 49, con un ritmo di introduzione che nell'ultimo decennio si è pressoché raddoppiato, a ragione delle sempre più facili e veloci modalità di trasporto, dell'aumentata efficienza dei controlli e dell'intensificarsi della ricerca. Oltre il 50% di tali specie, inoltre, si è acclimatato nelle nuove aree di diffusione, trovando, probabilmente in relazione alle mutate condizioni climatiche legate al *global warming*, condizioni favorevoli al loro insediamento. Gli autori riportano, inoltre, le specie di cocciniglie aliene introdotte o intercettate di recente su piante ornamentali in Europa.

#### BIBLIOGRAFIA

- BELTRÀ A., SOTO A., 2011 – *New records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Spain.* – *Phytoparasitica*, 39(4): 385-387.
- BELTRÀ A., SOTO A., GERMAIN J.F., MATILE-FERRERO D., MAZZEO G., PELLIZZARI G., RUSSO A., FRANCO J., WILLIAMS D.J., 2010 – *The Bougainvillea mealybug Phenacoccus peruvianus Granara de Willink, 2007, a rapid invader from South America to Europe.* – *Entomologia Hellenica*, 19: 137-143.
- BELTRÀ A., TENA A., SOTO A., 2013 – *Fortuitous biological control of the invasive mealybug Phenacoccus peruvianus in Southern Europe.* – *BioControl*, 01/2013; 58(3): 309-317.
- BEN-DOV Y., 2005 – *The Solanum mealybug, Phenacoccus solani Ferris (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae), extends its distribution range in the Mediterranean Basin.* – *Phytoparasitica*, 33(1): 15-16.
- BEN-DOV Y., MILLER D. R., GIBSON G. A. P., 2013 – *ScaleNet: a database of the scale insects of the world.* – Available from: <http://wlvrv.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm> (accessed Novembre 2013).
- DANZIG E.M., GAVRILOV I.A., 2009 – *Mealybugs of the genus Rhizoecus Künckel d'Herculis, 1878 (Homoptera: Pseudococcidae) of the fauna of Russia and adjacent countries.* – *Zoosystematica Rossica*, 18(2): 224-245.
- DANZIG E.M., GAVRILOV I.A., TRAPEZNIKOVA I.V., 2008 – *A New Pest from a greenhouse of St. Petersburg, Rhizoecus dianthi Green (Homoptera, Pseudococcidae), with karyotype data.* – *Entomologicheskoe Obozrenie*, 87(3): 600-603.
- EPPO, 2002 – *EPPO Standards - Diagnostic protocols for regulated pests - PM 7/12(1) Parasaissetia nigra.* – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 32(2): 293-298.
- EPPO, 2005 – *Data sheets on quarantine pests. Rhizoecus hibisci.* – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35, 365-367.
- FRANCO J.C., RUSSO A., MAROTTA S., 2011 – *An annotated checklist of scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of Portugal, including Madeira and Azores Archipelagos.* – *Zootaxa*, 3004: 1-32.
- GERMAIN J.F., 2002 – *Aulacaspis yasumatsui Takagi: un risque pour les Cycas.* – *PHM Revue Horticole*, 440: 43-44.
- GERMAIN J.F., BERTAUX F., 2003 – *Parasaissetia nigra, hôte méconnu sur la Côte d'Azur.* – *PHM Revue Horticole*, 447: 42-44.
- GERMAIN J.F., MATILE-FERRERO D., 2006 – *Comstockiella sabalis (Comstock), Crisicoccus pini (Kuwana) et Phenacoccus defectus Ferris, cochenilles nouvelles pour la France (Hem., Diaspididae et Pseudococcidae).* – *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 111(3): 395-401.
- GERMAIN J.F., MATILE-FERRERO D., PICART J.L., DELVARE G., PIRON M., 2002 – *Inventory of scale insects in tropical green houses in France and knowledge of their parasitic Hymenoptera, previous to development of biological control.* 253-260. – In: *Sixième Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture*. Tome 1. AGRO, Montpellier. 350 pp.
- GRANARA DE WILLINK M.C., SZUMIK C., 2007 – *Phenacocccinae de Centro y Sudamérica (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae: Sistemática y Filogenia).* – *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66: 29-129.
- JANSEN, M.G.M. 2003 – *A new species of Rhizoecus Kunkel d'Herculis (Hemiptera, Coccoidea, Pseudococcidae) on bonsai trees.* – *Tijdschrift voor Entomologie*. Amsterdam, 146: 297-300.
- JANSEN, M.G.M. 2008 – *A new species of the genus Ripersiella Tinsley (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) from import interceptions in The Netherlands.* – *Proceedings of the XI International Symposium of Scale Insects Studies*, Oeiras, Portugal, 24-27 September, 2007: 39-49.
- JUCKER C., LUPI D., 2011 – *Exotic Insects in Italy: An Overview on Their Environmental Impact.* – *The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity*, Jordi Lopez Pujol (Ed.), ISBN: 978-953-307-751-2.
- KAYDAN M.B., ERKILIC L., KOZÁR F., 2008 – *First record of Phenacoccus solani Ferris from Turkey (Hem., Coccoidea, Pseudococcidae).* – *Bulletin de la Societe Entomologique de France*, 113(3): 364.
- KOZÁR F., KONCZNE BENEDEICTY Z., 2007 – *In: Rhizoecinae of the world.* – *Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, Budapest*. 617 pp.
- LONGO S., MAROTTA S., PELLIZZARI G., RUSSO A., TRANFAGLIA A., 1995 – *An annotated list of the scale insects (Homoptera: Coccoidea) of Italy.* – *Israel Journal of Entomology*, 29: 113-130.
- LONGO S., MAZZEO G., RUSSO A., 1994 – *Le cocciniglie delle piante ornamentali.* – *Informatore fitopatologico*, 44(5): 15-28.
- LONGO S., MAZZEO G., RUSSO A., 1995 – *Biological observations on some scale insects (Homoptera: Coccoidea) in Sicily.* – *Israel Journal of Entomology*, 29: 219-222.

- MALUMPHY C., BADMIN J.S., 2012 – *Scale Insects and Whiteflies (Hemiptera: Coccoidea and Aleyrodoidea) of Watsonian Kent; with a Discussion on the Impact of Naturalised Non-native species*. - British Journal of Entomology and Natural History, 25: 15-49.
- MAROTTA S., 1987 – *An annotated list of Italian mealybugs (Pseudococcidae)*. - Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri, 1986 (Suppl.), 43: 107-116.
- MAROTTA S., 1995 – *Due Rhizoecus Kunckel d'Herculaeus, 1878 (Homoptera Coccoidea Pseudococcidae) nuovi per la fauna italiana*. - Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Milano) Ser. II, 27: 117-121.
- MATILE-FERRERO D., GERMAIN J.F., 2004 – *Eriococcus munroi (Boratynski), nouveau ravageur du Lavandin en France, et note sur deux Pseudococcines nouvelles pour la France (Hemiptera, Eriococcidae et Pseudococcidae)*. - Bulletin de la Société entomologique de France, 109(2): 191-192.
- MAZZEO G., RUSSO A., SUMA P., 1999 – *Phenacoccus solani Ferris (Homoptera Coccoidea) on ornamental plants in Italy*. - Bollettino Zoologia agraria Bachicoltura, Milano, Ser. II, 31(1): 31-35.
- MAZZEO G., SUMA P., RUSSO A., 2008 – *Scale insects of succulent plants in Southern Italy*. - Proceedings of XI International Symposium on Scale insects Studies, Oeiras, Portugal, 24–27 September 2007: 149-152.
- MORI N., PELLIZZARI G., TOSI L., 2001 – *Già acclimatato in Italia il coccide Ceroplastes ceriferus (Fabricius) (Hemiptera, Coccoidea)*. - Informatore Fitopatologico, 10: 41-43.
- NUCIFORA, S., WATSON, G.W., 2001 – *Armoured scale insects (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) new to Sicily: records and observations*. - Entomologica, 33(1999): 207-211.
- PAPADOPOULOU S., CHRYSOHOIDES C., 2012 – *Phenacoccus madeirensis Green, 1923 (Homoptera: Pseudococcidae) on Ocimum basilicum: a new geographical record for Greece*. - EPPO Bulletin, 42(1): 146-147.
- PELLIZZARI G., 2003 – *Hemiptera Coccoidea nuovi o poco noti per l'Italia*. - Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Milano), 35(2): 99-106.
- PELLIZZARI G., 2005 – *Cocciniglie nuove o poco note potenzialmente dannose per l'Italia: Fiorinia pinicola Maskell, Pseudococcus comstocki (Kuwana), Peliococcus turanicus (Kiritschenko)*. - Informatore Fitopatologico, 6: 20-26.
- PELLIZZARI G., 2010a – *New Data on the Italian Scale Insect Fauna (Hemiptera, Coccoidea)*. - Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 45(1): 89-92.
- PELLIZZARI G., 2010b – *First record and establishment of Chionaspis wistariae Cooley (Hemiptera, Diaspididae) in Europe*. - Journal of Entomological and Acarological Research, Ser. II, 42(3): 147-151.
- PELLIZZARI G., CAMPORESE P., 1994 – *The Ceroplastes species (Homoptera Coccoidea) of the Mediterranean basin with emphasis of C. japonicus Green*. - Annales de la Société Entomologique de France (N.S.), 30: 175-192.
- PELLIZZARI G., DALLA MONTÀ L., 1997 – *Gli insetti fitofagi introdotti in Italia dal 1945 al 1995*. - Informatore fitopatologico, 47 (10): 4-12.
- PELLIZZARI G., DANZIG E., 2007 – *The bamboo mealybugs Balanococcus kwoni n.sp. and Palmicultor lumpurensis (Takabashi) (Hemiptera, Pseudococcidae)*. - Zootaxa, 1583: 65-68.
- PELLIZZARI G., GERMAIN J.F., 2010a – *A new species of Acanthococcus (Hemiptera, Coccoidea, Eriococcidae) on Leptospermum scoparium (Myrtaceae) from Italy and France*. - Zootaxa, 2543: 51-63.
- PELLIZZARI G., GERMAIN J.F., 2010b – *Scales (Hemiptera, Superfamily Coccoidea)*. Chapter 9.3. - BioRisk, 4(1): 475-510.
- PELLIZZARI G., KOZÁR F., 2011 – *A new species of Greenisca and two new species of Ovaticoccus from Italy (Hemiptera Coccoidea Eriococcidae), with a key to European genera of Eriococcidae*. - Zootaxa, 3090: 57-68.
- PELLIZZARI G., PAVAN F., 1994 – *Segnalazione di Rhizoecus saintpauliae Williams (Homoptera, Pseudococcidae) su bonsai importati dal Giappone*. - Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Milano), 26(2): 275-278.
- PELLIZZARI G., PORCELLI F., 2013 – *First record of Phenacoccus defectus in Italy, with comments on P. solani and P. solenopsis*. - Bulletin of insectology, 66(2): 209-211.
- PELLIZZARI G., SACCO M., 2010 – *Le cocciniglie delle piante ornamentali in Liguria*. - Protezione delle colture, 4: 27-36.
- PELLIZZARI G., DALLA MONTÀ L., VACANTE V., 2005 – *Alien insect and mite pests introduced to Italy in sixty years (1945-2004)*. - Plant Protection and Plant Health in Europe: Introduction and Spread of Invasive Species. BCPC Symposium Proceedings, No. 81: 275-276.
- PELLIZZARI G., PORCELLI F., ÜLGENTURK S., 2013 – *The scale insects (Hemiptera, Coccoidea) of bamboos in the W-Paleartic Region: new records and distributional data*. - Proceedings of XIII ISSIS, Sofia, Bulgaria 2-5 September 2013. Acta Zoologica Bulgarica, 66 (accepted).
- RUSSO A., MAZZEO G., 1992 – *Rhizoecus americanus (Hambleton) e Pseudaulacaspis cockerelli (Cooley) (Homoptera Coccoidea) dannosi alle piante ornamentali in Italia*. - Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura, Ser. II, 24(2): 215-221.
- RUSSO A., MAZZEO G., SUMA P., LONGO S., 2001 – *Bionomics of Dactylopius coccus Costa (Hemiptera Coccoidea) in a greenhouse in Sicily*. - Entomologica, 33(1999): 333-338.
- SELJAK G., MATILE-FERRERO D., 2012 – *First record of Fiorinia phoenicis Balachowsky, 1967, in Europe (Hemiptera, Diaspididae)*. - Bulletin de la Société entomologique de France, 117(4): 453-455.
- STANGE E.E., AYRES M.P., 2010 – *Climate Change Impacts: Insects*. - In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net>
- SUMA P., COCUZZA G. E., 2010 – *Grave infestazione su limone da Protopulvinaria pyriformis*. - L'Informatore agrario, (18): 72-74.
- SÜSS L., TREMATERRA P., 1986 – *Hypogeococcus foersterianus (Lizer y Trelles) (Homoptera; Coccoidea) nocivo alle cactacee ornamentali in Liguria*. - Informatore fitopatologico, 38(10): 43-46.
- TRANFAGLIA A., 1981 – *Studi sugli Homoptera Coccoidea. V. Notizie morfo-sistematiche su alcune specie di Cocciniglie con descrizione di tre nuove specie di Pseudococcidi*. - Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri', Portici, 38: 3-28.
- TRANFAGLIA A., VIGGIANI G., 1988 – *Cocciniglie di importanza economica in Italia e loro controllo*. - Regione Campania. Assessorato Agricoltura. Abete Grafica, Benevento, 30 pp.
- TREMBLAY E., 1988 – *Avversità delle colture di recente o temuta introduzione. Parassiti animali: Insetti*. - L'Italia Agricola, 1: 115-128.





## POLYNEOPTERA OR “LOWER NEOPTERA” - NEW LIGHT ON OLD AND DIFFICULT PHYLOGENETIC PROBLEMS

ROLF G. BEUTEL (\*) - BENJAMIN WIPFLER (\*) - MARCO GOTTARDO (\*\*) - ROMANO DALLAI (\*\*)

(\*) *Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie, Friedrich Schiller Universität Jena, Erbertstrasse 1, 07743 Jena, Germany; rolf.beutel@uni-jena.de*

(\*\*) *Dipartimento di Scienze della Vita – Università degli Studi di Siena.*

Lettura tenuta durante la Giornata culturale su “Contributo alla conoscenza dei Polineotteri basali. Struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base e applicativi”. Seduta pubblica dell’Accademia - Firenze, 11 ottobre 2013.

### *Polyneoptera or “lower Neoptera” - new light on old and difficult phylogenetic problems*

Polyneoptera or “lower Neoptera” are a lineage of moderate diversity, with ca. 36,000 described species and presently ten orders. The monophyly was discussed controversially and is not well supported by morphological data. The reconstruction of interordinal relationships is one of the remaining big challenges in insect systematics. In this contribution the orders are briefly introduced and recent developments in the phylogenetic reconstruction are outlined, based on morphological characters but also on recent analyses of different molecular data sets including transcriptomes.

KEY WORDS: Polyneoptera, orders, phylogeny, morphology, molecular systematics

### INTRODUCTION

Polyneoptera is a group with uncertain monophyly and strongly disputed interordinal phylogenetic relationships. Consequently it is often referred to with the neutral term “lower Neoptera” which does not imply a monophyletic origin and underlines that the subgroups are mainly characterized by plesiomorphic features. Together with Acercaria (Psocodea, Thysanoptera, Hemiptera; = Paraneoptera excl. Zoraptera) and Holometabola the “lower Neoptera” form a very large monophyletic unit Neoptera, which is mainly characterized by the ability to fold back the wings over the abdomen, one of the major innovations in the evolutionary history of insects. Compared to the hemipterans and their relatives and especially the extremely successful holometabolous orders (ca. 800,000 spp.) the “lower Neoptera” have retained plesiomorphic conditions in their development (hemimetabolism) and also in the morphology of different body regions (e.g., largely unmodified orthopteroid mouthparts).

The monophyly of Polyneoptera was considered as unconfirmed by HENNIG (1969) in his groundbreaking “Die Stammesgeschichte der Insekten”. He emphasized the isolated position of Plecoptera (HENNIG, 1969: fig. 40) and the lacking support for a sistergroup relationship between this group and all remaining orders combined in a unit Paurometabola. Ground-oriented habits, leathery

forewings (tegmina), and botryoid male accessory glands were considered as potential paurometabolous groundplan apomorphies by Hennig (1969). KRISTENSEN (e.g., 1975, 1991) underlined the very uncertain monophyly of the “lower neopterans” and presented a cladogram showing the entire lineage as a completely unresolved comb, with Dictyoptera as the only supraordinal terminal taxon (Kristensen, 1991: fig. 5.5). The monophyly of the entire group is presently not supported by a single convincing morphological autapomorphy. “Typical” features are forewings modified as leathery tegmina, hind wings with an enlarged anal field, and pad-like tarsal euplantulae (e.g., KRISTENSEN, 1975; BEUTEL & GORB, 2006, 2008). However, none of these features occurs in all groups. Wings are completely lacking in Mantophasmatodea and Grylloblattodea and they are distinctly simplified in Embioptera, Isoptera and Zoraptera. The attachment devices of the distal leg are atypical in Embioptera and Dermaptera, largely reduced in Grylloblattodea (minute euplantulae, arolium absent), and completely missing in Zoraptera.

In recent years, partly triggered by the spectacular discovery of Mantophasmatodea (KLASS *et al.*, 2002; see also KLASS *et al.*, 2003; DAAMGARD *et al.*, 2008), the interest in the phylogenetic relationships of the polyneopteran orders increased. However, studies based either on morphology in a wide sense (e.g., DALLAI *et al.*, 2003, 2005, 2007; BEUTEL & GORB, 2006, 2008; YOSHIZAWA, 2007, 2011;

WIPFLER *et al.*, 2011) or on molecular data (TERRY & WHITING, 2005; YOSHIZAWA & JOHNSON, 2005; CAMERON *et al.*, 2006, ISHIWATA *et al.* 2011; WANG *et al.*, 2013) resulted in an astonishing “diversity” of different branching patterns and did not converge upon a stable systematic concept (see also TRAUTWEIN *et al.*, 2012: fig. 1).

In the present contribution short introductions of all orders presently assigned to Polyneoptera are presented. The morphological approach of the Entomology Group at the Phyletisches Museum (Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie, FSU Jena) is discussed briefly. The main aim is to outline recent developments in the investigation of the phylogenetic relationships. This comprises preliminary results from a morphology-based project (DFG, BE1789/10-1) mainly conducted by the Entomology group at the Phyletisches Museum and T. Hörnschemeyer and co-workers (University of Göttingen), but also results of a cooperation with the Research group of R. Machida (Sugadaira Montane Research Center, Tsukuba University) and first results of the 1KITE project ([www:1KITE.org](http://www.1KITE.org)) based on analyses of transcriptomes.

#### THE ORDERS OF POLYNEOPTERA OR “LOWER NEOPTERA”

##### *Plecoptera*

Plecoptera are a medium sized group with ca. 3,500 described species and a worldwide distribution. Their placement in Polyneoptera was often

disputed (see above, e.g., HENNIG, 1969; KRISTENSEN, 1975, 1991). They are mostly characterized by plesiomorphic features, such as for instance largely unmodified mouthparts, long fili-form antennae, unsclerotized forewings, inconspicuous tarsal euplantulae (BEUTEL & GORB, 2006), and multisegmented cerci. Plecoptera are the only polyneopteran group with aquatic larvae. As the aquatic immatures (“naiads”) of Ephemeroptera, Odonata and Plecoptera differ very distinctly in their morphology and specific adaptations, it appears unlikely that this is a preserved groundplan condition of Pterygota. Plecopteran larvae usually live in oxygen-rich rivers (ZWICK, 1980) and can be used as indicators of water quality. They are highly diverse in their breathing organs (e.g., gills on the cervical membrane, the leg bases, or the abdominal apex) and their feeding habits. Feeding plays only a minor role (if at all) in adults of some plecopteran groups. Two membranous pairs of wings are almost always present. The anal field of the hind wings is enlarged and a fan-wise folding pattern is found in larger species. The fore- and hindwings are not coupled in flight (functional quadrup-terism) and the flying abilities are modest. Plecoptera are supported as a clade by an unusual intersegmental musculature of the larvae and by some features of the internal genitalia (ZWICK, 1980), notably by testes and ovaries of both sides connected anteriorly and forming a closed loop. An additional derived character complex is the greatly reduced condition of the external male and female genitalia.



Fig. 1  
*Tyrannopasma gladiator*. Foto courtesy Reinhard Predel.

*Mantodea (praying mantises)*

Mantodea are a medium sized group with ca. 2,300 known species. They occur in warmer regions, with only one species reaching Central Europe. Mantodeans or praying mantises are specialized carnivores with raptorial forelegs, in the typical case ambush predators. Camouflage mechanisms are frequently found in the group. They are also known for females devouring the male during copulation. Autapomorphic features are mostly linked with the specialized predacious habits. This includes the very movable triangular head with large compound eyes and very long and thin multisegmented antennae and the raptorial forelegs. The forewings are typical leathery tegmina as they also occur in other lower neopteran groups ("Blattaria", Orthoptera, Phasmatodea, Dermaptera) and the anal field of the hind wings is enlarged and folded fan-wise.

*"Blattaria" (roaches)*

Insects similar to roaches were already very successful in the Carboniferous (e.g., GRIMALDI & ENGEL, 2005). Roaches comprise approximately 4,600 species which are mainly found in tropical and subtropical areas. Relatively few species occur in the temperate regions and few species are economically important cosmopolitan pest insects (e.g., *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*) which can cause great damage, especially to stored products. Roaches are usually omnivorous but specialized wood-feeding habits have evolved within the group (e.g., *Cryptocercus*). Typical roaches are ground oriented and running very efficiently. The forewings, if present, are leathery tegmina. In the ground plan a large anal field of the hindwing is present and folded in a fan-wise manner. The flying abilities are modest at best and many species are brachypterous or wingless, especially as females. The roaches ("Blattaria") are not monophyletic but Isoptera are a subordinate group within a clade Blattodea (e.g., DEITZ *et al.*, 2003; LO *et al.*, 2000).

*Isoptera (termites)*

Isoptera are the sistergroup of the roach genus *Cryptocercus* (e.g., DEITZ *et al.*, 2003). They are highly specialized wood-feeding insects (e.g., WEIDNER, 1970). Like roaches they mainly occur in tropical and subtropical areas. They can cause extreme damage to wooden constructions in the widest sense and are a serious problem in many countries. The termites have evolved highly developed social systems with distinctly different castes. Both pairs of wings are membranous and the hind wings lack an enlarged anal field. The

venation is simplified and a zone of weakness is present at the base. The wings are discarded after a short wedding flight. Some groups establish their colonies simply in rotting wood (ground-plan) whereas others build sophisticated termite mounds. Largely immobilized physogastric females can produce enormous numbers of eggs.

*Embioptera (web spinners)*

Embioptera are a small group with ca. 360 described species. They occur in warmer regions also including the Mediterranean area. The relatively small insects are characterized by a conspicuous dimorphism, with males with simplified dehiscent wings and larger completely wingless females (e.g., KALTENBACH, 1968). The presence of greatly enlarged protarsomeres 1 with numerous spinning gland subunits is a unique autapomorphy. With silk formed by the gland secretions they produce galleries under stones or wood. In this protected environment they move very efficiently forwards and backwards with their cylindrical body. Embioptera live in colonies and female broodcare is an additional apomorphic feature of the order. The external genitalia are strongly modified. The ovipositor is missing.

*Dermaptera (earwigs)*

Dermaptera are another medium sized group with ca. 2000 spp. species, mainly but not only occurring in warmer regions. Autapomorphies are the strongly shortened sclerotized forewings (sometimes erroneously referred to as elytra) and the one-segmented cerci forming a pincer-like apparatus at the tip of the abdomen (e.g., GÜNTHER & HERTER, 1974). The hindwings are excessively folded and stored under the shortened forewings at rest. Dermapterans are mostly omnivorous and have a preference for narrow spaces. Some species are highly specialized ectoparasites of mammals including bats. Like Embioptera they are characterized by female broodcare and the external genitalia are also strongly modified. The ovipositor is very thin and not suitable for the deposition of eggs.

*Orthoptera (grasshoppers, locusts, katyids)*

With ca. 20,000 described species Orthoptera are by far the most successful group of Polyneoptera (BEIER, 1972). They reach the greatest diversity in tropical and subtropical areas but occur also in the temperate regions. The monophyly is well supported by the presence of a saddle-shaped pronotum, hing legs modified as jumping legs, and longitudinally twisted wing buds of the nymphs. Orthoptera are subdivided

in two well-founded suborders, Ensifera with long antennae and ovipositor, and Caelifera with the antennae and ovipositor greatly shortened. Many species of Ensifera are carnivorous, whereas caeliferans generally feed on plants. The remarkable acoustic communication systems, which have likely contributed to the evolutionary success, have apparently evolved several times independently. Locusts are already mentioned in the Bible as one of the plagues. *Locusta migratoria* and some other species can occur in extreme numbers of individuals and cause tremendous damage in agriculture.

#### *Phasmatodea (stick insects, walking leaves)*

Phasmatodea are a medium sized group with ca. 3,000 described species. They are mainly restricted to tropical and subtropical regions but also occur in warmer European areas including Italy (*Bacillus* and *Clonopsis*). In contrast to Orthoptera they are exclusively phytophagous (BEIER, 1968). Phasmatodea were considered as close relatives of Orthoptera (or even as a subgroup) by different authors (e.g., WILLMANN, 2005). Autapomorphies are defense glands with openings on the pronotum and a pear-shaped appendage of the midgut. The elaborate camouflage mechanisms commonly found in the group do not belong to the ground plan (BRADLER, 2009). Most species either resemble twigs or leaves (*Phyllium*), but the basal Timematodea have a simple cigar-shaped body. Most species are wingless but well developed wings occur within the order. It was suggested that wings re-evolved within Phasmatodea (WHITING *et al.*, 2003) but this hypothesis is strongly debated.

#### *Grylloblattodea (ice crawlers)*

Grylloblattodea are one of the smallest groups of insects with presently 32 described extant species (SCHOVILLE, 2012). They occur in western North America and in northern Asia including the Altai in the west and Japan in the east (BAI *et al.*, 2010; SCHOVILLE, 2012). All species are completely wingless. A remarkable feature is that they only occur in cold areas, usually in mountain regions. In the typical case they feed on dead or dying insects along snow fields or glaciers. *Grylloblatta campodeiformis* dies at temperatures above 15° C, but some species occur in lower elevations and even in areas with relatively warm climatic conditions, as for instance the southeastern Japanese main island Shikoku. The group is mostly characterized by plesiomorphic features such as for instance largely unmodified orthopteroid mouthparts, filiform antennae, five-segmented

tarsi, and multisegmented antennae. The strongly asymmetric genitalia are probably autapomorphic for the group.

The fossil record shows that the few extant grylloblattodean species are only a relic of a more widely distributed and moderately successful group (e.g., VRSANSKY *et al.*, 2001; ENGEL & GRIMALDI, 2004; BAI *et al.*, 2011). However, the assignment of fossils preserved only as wings is problematic

#### *Mantophasmatodea (heelwalkers)*

The discovery of the order Mantophasmatodea (Fig. 1) about ten years ago (KLASS *et al.*, 2002) was a highlight in systematic entomology. The group is restricted to southern Africa. The first two specimens were not discovered in the field but in museums in Berlin and Lund, respectively. Like Grylloblattodea they are completely wingless. They are night active predators and they are usually found in lower vegetation. The monophyly is supported by unique features of the filiform antennae (DRILLING & KLASS, 2010) and by a very large pan-shaped arolium densely covered with acanthae. A similar arolium occurs in basal lineages of Phasmatodea (BEUTEL & GORB, 2008). However, in Mantophasmatodea it is only in contact with the substrate in specific situations, for instance when they carry large prey or when they walk on steep and smooth surfaces. The name “heelwalkers” refers to the elevated position of the arolium during normal locomotion.

#### *Zoraptera (groundlice, angel insects)*

Zoraptera is one of the smallest insect orders with presently 39 described species placed in one monogeneric family Zorotypidae (MASHIMO *et al.*, 2013). The group occurs in tropical and subtropical regions (Fig. 2) but is missing on the Australian mainland. The occurrence of *Zorotypus hubbardi* in the northern U.S.A. is an artifact. The position of Zoraptera is one of the most disputed issues in insect phylogenetics. HENNIG (1969) placed the small order as the sistergroup of Acercaria (Paraneoptera) but recent results strongly suggest a placement among the polyneopteran orders (see below). The monophyletic origin is undisputed. The most conspicuous autapomorphy is the dimorphism, with unpigmented morphs without wings and eyes, and more or less dark brown individuals which have compound eyes and ocelli and two pairs of simplified but functioning wings. Both pairs of wings are membranous with a distinctly reduced venation and an enlarged anal field is missing. In contrast to earlier statements (e.g., BOUDREAUX,



Fig. 2  
Collecting site of *Zorotypus* spp. in Ecuador. Foto courtesy Yoko Matsumura.

1979) the thoracic muscle system is well developed and probably close to the neopteran groundplan (FRIEDRICH & BEUTEL, 2008a). All known species are very small (2 mm or less) and cryptic. They are mostly found in humid conditions (Fig. 2), especially under bark.

#### THE MORPHOLOGICAL APPROACH OF THE ENTOMOLOGY GROUP AT THE PHYLETISCHES MUSEUM

The Entomology Group was established at the Phyletisches Museum (Jena) in 2004. Its research is focused on innovative morphological techniques and high level insect phylogeny. In the last ten years strong efforts were made to optimize morphological methods (e.g., BEUTEL *et al.*, 2011; FRIEDRICH *et al.*, 2013; BEUTEL *et al.*, 2013). Depending on the species under study different combinations of traditional and innovative techniques were applied. This includes dissections in some cases. This simple technique can yield

results very rapidly, especially an overview of general anatomical configurations, but is only suitable for larger specimens with a body size above 10 mm. Histology, i.e. microtome sectioning is a well-established technique with a long tradition in human anatomy. It was greatly improved in the last decades by the use of new embedding materials (e.g., Araldit, Spurr) and glass or diamond knives. This makes microtome sectioning much more suitable for organisms with a hardened exoskeleton (BEUTEL *et al.*, 2013; FRIEDRICH *et al.*, 2013). Scanning electron microscopy is extremely useful for the documentation of external surface structures. With a specifically designed rotatable specimen holder (POHL, 2010) it is possible to obtain all standard views with a single specimen and to reduced charging. Confocal laser scanning microscopy can be useful for examining very small (or flat) specimens or also isolated parts such as for instance genitalia (e.g., SCHAWAROCH *et al.*, 2005). Micro-computed tomography ( $\mu$ -CT) has turned out as extremely useful in insect morphology in the last 10 years. Since its first

application in entomology (HÖRNSCHEMEYER *et al.*, 2002) this technique was distinctly improved (e.g., FRIEDRICH & BEUTEL, 2008b; FRIEDRICH *et al.*, 2013). Moreover, desktop  $\mu$ -CT scanners are meanwhile available at many institutions. Micro-computed tomography has several advantages. It is largely artifact free and the images are perfectly aligned for reconstruction. As it is a non-invasive method it is also suitable for scanning very rare specimens and even type material. The maximum resolution is distinctly below 1  $\mu$ m. It depends on the size of the specimen and the specific equipment (see FRIEDRICH *et al.*, 2013). Visualization and animation of external and internal structures has also greatly improved since computer-based reconstruction was introduced in the 1990ties (e.g., BEUTEL & HAAS, 1998). A combination of Imaris (or Amira) with Maya turned out as highly efficient, combining advantages of both software programs, automatic surface reconstruction and implied surface smoothing functions (FRIEDRICH *et al.*, 2013).

The optimized combination of the techniques outlined here and an efficient work-flow make it possible to compile large and well documented morphological data sets within a relatively short time frame. In the morphology-based Polyneoptera-project a matrix with 369 characters (also including developmental features and sperm morphology) was compiled within approximately two years. Presently analyzed molecular data sets obviously dwarf even sizable morphological matrices (e.g., BEUTEL *et al.*, 2011). Nevertheless, the accelerated data acquisition greatly strengthens the morphological part in projects with a broad spectrum of approaches (e.g., 1KITE [www:1KITE.org]: transcriptome analyses, bioinformatics, morphology, embryology, palaeontology) and aiming at complex evolutionary scenarios.

#### RECENT DEVELOPMENTS IN POLYNEOPTERAN SYSTEMATICS

As pointed out above, recent studies based on morphological characters (e.g., BEUTEL & GORB, 2006, 2008; YOSHIZAWA, 2007, 2011; WIPFLER *et al.*, 2011) or on different molecular data sets (e.g., WHEELER *et al.*, 2001; TERRY & WHITING, 2005; LETSCH, *et al.*, 2012) did not yield consistent results (Fig. 3). Nevertheless, several issues in polyneopteran systematics appear clarified or at least close to a stable solution.

Dictyoptera were the only widely accepted supraordinal polyneopteran group for a long time (e.g., HENNIG, 1969). The clade comprising

Mantodea, roaches and termites is mainly characterized by an accessory anterior tentorial bridge formed by medially connected laminatentoria (sometimes erroneously referred to as “perforated corpotentorium”), by a specific armature of the proventriculus, a female genital atrium, and by the production of robust egg cocoons, the oothecae (secondarily lost in some roaches and in Isoptera excluding Mastotermitidea).

An important breakthrough was the discovery that termites are only a subordinate subgroup of Blattodea, with the subsocial and wood-associated genus *Cryptocercus* as its sister taxon. This was confirmed by morphological characters (e.g., DEITZ *et al.*, 2003) and by molecular data (LO *et al.*, 2000) and is also supported by the presence of endosymbionts – flagellates – which do not occur in other groups of insects including other roaches.

In the last years, the situation in polyneopteran systematics has further improved. Studies based on transcriptomes (LETSCH *et al.*, 2012; LETSCH & SIMON, 2013) tentatively suggest a monophyletic origin of Polyneoptera including Plecoptera, but both studies did not include all orders.

Soon after the discovery of Mantophasmatodea (KLASS *et al.*, 2002) this new group was identified as the sister group of the long disputed Grylloblattodea (e.g., KLASS *et al.*, 2003; TERRY & WHITING, 2005; UCHIFUNE & MACHIDA, 2005; BEUTEL & GORB, 2006; BAUM *et al.*, 2007; WIPFLER *et al.*, 2011). Both completely wingless taxa were united in a clade Xenonomia. Whether the loss of wings occurred in a common ancestor or independently is the topic of current investigations. Another breakthrough was the placement of Phasmatodea. As mentioned above they were considered as close relatives of Orthoptera by most insect systematists (e.g., WILLMANN, 2005). This hypothesis was not confirmed by recent studies based on morphology (e.g., WIPFLER *et al.*, 2011; FRIEDEMANN *et al.*, 2012) or molecular data (TERRY & WHITING, 2005; YOSHIZAWA & JOHNSON, 2005; ISHIWATA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013). Phasmatodea are very likely the sister group of Embioptera, both groups forming a clade which is called Eukinolabia (e.g., TERRY & WHITING, 2005; YOSHIZAWA & JOHNSON, 2005; ISHIWATA *et al.*, 2011; WIPFLER *et al.* 2011).

A very important result is the placement of Zoraptera within Polyneoptera. This implies that apomorphies of Paraneoptera (Zoraptera + Acercaria) suggested by HENNIG (1969) and others (e.g., BEUTEL & WEIDE, 2005) are due to parallel evolution, possibly partly related with size reduction (Zoraptera, Psocodea, Thysanoptera). This includes the reduced number of tarsomeres

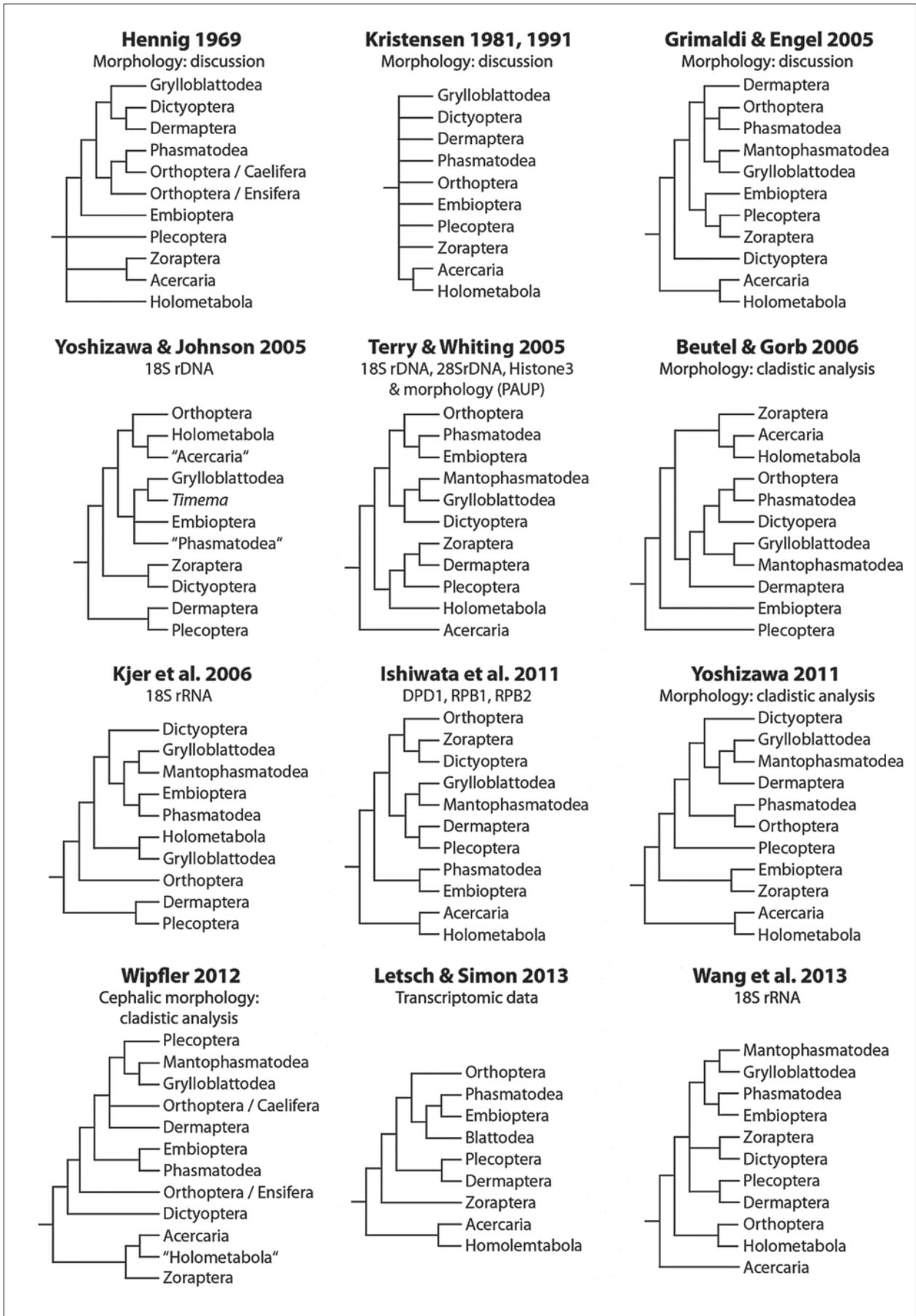


Fig. 3

Cladograms showing hypothesized relationships of Polyneopteran orders.

(3 or 2), Malpighian tubules (6 or 4), and separate abdominal ganglia (2 complexes or only 1). Polyneopteran affinities of Zoraptera are supported by different data sets. Very characteristic features of the basal wing sclerites (YOSHIZAWA, 2007) suggest a placement of Zoraptera next to Embioptera, seemingly in contrast with the Eukinolabia concept. Another good argument is the presence of a very specific antennal heart, which also occurs in some of the polyneopteran orders but not in Acercaria or other hexapod lineages (B. Wipfler, pers. obs.). A placement of Zoraptera in Polyneoptera is also supported by a recent developmental study. The embryo formation and blastokinesis are similar to patterns in other polyneopteran groups but very distinctly different from what is found in the acercarian lineages (MASHIMO *et al.*, 2013). Features of the egg (MASHIMO *et al.*, 2011) and spermatozoa (DALLAI *et al.*, 2011, 2012a, b) tentatively suggest a monophyletic group comprising Embioptera, Phasmatodea and Zoraptera, but the characters were not included in formal analyses yet. A sistergroup relationship between Zoraptera and Dictyoptera was suggested by BOUDREAUX (1979) based on very weak morphological arguments (see FRIEDRICH & BEUTEL, 2008a) but also by YOSHIZAWA & JOHNSON (2005) and in a study based on analyses of nuclear gene sequences (ISHIWATA *et al.*, 2011).

Recent studies on Zoraptera (DALLAI *et al.*, 2011, 2012a, b, 2013) revealed that this very small and inconspicuous group was apparently shaped by different forms of selection. The very uniform general morphology is in very distinct contrast to striking differences in the genital morphology and the reproductive behaviour of the species. It is likely that the accelerated evolution of features related to reproduction is due to sexual selection (e.g., DALLAI *et al.*, 2013).

Recently a matrix of 369 well-documented morphological characters was compiled including characters of the head, thorax, attachment structures, wings, abdomen, embryonic development, and spermatozoa (WIPFLER *et al.*, unpubl. results). In the single minimum length tree yielded by the parsimony analysis (TNT: GOLOBOFF *et al.*, 2003) the monophyletic origin of Polyneoptera was supported, and also the monophyly of Dictyoptera, Blattodea, Xenonomia and Eukinolabia. Zoraptera are placed as sistergroup of Plecoptera but this possible clade is only weakly supported. What remains insufficiently resolved is the phylogenetic backbone of Polyneoptera. Apparently the presently available morphological data are not sufficient for resolving the deep splits

within the group, which obviously go back to the rapid radiation in the Carboniferous (see above).

Preliminary results of analyses of transcriptomes of more than hundred terminal taxa representing all hexapod orders (1KITE; B. Misof & K. Meusemann, pers. comm. to R.G. Beutel & B. Wipfler) also support the monophyletic origin of Polyneoptera including Plecoptera and Zoraptera. A weakly supported clade Zoraptera + Dermaptera forms the sistergroup of all the remaining polyneopteran orders. Plecoptera is placed as the sister taxon of a large clade comprising Orthoptera, Dictyoptera, Xenonomia and Eukinolabia (see also DALLAI *et al.*, 2005). The last three groups form a monophyletic unit, and Xenonomia and Eukinolabia are sistergroups.

## OUTLOOK

The phylogeny and evolution of the “lower neopteran” orders will be investigated intensively in the Polyneoptera-subproject of 1KITE, and the Dictyoptera in more detail in another subproject focussed on this monophyletic polyneopteran subunit. Transcriptomes will be analysed for an extensive sampling of all polyneopteran orders. The obtained phylogenies will be used as the basis for further detailed investigations of different aspects of the group. This will include the dating of important evolutionary events and phylogenetic splits, but also the reconstruction of morphological and embryological character transformations. This approach will probably not only yield a stable phylogenetic hypothesis but also a complex and well-founded evolutionary scenario for this difficult but fascinating lineage of Hexapoda.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Academia Nazionale Italiana di Entomologia for inviting RGB to give a presentation at the Giornata Scientifica and for financially supporting the visit. We are also grateful to the German Science Foundation (DFG) for supporting the Polyneoptera project (BE 1789/10-1).

## BIBLIOGRAFIA

- BAI M., JARVIS K., WANG S. Y., SONG K.-Q., WANG Y. P., WANG Z. L., LI W. Z., WANG W., YANG X.-K. 2010 – *A second new species of ice crawlers from China (Insecta: Grylloblattodea), with thorax evolution and the prediction of potential distribution.* - PLoS ONE, 5: e12850.
- BAUM E., DRESSLER C., BEUTEL R.G., 2007 – *Head struc-*

- tures of *Karoopasma* sp. (Hexapoda, Mantophasmatodea) with phylogenetic implications. - Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research, 45: 104-119.
- BEIER M., 1968 – *Phasmida (Stab- oder Gespenstheuschrecken)*. Handbuch der Zoologie, IV, Arthropoda: Insecta. Inst. 6. Walter de Gruyter, Berlin.
- BEIER M., 1972 – *Saltatoria (Grillen und Heuschrecken)*. Handbuch der Zoologie, IV, Arthropoda: Insecta. Inst. 17. Walter de Gruyter, Berlin.
- BEUTEL R.G., FRIEDRICH F., GE S.-Q., YANG X.-K., 2013 – *Insect Morphology and Phylogeny*. De Gruyter, Berlin, New York.
- BEUTEL R. G., FRIEDRICH F., HÖRNSCHEMEYER T., POHL H., HÜNEFELD F., BECKMANN F., MEIER R., MISOF B., WHITING M. F., VILHEMSEN L., 2011 – *Morphological and molecular evidence converging upon a robust phylogeny of the megadiverse Holometabola*. - Cladistics, 26: 1-15.
- BEUTEL R.G., GORB S.N., 2006 – *A revised interpretation of the evolution of attachment structures in Hexapoda with special emphasis on Mantophasmatodea*. - Arthropod Systematics & Phylogeny, 61: 3-35.
- BEUTEL R.G., GORB S.N., 2008 – *Evolutionary scenarios for unusual attachment devices of Phasmatodea and Mantophasmatodea (Insecta)*. - Systematic Entomology, 33: 501-510.
- BEUTEL R.G., HAAS A., 1998 – *Larval head morphology of Hydroscapha natans LeConte, 1874 (Coleoptera, Myxophaga, Hydroscaphidae) with special reference to miniaturization*. - Zoomorphology, 18: 103-116.
- BEUTEL R.G., WEIDE D., 2005 – *Cephalic anatomy of Zorotypus hubbardi (Hexapoda: Zoraptera): new evidence for a relationship with Acercaria*. - Zoomorphology, 124: 121–136.
- BOUDREAUX H.B., 1979 – *Arthropod Phylogeny, with Special Reference to Insects*. Wiley, New York.
- BRADLER S., 2009 – *Die Phylogenie der Stab- und Gespenstschrecken (Insecta: Phasmatodea)*. - Species, Phylogeny and Evolution. 2: 3-139.
- CAMERON S.L., BECKENBACH A.T., DOWTON M., WHITING M.F., 2006 – *Evidence from mitochondrial genomics on interordinal relationships in insects*. - Arthropod Systematics & Phylogeny, 64: 27-34.
- DALLAI R., FRATI F., LUPETTI P., ADIS J., 2003 – *Sperm ultrastructure of Mantophasma zephyra (Insecta, Mantophasmatodea)*. - Zoomorphology, 122: 67-76.
- DALLAI R., GOTTARDO M., MERCATI D., MACHIDA R., MASHIMO Y., MATSUMURA Y., BEUTEL R.G., 2013 – *Divergent mating patterns and a unique mode of external sperm transfer in Zoraptera: an enigmatic group of pterygote insects*. - Naturwissenschaften, 100: 581-594.
- DALLAI R., MACHIDA R., UCHIFUNE T., LUPETTI P., FRATI F., 2005 – *The sperm structure of Galloisiana yuasai (Insecta, Grylloblattodea) and implications for the phylogenetic position of Grylloblattodea*. - Zoomorphology, 124: 205-212.
- DALLAI R., MACHIDA R., JINTSU Y., FRATI F., LUPETTI P., 2007 – *The sperm structure of Embioptera (Insecta) and phylogenetic considerations*. - Zoomorphology, 126: 53-59.
- DALLAI R., MERCATI D., GOTTARDO M., MACHIDA R., MASHIMO Y., BEUTEL R.G., 2011 – *The male reproductive system of Zorotypus caudelli Karny (Zoraptera): sperm structure and spermiogenesis*. - Arthropod Structure and Development, 40 (6): 531-47.
- DALLAI R., MERCATI D., GOTTARDO M., MACHIDA R., MASHIMO Y., BEUTEL R.G., 2012a – *The fine structure of the female reproductive system of Zorotypus caudelli Karny (Zoraptera)*. - Arthropod Structure and Development, 41: 51-63.
- DALLAI R., MERCATI D., GOTTARDO M., DOSSEY A.T., MACHIDA R., MASHIMO Y., BEUTEL R.G., 2012b – *The male and female reproductive systems of Zorotypus hubbardi Caudell, 1918 (Zoraptera)*. - Arthropod Structure and Development, 41(4): 337-359.
- DAMGAARD J., KLASS K. D., PICKER M. D., BUDER G., 2008 – *Phylogeny of the heelwalkers (Insecta: Mantophasmatodea) based on mtDNA sequences, with evidence for additional taxa in South Africa*. - Molecular Phylogenetics and Evolution, 47: 443-462.
- DEITZ L.L., NALEPA C., KLASS K.D., 2003 – *Phylogeny of the Dictyoptera re-examined (Insecta)*. - Entomologische Abhandlungen, 61: 69-91.
- DRILLING K., KLASS K. D., 2010 – *Surface structures of the antenna of Mantophasmatodea (Insecta)*. - Zoologischer Anzeiger, 249 (3): 121-137.
- ENGEL M.S., GRIMALDI D.A., 2004 – *A new rock crawler in Baltic amber, with comments on the order (Mantophasmatodea: Mantophasmatidae)*. - American Museum Novitates, 3431: 1-11.
- FRIEDEMANN K. WIPFLER B., BRADLER S., BEUTEL R.G., 2012 – *On the head morphology of Phyllium and the phylogenetic relationships of Phasmatodea (Insecta)*. - Acta Zoologica, 91: 184-199.
- FRIEDRICH F., BEUTEL R.G., 2008a – *The thorax of Zorotypus (Hexapoda, Zoraptera) and a new nomenclature for the musculature of Neoptera*. - Arthropod Structure and Development, 37: 29-54
- FRIEDRICH F., BEUTEL R.G., 2008b – *Micro-computer tomography and a renaissance of insect morphology*. SPIE (Stock, S.R. ed.), San Diego, CA, pp. 1-6.
- FRIEDRICH F., MATSUMURA Y., POHL H., BAI M., HÖRNSCHEMEYER T., BEUTEL R.G., 2013 – *Insect morphology in the age of phylogenomics - innovative techniques and its future role in systematics*. - Entomological Science, doi:10.1111/ens.12053.
- GOLOBOFF P.A., FARRIS J.S., NIXON K.C., 2003 – *TNT: tree analyses using new technology, program and documentation*. Available from <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny>.
- GRIMALDI D.A., ENGEL M.S., 2005 – *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain.
- GÜNTHER K., HERTER K., 1974 – *Dermaptera (Ohrwürmer)*. Handbuch der Zoologie. (Helmcke, J.-G., Starck, D. & Wermuth, H. eds.). Inst. 23. Walter de Gruyter, Berlin, 158 pp.
- HENNIG W., 1969 – *Die Stammesgeschichte der Insekten*. Waldemar Kramer; Frankfurt a.M., 436 pp.
- HÖRNSCHEMEYER T., BEUTEL R.G., PASOP F., 2002 – *Head structures of Priacma serrata LeConte (Coleoptera, Archostemata) inferred from x-ray tomography*. - Journal of Morphology, 252 (3): 298-314.
- ISHIWATA K., SASAKI G., OGAWA J., MIYATA T., SU Z.-H., 2011 – *Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences*. - Molecular Phylogenetics and Evolution, 58: 169-180.
- KALTENBACH A., 1968 – *Embioptera (Spinnfüßer)*. Handbuch der Zoologie. (Helmcke, J.-G., Starck, D. & Wermuth, H. eds.). Inst. 1. Walter de Gruyter, Berlin, 29 pp.
- KLASS K. D., PICKER M. D., DAMGAARD J., NOORT S. V., TOJO K., 2003 – *The taxonomy, genitalic morphology,*

- and phylogenetic relationships of Southern African Mantophasmatodea (Insecta). - Entomologische Abhandlungen, 61: 3-67.
- KLASS K.D., ZOMPRO O., KRISTENSEN N.P., ADIS J., 2002 - *Mantophasmatodea: a new insect order with extant members in the Afrotropics*. - Science, 296: 1456-1459.
- KRISTENSEN N.P., 1975 - *The phylogeny of hexapod "orders". A critical review of recent accounts*. - Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research, 13: 1-44.
- KRISTENSEN N.P., 1991 - *Phylogeny of Extant Hexapods*. Insects of Australia, Vol. 2. (ed. by J. D. Naumann, P. B. Carne and J. F. Lawrence). Melbourne University Press, Melbourne, Australia, pp. 125-140.
- LETSCH H.O., MEUSEMANN, K., WIPFLER, B., SCHÜTTE, K., BEUTEL, R., MISOF B., 2012 - *Insect phylogenomics: results, problems and the impact of matrix composition*. - Proceedings of the Royal Society B, 279 (1741): 3282-3290.
- LETSCH H., SIMON S., 2013 - *Insect phylogenomics: new insights on the relationships of lower neopteran orders (Polyneoptera)*. - Systematic Entomology, 38: 783-793.
- LO N., TOKUDA G., WATANABE H., ROSE H., SLAYTOR M., MAEKAWA K., BANDI C., NODA H., 2000 - *Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches*. - Current Biology, 10: 801-804.
- MASHIMO Y., MACHIDA R., DALLAI R. GOTTARDO M. BEUTEL R.G., 2011 - *Egg structure of Zorotypus caudelli Karny (Insecta, Zoraptera, Zorotypidae)*. - Tissue & Cell, 43 (4): 230-237.
- MASHIMO Y., YOSHIZAWA K., ENGEL M.S., GHANI A.B., DALLAI R., BEUTEL R.G., MACHIDA R., 2013 - *Zorotypus in Peninsular Malaysia (Zoraptera: Zorotypidae), with the description of three new species*. - Zootaxa, 3717 (4): 498-514.
- MASHIMO Y., BEUTEL R.G., DALLAI R., LEE CH.-Y., MACHIDA R., (in press) - *Embryonic development of Zoraptera with special reference to external morphology, and its phylogenetic implications (Insecta)*. - Journal of Morphology, (in press).
- POHL H., 2010 - *A scanning electron microscopy specimen holder for viewing different angles of a single specimen*. - Microscopy Research and Technique, 73: 1073-1076.
- SCHAWAROCH V., GRIMALDI D., KLAUS S.V., 2005 - *Focussing on morphology: applications and implications of confocal laser scanning microscopy (Diptera: Campichoetidae, Cammilidae, Drosophilidae)*. - Proceedings of the Entomological Society of Washington, 107: 323-335.
- SCHOVILLE S.D., 2012 - *Three new species of Grylloblatta Walker (Insecta: Grylloblattodea: Grylloblattidae), from southern Oregon and northern California*. - Zootaxa, 3412: 42-52.
- TERRY M.D., WHITING M.F., 2005 - *Mantophasmatodea and phylogeny of the lower neopteran insects*. - Cladistics 21: 240-257.
- TRAUTWEIN M.D., WIEGMANN B.M., BEUTEL R., KJER, K.M., YEATES D.K., 2012 - *Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era*. - Annual Review of Entomology, 57: 449-468.
- UCHIFUNE T., MACHIDA R., 2005 - *Embryonic development of Galloisiana yuasai Asabina, with special reference to external morphology (Insecta: Grylloblattodea)*. - Journal of Morphology, 266: 182-207.
- VRANSKY P., STOROZHENKO S.Y., LABANDEIRA C.C., IHRINGOVA P., 2001 - *Galloisiana olgae sp. nov. (Grylloblattodea: Grylloblattidae) and the paleobiology of a relict order of insects*. - Annals of the Entomological Society of America, 94: 179-184.
- WANG Y., ENGEL M.S., RAFAEL J.A., DANG K., WU H., WANG Y., XIE Q., BU, W., 2013 - *A unique box in 28S rRNA is shared by the enigmatic insect order Zoraptera and Dictyoptera*. - Plos ONE 8: e53679.
- WEIDNER H., 1970 - *Isoptera (Termiten)*. Handbuch der Zoologie. (Helmcke, J.-G., Starck, D. & Wermuth, H. eds.). Walter de Gruyter, Berlin, Germany, pp. 1-147.
- WHEELER W.C., WHITING M., WHEELER Q.D., CARPENTER J.M., 2001 - *The phylogeny of the extant hexapod orders*. - Cladistics, 17: 113-169.
- WIPFLER B., MACHIDA R., MÜLLER B., BEUTEL R.G., 2011 - *On the head morphology of Grylloblattodea (Insecta) and the systematic position of the order - with a new nomenclature for the head muscles of Neoptera*. - Systematic Entomology, 36: 241-266.
- WHITING M.F., BRADLER S., MAXWELL T., 2003 - *Loss and recovery of wings in stick insects*. - Nature, 421: 264-267.
- WILLMANN R., 2005 - *Phylogenese und System der Insekten*. Lehrbuch der Speziellen Zoologie, Band I: 5. Teil: Insecta (Dathe, H.H. ed.), 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 1-65.
- YOSHIZAWA K., 2007 - *The Zoraptera problem: Evidence for Zoraptera + Embiodea from the wing base*. - Systematic Entomology 32: 197-204.
- YOSHIZAWA K., 2011 - *Monophyletic Polyneoptera recovered by wing base structure*. - Systematic Entomology, 36: 377-394.
- YOSHIZAWA K., JOHNSON K.P., 2005 - *Aligned 18S for Zoraptera (Insecta): Phylogenetic position and molecular evolution*. - Molecular Phylogenetics and Evolution, 37: 572-580.
- ZWICK P., 1980 - *Plecoptera (Steinfliegen)*. Handbuch der Zoologie. (Helmcke, J.-G., Starck, D. & Wermuth, H. eds.). Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 115 pp.

## LA SOCIALITÀ NEI POLINEOTTERI

STEFANO TURILLAZZI (\*)

(\*) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze.*

Letture tenuta durante la Giornata culturale su "Contributo alla conoscenza dei Polineotteri basali. Struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base e applicativi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 11 ottobre 2013.

### *Sociality in Polyneoptera*

The study of the evolution of social behaviour relies on the comparative method which compares the behavioural characteristics of living taxa in order to reconstruct the probable steps that led some species towards eusociality. In the Polyneoptera division we find taxa with intermediate social stages as far as the eusociality of Termites. This short survey focuses on some of the most important social characteristics in a group of orders that are still very poorly known in their behavioral ecology and sociobiology.

KEY WORDS: social evolution, Polyneoptera.

L'evoluzione del comportamento sociale rappresenta uno degli argomenti sui quali la ricerca biologica si è focalizzata negli ultimi quaranta anni ed è tuttora al centro di un dibattito molto acceso (HAMILTON, 1964; NOVAK *et al.*, 2010; ABBOT *et al.*, 2011). I principali modelli animali sui quali si è appuntato l'interesse sono stati gli insetti (WILSON, 1971; COSTA, 2006). Questo per il fatto che in questi animali si ritrovano vari gradi di complessità sociale, dalla vita solitaria fino a quel fenomeno definito con il termine di eusocialità. Secondo la definizione classica sono eusociali quelle forme i cui gruppi presentano tre principali caratteristiche, con individui che curano assieme la prole immatura, che hanno sovrapposizione di generazioni e, soprattutto, i membri delle cui società presentano una divisione riproduttiva del lavoro, vale a dire esistono riproduttori e non riproduttori (BATRA, 1966). Quest'ultima caratteristica porta naturalmente all'espressione di comportamenti particolari, che vengono definiti altruistici, intendendo con questo che gli individui che rinunciano alla propria riproduzione lo fanno per favorire quella degli individui riproduttori (in termini di fitness, abbassano la propria fitness diretta per aumentare quella di altri individui). Questo fenomeno, che già Darwin aveva intuito essere un grosso problema per la sua teoria, viene spiegato con varie teorie evolutive che vedono di volta in volta unità di selezione diverse (il gene, l'organismo uni o pluricellulare, la colonia) alla base del processo evolutivo (recenti reviews in merito sono quelle di HÖLLDOBLER e WILSON, 2009; QUELLER e STRASSMANN, 2009;

LEHMANN *et al.*, 2007; GARDNER e GRAFEN, 2009; BOURKE, 2011). È comunque generalmente accettato che lo studio dei vari, possibili, passi evolutivi che hanno portato all'eusocialità possa essere ricostruito con l'analisi delle varie forme di comportamento di specie viventi utilizzando il cosiddetto "metodo comparativo"; per questa ragione risultano modelli di studio ottimali quei gruppi sistematici che presentano taxa con caratteristiche sociali via via più complesse. Negli insetti queste caratteristiche si ritrovano soprattutto nell'ordine degli Imenotteri, tuttavia altre linee filetiche risultano interessanti, in particolar modo nella divisione dei Polineotteri dove vengono incluse le Termiti, unico altro taxon di insetti dove si ritrova un'alta espressione di eusocialità.

Si ritiene generalmente che le vie attraverso cui si è sviluppata l'eusocialità siano principalmente due: quella matrilocale, attraverso cure parentali via via più complesse che hanno portato, con la permanenza delle forme giovanili assieme ai genitori, a formare gruppi familiari sempre più estesi; e quella aggregazionale, con il raggruppamento di individui conspecifici a formare strutture sociali sempre più complesse, favorite da una migliore difesa da nemici o da una migliore possibilità di sfruttamento di risorse di vario tipo. Oltre a questo si individuano anche altre due caratteristiche molto importanti nelle forme sociali: la costruzione di un nido che accoglie il gruppo, e la presenza di strutture morfologiche e/o comportamentali adatte alla difesa dei membri giovanili e delle risorse della colonia stessa.

In questa breve relazione prenderò in esame

alcune delle forme che appartengono ai Polineotteri che si distinguono per la presenza di strutture sociali indici di tentativi evolutivi verso una socialità completa che, come ho detto, è stata però raggiunta solo nelle Termiti.

I fattori che hanno favorito l'evoluzione di comportamenti aggregativi negli organismi viventi sono molteplici. Tra questi i più importanti sono la difesa da predatori, una facilitazione nel controllo delle condizioni ambientali, l'acquisizione di vantaggi nello sfruttamento di risorse trofiche. D'altro canto è vero che l'aggregazione di numeri grandissimi di individui presenta svantaggi che possono concretizzarsi in una maggior suscettibilità alle epidemie, in conflitti frequenti per l'accaparramento di risorse di vario tipo (inclusi i partners sessuali), in una maggior visibilità dei gruppi nei confronti di predatori, ecc.. Quindi le ragioni fondamentali che hanno portato alla socialità sono principalmente di tipo ecologico.

I Polineotteri includono varie forme di insetti emimetaboli; i loro rapporti filogenetici sono riportati nella Fig. 1. Nella figura sono anche indicati sommariamente i gradi di socialità che si riscontrano nei vari taxa. In particolare va detto che nella maggior parte dei casi si rilevano cure parentali più o meno estese. Non tutte le forme presentano però nidi che possano dirsi elaborate costruzioni destinate a durare più di qualche mese e raramente sono riutilizzate da più generazioni. In nessun taxon, poi, sembra sia presente la cosiddetta aploidiploidia, che negli Imenotteri ha certa-

mente contribuito a favorire l'origine dell'eusocialità (HAMILTON, 1964)

Nella tabella 1 sono riportati sinotticamente per i vari taxa le principali caratteristiche proprie dei raggruppamenti sociali. In particolare ho indicato quelle che si possono riferire alla cura parentali, alla numerosità degli individui nelle colonie ed alcuni meccanismi di integrazione sociale (presenza di feromoni di vario tipo, divisione del lavoro ecc.). I dati sono stati principalmente ottenuti dalla recente e completa review di J. Costa (COSTA, 2006).

Le prime quattro colonne della tabella si riferiscono alla presenza di cure parentali o alla tendenza alla formazione di aggregati soprattutto di tipo difensivo. Questo, in fondo, rispecchia le due possibili strade evolutive verso la socialità prospettate dalla teoria: la via matrificiale e quella aggregazionale. La seconda è particolarmente presente nel sottordine Caeliphera degli Ortotteri. E' infatti nota la tendenza di alcune specie a formare raggruppamenti di giovani che hanno una funzione principalmente difensiva, mentre altre specie, come le locuste, presentano la capacità di metamorfosare fisiologicamente e comportamentalmente da una fase solitaria ad una gregaria in risposta a stimoli ambientali.

In specie dell'altro sottordine degli Ortotteri, gli Ensiferi, e in specie di tutti gli altri taxa presi in considerazione, invece, si hanno cure parentali più o meno estese che continuano oltre la schiusa delle uova e quindi danno vita ad una sovrapposi-

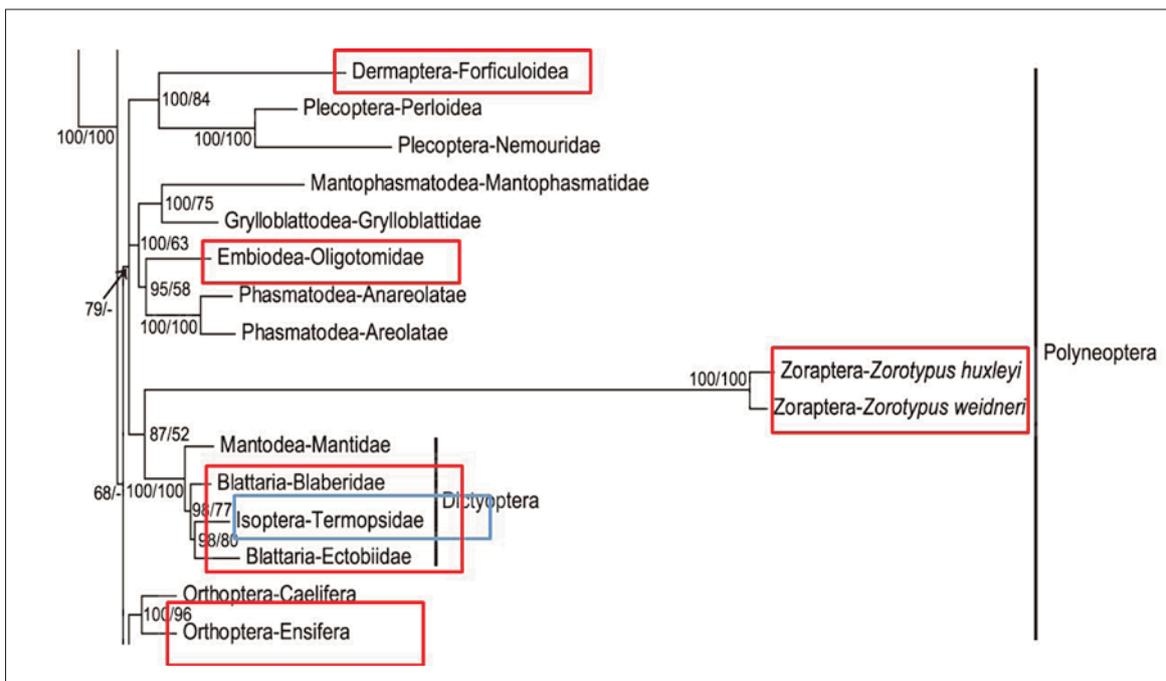


Fig.1

Rapporti filogenetici tra i vari taxa di Polineotteri. Sono incorniciati quei taxa che presentano specie con qualche carattere di socialità. (Da Wang et al. 2013, modificato)

Tabella 1 – Principali caratteri legati alla socialità in alcuni taxa di Polineoteri.

Asstem= assembramenti temporanei; sovrngen= sovrapposizione di generazioni; cpestes= cure parentali estese; cpcoop= cure parentali cooperative; mixcol= mancanza di riconoscimento coloniale; nidop= nido stabile per più generazioni; armi= armi di difesa coloniale; ferom= presenza di feromoni e livello di comunicazione; divlav= divisione di lavoro tra i membri del gruppo.

	asstem	sovrngen	cpestes	cpcoop	colonie	mixcol	nidop	armi	ferom	divlav
DER	-	+	++	-	-		-	+	?	-
EMB	-	+	++	?	<100	+	+	?	?	-
ZOR	-	+	+	?	>100<	+	-	-	Aggr	-
ISO	-	+	++	+	>1000	-	+	+	+++	+
BLA	-	+	++	?	<100	?	+	-	Aggr	-
CAE	+	-	-	-	-			-	Aggr	-
ENS	-	+	+	-	-		-	-	?	-

DER= Dermatteri; EMB = Embiotteri; ZOR = Zoratteri; ISO = Isotteri; BLA= altri Blattodea; CAE = Ortotteri Celiferi; ENS = Ortotteri Ensiferi

zione di generazioni. Le cure possono andare dalla semplice protezione attiva delle ninfe da predatori e possibili patogeni (mediante la pulizia del corpo da parte della madre), all'alimentazione delle ninfe con cibi cacciati (come nel caso delle prede dei Dermatteri) o rappresentati da secrezioni, rigurgiti o deiezioni prodotti dalla madre stessa. I Blattaria esibiscono la più ampia gamma di fenomeni di cure parentali riscontrabili negli insetti e nei Cryptocercidae è riportato un approvvigionamento progressivo delle ninfe con fluidi rigurgitati dalla madre o emessi dall'ano. In nessun caso, naturalmente con l'eccezione degli Isotteri, sono però riportati in letteratura casi certi di cure cooperative della prole con più adulti del gruppo sociale che si impegnano nell'allevamento dei piccoli (COSTA, 2006).

La quinta e la sesta colonna della tabella riassume, a grandi linee, la consistenza dei raggruppamenti che si vengono a formare quando i gruppi familiari si allargano per la permanenza di più generazioni o si uniscono con altri gruppi. Questi fenomeni sembrano essere presenti negli Zoratteri, dove possiamo avere colonie formate da centinaia di individui (maschie e femmine) adulti e immaturi di età diverse. Negli Embiotteri le colonie possono essere parimenti grandi ma sono formate da sottogruppi che si mantengono di solito divisi nel dedalo di gallerie di seta che costituisce il nido. Anche nei Cryptocercidae (Blattaria) si ritrovano colonie con vari adulti riproduttori e ninfe di tutte le età.

Tanto negli Embiotteri che negli Zoratteri sembra che colonie diverse possano convergere portando ad una mescolanza genetica del gruppo risultante. Questo è chiaramente indice della mancanza di fenomeni e meccanismi di riconoscimento coloniale che sembrano invece essere pre-

sentiti in alcuni Cryptocercidae e sono ovviamente ben efficienti nelle colonie degli Isotteri.

La settima colonna della tabella indica la presenza di un nido stabile e duraturo (cioè disponibile per l'utilizzazione da parte di varie generazioni). Solamente gli Embiotteri hanno la capacità di costruire nidi utilizzando un materiale di loro produzione (la seta prodotta da ghiandole tarsali), mentre alcuni Blattaria (Cryptocercidae) e gli Isotteri scavano gallerie nel legno o, le termiti superiori, usano secrezioni fecali che tengono assieme particelle di terra e lignina a somiglianza di mattoncini (WILSON, 1971). In tutti i casi, comunque, solo in questi taxa i nidi possono essere utilizzati più a lungo di un unico evento riproduttivo e rappresentano un punto focale per la vita di un gran numero di individui ed una risorsa da difendere, cooperativamente, contro attacchi di possibili usurpatori.

In realtà il fenomeno di una difesa comune si concretizza esclusivamente nelle colonie delle termiti che hanno compiuto il successivo passo di affidarsi a individui particolari muniti di armi adatte al compito: i soldati. Questo non è stato possibile negli altri Blattaria (che hanno scelto una difesa passiva basata su secrezioni ripugnanti e, forse, in mancanza di una predisposizione a formare morfi adatti alla difesa) né, tantomeno, negli Embiotteri, che sembrano mancare di una qualsiasi forma di difesa attiva nei confronti dei predatori se non quella rappresentata dalla velocità con la quale essi si muovono (in avanti e in retro-marcia) lungo le strette gallerie di seta del loro nido. Riguardo a questi ultimi, tuttavia, andrebbe chiarito il perché del dimorfismo dei maschi che si ritrova in varie species. Maschi atteri (e con grandi teste e mandibole), in effetti, sono stati proposti come eventuali morfi specializzati nella difesa

dei nido in specie della famiglia Australembiidae da J. EDGERLY (1997).

La penultima colonna prende in considerazione il grado di comunicazione che sembra esistere nei gruppi sociali dei vari taxa, con un esame di massima dei feromoni riportati nei singoli gruppi. Feromoni di aggregazione sembrano essere comuni in varie specie di tutti i taxa che formano colonie anche se esistono poche informazioni per gli Embiotteri. Nei Blattaria sono stati anche riportati feromoni di traccia (*Blattella*) e feromoni di allarme. Negli Isotteri abbiamo, ovviamente, la gamma completa dei meccanismi di comunicazione chimica che si ritrovano negli Insetti sociali.

L'ultima colonna è quella che più connota il grado di socialità e, come si vede, presenta un segno positivo solo nel caso degli Isotteri. Questi insetti presentano quattro caste: adulti alati, soldati, vere operaie e false operaie (pseudoergati) (Fig. 2). La socialità delle Termiti si origina ed evolve per la difesa del nido, ma i presupposti per la formazione della casta operaia si ritrovano già nei Blattaria, con la dipendenza delle ninfe dai genitori (NALEPA, 2011), e si perfezionano nel passaggio dalla vita in un unico ceppo delle termiti inferiori al foraggiamento esterno delle specie più evolute (KORB *et al.*, 2012).

A causa di ricerche pressoché assenti negli altri ordini (DILLON e DILLON, 2004), nella tabella manca un riferimento alla presenza di microrganismi simbiotici, utilizzati dalle Termiti e da altri Blattaria per la digestione della cellulosa di cui questi insetti si nutrono. La supposta necessità di una trasmissione verticale di questi simbiotici con interazioni tra i membri della colonia è stata considerata un fattore importante nell'insorgere e nell'evoluzione del comportamento sociale (CLEVELAND *et al.*, 1934).

Questa importanza sembra essere confermata dalle più recenti ricerche (NALEPA *et al.*, 2001; INWARD *et al.*, 2007; OHKUMA *et al.*, 2009).

In verità la serie di segni negativi che si ritrovano nell'ultima colonna non esclude la presenza di comportamenti altruistici e la possibilità di caste, più o meno stabilmente sterili, anche nel caso di altri gruppi. Abbiamo visto che la socialità si origina e si sviluppa in risposta a condizioni ambientali particolari e questo è vero per un'ampia gamma di organismi (vedi ad esempio i Crostacei del genere *Synalpheus* (DUFFY *et al.*, 2000) o i ratti fossori *Eterocephalus glaber* (JARVIS, 1981) e *Fukomys damarensis* (O'RIAN e FAULKES, 2008). Le nostre conoscenze delle varie forme di Polineotteri sono effettivamente limitate e sorprese potranno sempre sopraggiungere man mano che la ricerca approfondirà alcuni aspetti della biologia sociale di specie legate ad ambienti particolari.

#### RIASSUNTO

Lo studio dell'evoluzione della socialità si avvale del metodo comparativo che mette a confronto le caratteristiche comportamentali di taxa viventi per ricostruire i probabili passaggi evolutivi che hanno portato alcune specie a quella che viene definita "eusocialità". Nella divisione dei Polineotteri ritroviamo taxa con esempi di stadi sociali intermedi fino alla eusocialità delle Termiti. Questa breve relazione prende in esame alcune delle caratteristiche importanti che identificano questi stadi intermedi in un gruppo di ordini ancora poco conosciuto per l'ecologia comportamentale e la biologia sociale.

#### BIBLIOGRAFIA

ABBOT P., ABE J., ALCOCK J., ALIZON S., ALPEDRINHA J.A.C., ANDERSSON M., ANDRE J.B., 2011 – *Inclusive fitness theory and eusociality*. - Nature, 471: 7339, E1-E4.



Fig. 2

Caste in *Kaloterмес flavicollis*: ninfe, soldati, adulto dealato.

- BATRA S.W.T., 1966 – *Nests and social behavior of halictine bees of India (Hymenoptera: Halictidae)*. - Indian J. Entomol., 28: 375-393.
- BOURKE A.F.G., 2011 – *Principles of social evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- DILLON R.J., DILLON V.M., 2004 – *The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions*. - Annu. Rev. Entomol., 49: 71–92.
- CLEVELAND L.R., HALL S.K., SANDERS E.P., COLLIER J., 1934 – *The wood feeding roach Cryptocercus, its Protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach*. - Mem. Am. Acad. Arts Sci., 17: 185-382.
- COSTA J.T., 2006 – *The other social insect societies*. Harvard Univ. Press, Cambridge .
- DUFFY J., EMMETT C., MORRISON L., RIOS R., 2000 – *Multiple origins of eusociality among sponge-dwelling sbrimps (Synalpheus)*. – Evolution, 54 (2): 503–516.
- EDGERLY J.S., 1997 – *Life beneath silk walls: a review of the primitively social Embiidina*. In: The Evolution of Social Behavior in Insects and Arachnids. (Choe, JC & Crespi, BJ, eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 14-25.
- GARDNER A., GRAFEN A., 2009 – *Capturing the superorganism: a formal theory of group adaptation*. - Journal of Evolutionary Biology, 22: 659–671.
- HAMILTON W.D., 1964 – *The Genetical Evolution of Social Behaviour II*. - Journal of Theoretical Biology, 7 (1): 17-52.
- INWARD D., BECCALONI G., EGGLETON P., 2007 – *Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches*. - Biol. Lett., 3: 331-335.
- JARVIS J., 1981 – *Eusociality in a Mammal: Cooperative Breeding in Naked Mole-Rat Colonies*. - Science, 212 (4494): 571-573.
- KLAS K.D., NALEPA C., LO N., 2008 – *Wood-feeding cockroaches as models for termite evolution (Insecta: Dictyoptera): Cryptocercus vs. Parasphaeria boleiriana*. - Mol Phylogenet Evol., 46(3): 809-817.
- KORB J., BUSCHMANN M., SCHAFBERG S., LIEBIG J., BAGNÈRES A.G., 2012 – *Brood care and social evolution in termites*. - Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 279 (1738): 2662-2671.
- LEHMANN L., KELLER L., WEST S., ROZE D., 2007 – *Group selection and kin selection: Two concepts but one process*. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104: 6736-6739.
- MICHENER C.D., 1969 – *Comparative social behavior of bees*. - Annu. Rev. Entomol., 14: 299-342.
- NALEPA C.A., BIGNELL D.E., BANDI C., 2001 – *Detritivory, coprophagy, and the evolution of digestive mutualisms in Dictyoptera*. - Insectes Sociaux, 48:194–201.
- NALEPA C.A., 2011 – *Altricial development in wood-feeding cockroaches: the key antecedent to termite eusociality*. In: Biology of termites: a modern synthesis (Eds. Bignell D.E., Roisin Y., Lo N.); Heidelberg, Germany, Springer, pp.69–96.
- NOWAK M., TARNITA E., WILSON E.O., 2010 – *The evolution of eusociality*. - Nature, 466: 1057-1062.
- O'RIAIN M.J., FAULKES C.G., 2008 – *African mole rats: eusociality, relatedness and ecological constraints*. In: J. Korb and J. Heinze (Eds.), Ecology of Social Evolution, pp: 207-223.
- OHKUMA M., NODA S., HONGOY Y., NALEPA, C.A., INOUE T., 2009 – *Inheritance and diversification of symbiotic trichonymphid flagellates from a common ancestor of termites and the cockroach Cryptocercus*. - Proc. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci., 276: 239-245.
- QUELLER D.C., STRASSMANN J.E., 2009 – *Beyond society: the evolution of organismality*. - Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 364: 3143-3155.
- WILSON E.O., 1971 – *The insect societies*. Harvard Univ. Press, Cambridge.



## DALLE CONOSCENZE DI BASE AGLI STUDI APPLICATIVI: I PLECOTTERI COME PARADIGMA

ROMOLO FOCHETTI (\*)

(\*) Dipartimento per la Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università della Tuscia. Largo Università snc 01100 - Viterbo; fochetti@unitus.it

Lettura tenuta durante la Giornata culturale su "Contributo alla conoscenza dei Plecotteri basali. Struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base e applicativi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 11 ottobre 2013.

### *From basic knowledge to applied studies: stoneflies as a paradigm*

Data on Plecoptera diversity, systematics and phylogeny are reported and briefly discussed. Approximately 3,500 species have been described so far in the world. The total number of species has enormously increased in the last 30 years. The order is divided into the suborders Arctoperlaria (3,179 species) and Antarctoperlaria (318 species), and includes 16 families: 12 arctoperlarian and 4 antarctoperlarian. The total number of genera is 286. The estimated number of species for each family, for each continent and zoogeographical region is also given. Remarks on the presence and distribution of hemocyanin across the order are also expressed and hypotheses on the functional significance and role of this protein in the Plecoptera are reported. Finally, data on the conservation status of the Italian stonefly-fauna and threats on plecopteracoenoses are presented and discussed as well.

KEY WORDS: Stoneflies diversity, phylogeny, conservation

I Plecotteri sono un piccolo ordine di insetti emimetaboli presente in tutti i continenti eccetto l'Antartide. Essi costituiscono una componente ecologica fondamentale degli ecosistemi delle acque correnti; le richieste ambientali limitano molto le capacità di dispersione delle ninfe e, considerato che gli adulti mostrano una ridotta capacità di volo, questi insetti presentano una elevata tendenza ad endemizzare. L'ordine conta a tutt'oggi circa 3500 specie descritte (FOCHETTI e TIerno DE FIGUEROA, 2008a). Il numero totale di specie è cresciuto enormemente negli ultimi 30 anni (nel 1976 la stima era di circa 2000 specie) e, se l'andamento sarà confermato, potrebbe raddoppiare in un futuro prossimo, considerando la mancanza di conoscenze relative ad aree molto vaste, ad esempio nel continente asiatico, che solo oggi si cominciano a studiare. L'ordine è attualmente diviso nei sott'ordini Arctoperlaria e Antarctoperlaria (figura 1) e include 16 famiglie: 12 appartenenti agli arctoperlari e 4 agli antarctoperlari. Gli Arctoperlaria comprendono un totale di 3179 specie, mentre gli Antarctoperlaria solamente 318 specie. Il numero totale di generi è 286.

I Perlidae sono la famiglia più diversificata, con più di 1000 specie descritte. Dall'ultima stima (ZWICK, 1980) il numero di specie di Perlidae è raddoppiato, grazie al miglioramento delle conoscenze faunistiche sulle faune asiatiche e, soprat-

tutto, alle migliori conoscenze sui generi tropicali *Neoperla* e *Anacroneuria*. I Nemouridae contano 635 specie a distribuzione olartica con alcuni generi che raggiungono la regione Orientale. I Notonemouridae (121 sp.) sono considerati il sister group dei Nemouridae, però mostrano una distribuzione disgiunta nel Sud dell'Africa (incluso il Madagascar), Sudamerica, Australia e Nuova Zelanda. Questa famiglia potrebbe non essere monofiletica e le ragioni della sua distribuzione geografica non sono ancora completamente chiarite (ZWICK, 2000). Tra gli Antarctoperlaria, i Gripopterygidae sono la famiglia più diversificata (277 specie). Essi mostrano una distribuzione disgiunta tra Sudamerica e Australia/Nuova Zelanda, sebbene nessun genere sia comune a entrambi i continenti. Le restanti famiglie di Antarctoperlaria sono scarsamente diversificate. La distribuzione delle famiglie di Plecotteri è visibile in figura 2.

La biodiversità riguardante i plecoteri è relativamente ben conosciuta in Nord America (650 specie riportate) ed Europa (426 specie). Ciononostante, negli ultimi 25 anni è stata descritta una media di 2,6 specie per anno in Europa. Le plecoterofaune di Australia (191 specie, Tasmania inclusa) e Nuova Zelanda (104 specie) sono abbastanza note, mentre la nostra conoscenza delle faune a Plecotteri dell'America centrale e meridionale (95 e 378 specie rispettivamente) è ancora scarsa e non

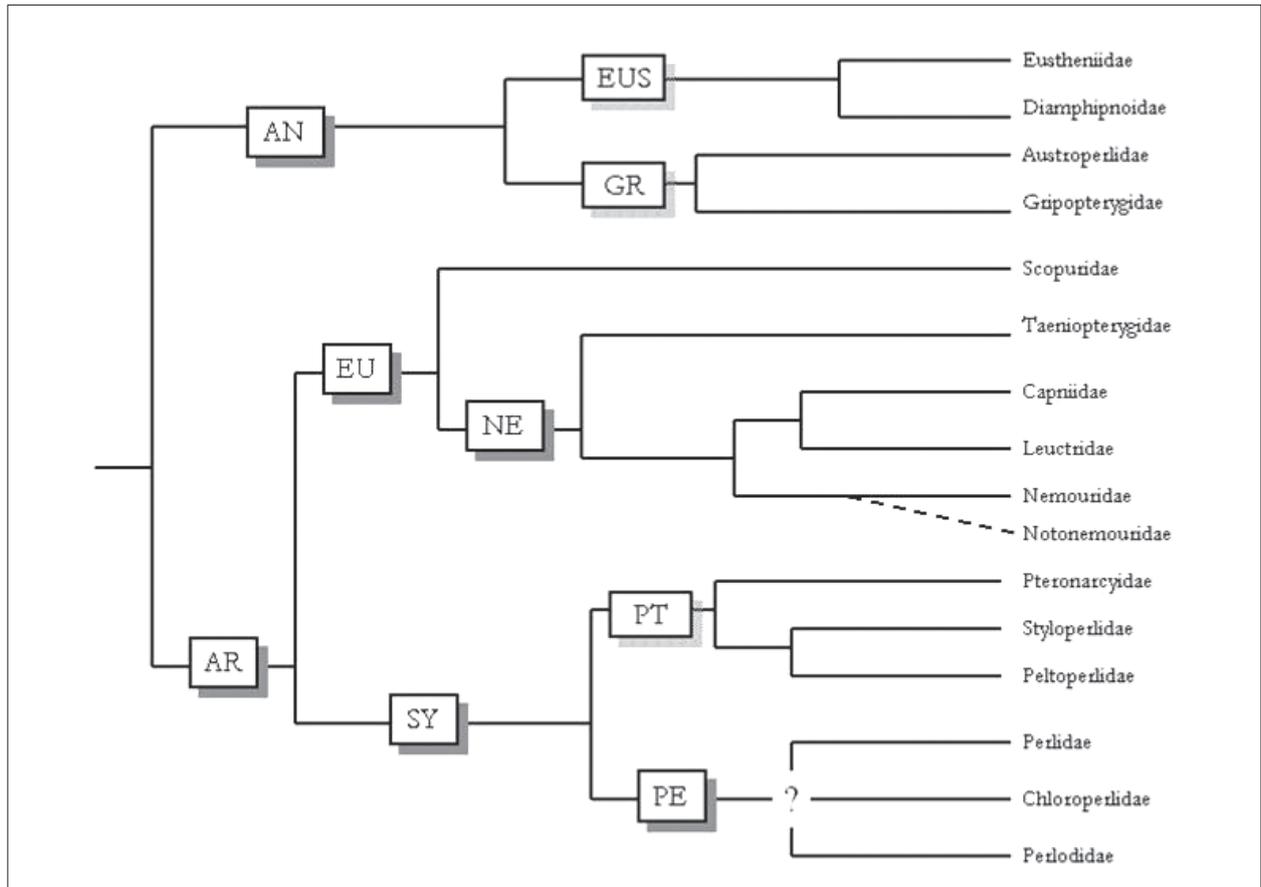


Fig. 1

Albero filogenetico dei Plecotteri. AN: Antarctoperlaria; AR: Arctoperlaria; EUS: Eusthenioidea; GR: Gripopterygoidea; EU: Euholognatha; NE: Nemouroidea; SY: Systelognatha; PT: Pteronarcyzoidea; PE: Perloidea. (ridisegnato da Zwick, 1990).

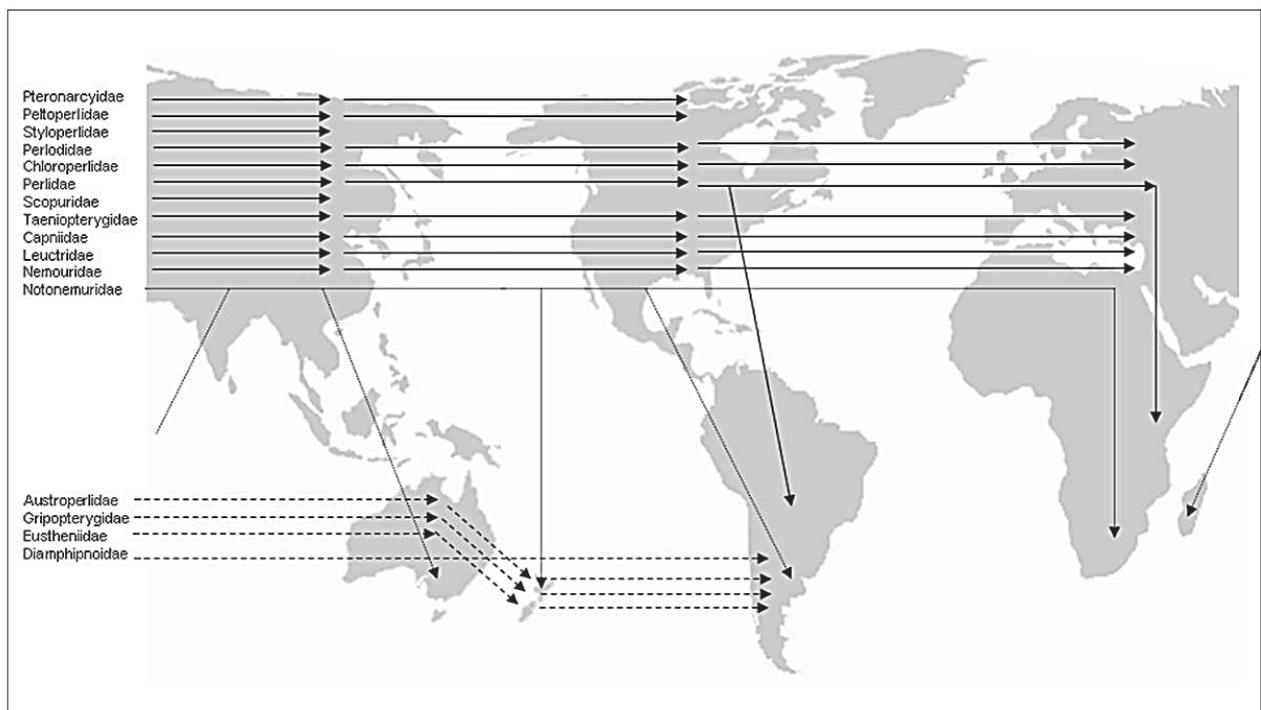


Fig. 2

Distribuzione delle famiglie di Plecotteri; Arctoperlaria = linea continua; Antarctoperlaria = linea punteggiata (modificato da Zwick, 1990).

rappresentativa della reale biodiversità di queste aree. L’Africa presenta una fauna a plecoteri molto ridotta (126 specie). La diversità relativa ai plecoteri asiatici (1527 specie) è molto maggiore di quella europea e nord-americana, malgrado le nostre conoscenze relativamente alle aree asiatiche siano ridotte, con l’eccezione del Giappone e della Russia asiatica, che sono state ben studiate (FOCHETTI e TIERNO DE FIGUEROA, 2008a) (figura 3).

La diversità divisa in regioni zoogeografiche può

essere solo grossolanamente stimata: la regione Neartica conterebbe 650 specie, la Palearctica 1628 specie (includere arbitrariamente le specie della Cina meridionale) (Olartica 2278 specie), la Neotropicale 474, l’Afrotropicale 95 specie, l’Orientale 350? specie (le specie della Cina meridionale non sono incluse), l’Australiana 295 specie (figura 4). Anche se i nostri dati sembrano indicare la regione Olartica come area “hot spot” per l’ordine, l’analisi di dettaglio della diversità specifica suddivisa in

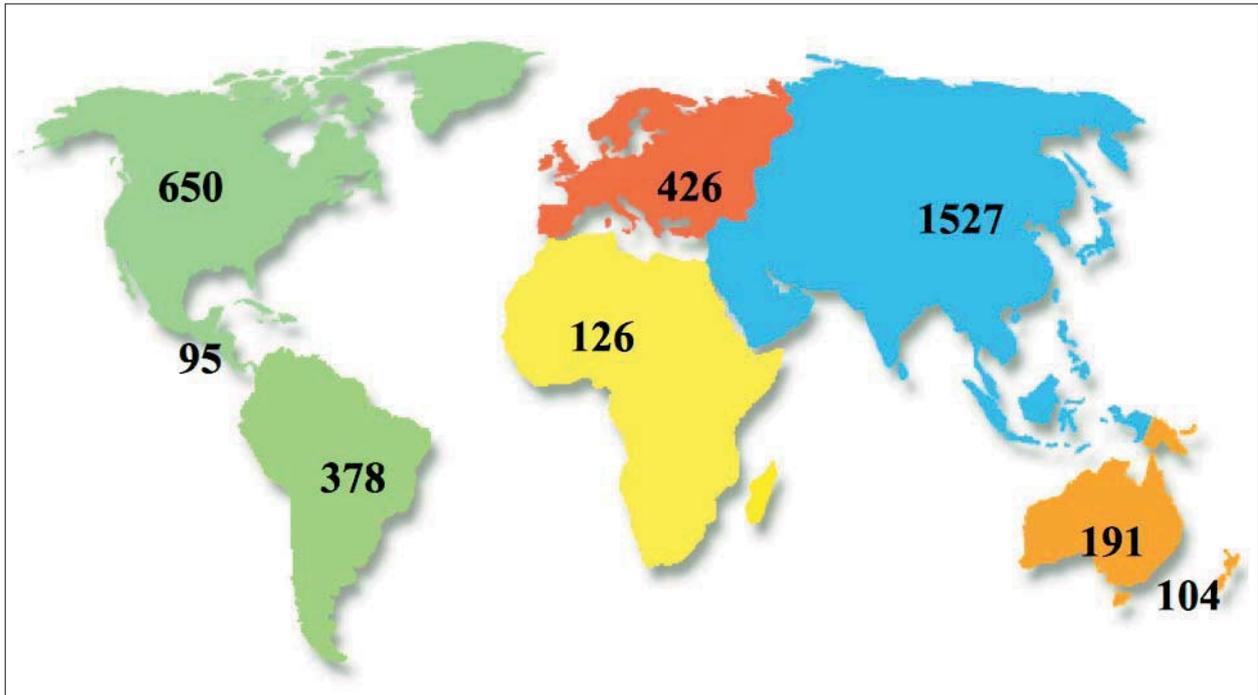


Fig. 3  
Distribuzione del numero di specie di Plecoteri nei continenti.

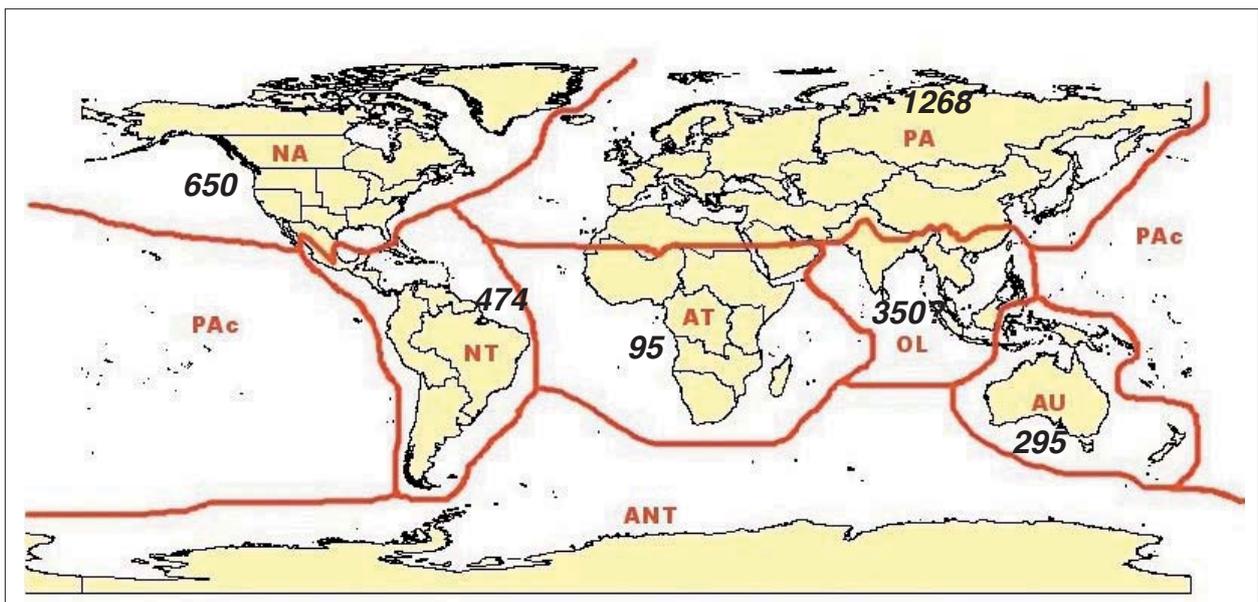


Fig. 4  
Distribuzione del numero di specie di Plecoteri nelle regioni zoogeografiche. PA: Palearctica; NA: Neartica; NT: Neotropicale; AT: Afrotropicale; OL: Orientale; AU: Australiana.

famiglie suggerisce un ruolo importante dei plecoteri tropicali (FOCHETTI e TIerno DE FIGUEROA, 2008a).

Poche specie sono divise tra due regioni zoogeografiche (principalmente tra le regioni Nearctica e Palearctica e tra Palearctica e Orientale o tra continenti (tra il nord Africa ed il sud Europa e al confine tra Europa ed Asia). Le zone aride impediscono la migrazione di plecoteri tra nord, centro e sud America e tra la regione Palearctica e quella Afrotropicale (Etiopica).

Da un punto di vista filogenetico i Plecotteri sono un ordine di insetti molto interessante; essi sono considerati un gruppo chiave per ricostruire la storia evolutiva degli insetti. Molti caratteri morfologici dei Plecotteri sono così primitivi da aver fatto ipotizzare in passato che essi fossero il *sister-group* del resto dei Neotteri. In realtà oggi questa ipotesi sembra non essere supportata dai dati. Le analisi più recenti, basate su dati morfologici, molecolari o su trascrittomi arrivano a conclusioni contrastanti, imparentando ad esempio di volta in volta i Plecotteri con gli Embiotteri (WHEELER *et al.*, 2001), con Dermatteri e Zoratteri (TERRY e WHITING, 2005) o con i soli Dermatteri (SIMON *et al.*, 2012). Si può quindi concludere che non è possibile attualmente stabilire con certezza la loro posizione filogenetica e le relazioni con gli altri ordini di insetti esistenti.

In passato è stata utilizzata la spermatologia comparata per inferire in merito alla sistematica e filogenesi dei Plecotteri (BACCETTI, 1979; 1996). La morfologia degli spermatozoi viene ritenuta un buon descrittore in lavori di ricostruzione filogenetica in virtù del fatto che essi sono poco influenzati da fattori ambientali. Sulla base dell'analisi del modello spermatico di una specie (*Nemoura cinerea* Retzius), BACCETTI (1987) aveva proposto una relazione di *sister group* con gli Embiotteri. Lo studio di un numero di specie molto più ampio ha invece suggerito una certa eterogeneità della struttura spermatica all'interno dell'ordine. Gli spermatozoi di tutte le specie studiate (12 specie appartenenti alle 7 famiglie europee dell'ordine) sono filiformi e caratterizzati da un assonema con pattern 9+9+2 e da due derivati mitocondriali. Essi mostrano però pattern diversificati, suggerendo per grandi linee un modello di "famiglia" con caratteri specifici in ogni specie (FAUSTO *et al.*, 2001; 2002). Inoltre, sulla base di questi dati, non è possibile supportare la proposta di stretta affinità con gli Embiotteri, basata sull'osservazione di un singolo modello spermatico. In figura 5 si può osservare uno schema di riassunto delle morfologie spermatiche nelle famiglie europee analizzate

I dati più interessanti riguardo la biologia dei

Plecoteri negli ultimi anni si sono avuti sicuramente dalle ricerche che hanno riguardato la verifica della presenza, della distribuzione e l'analisi della funzionalità dell'emocianina in questo ordine. Infatti, in contrasto con quanto generalmente accettato in passato, cioè che disponendo gli insetti di un efficiente sistema tracheale per gli scambi gassosi, non avessero proteine respiratorie nell'emolinfa (tranne alcune eccezioni), è stata recentemente scoperta emocianina in due specie di Plecotteri (HAGNER-HOLLER *et al.*, 2004; FOCHETTI *et al.*, 2006) sia nelle ninfe che negli adulti. Per una di esse, *Perla marginata*, è stata anche descritta la capacità, in vitro, di legare ossigeno attraverso il metodo fluorometrico polarografico (HAGNER-HOLLER *et al.*, 2004). Studi seguenti hanno accertato la presenza di emocianina in numerosi ordini di insetti, considerando il dato ottenuto per poche (spesso una) specie saggiate, estendibile all'intero ordine di appartenenza (BURMESTER e HANKELN, 2007; PICK *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda i Plecotteri sono stati condotti negli ultimi anni ulteriori ricerche sulle ninfe (FOCHETTI *et al.*, 2006; AMORE *et al.*, 2009; AMORE e FOCHETTI, 2009), con lo scopo di approfondire la conoscenza sulla distribuzione e sulle caratteristiche chimico-fisiche dell'emocianina di questo ordine. Finora sono state studiate in totale 33 specie: 25 appartengono alle sette famiglie europee note, 5 specie appartengono a Perlidae orientali, 1 specie a Peltoperlidae orientali e 2 specie a Notonemouridae sudafricani. Sono state analizzate le varie fasi del ciclo vitale (larve, ninfe, adulti) in diverse condizioni ecologiche (fiumi perenni, corsi d'acqua temporanei, fiumi tropicali, ruscelli di alta montagna, laghi). Secondo i nostri dati non tutte le specie di Plecotteri hanno sequenze di mRNA emocianina. L'emocianina è risultata presente in alcune specie del solo sottordine dei Perloidea, mentre non è stata mai trovata nel sottordine dei Nemouroidea, dimostrando, in questo modo, che è incauto estendere il risultato ottenuto su singole specie all'intero ordine. Sono state prese in considerazione e saggiate sperimentalmente alcune ipotesi per spiegare questa presenza differenziale, ipotesi che fanno riferimento alle dimensioni degli individui ed alla durata del ciclo vitale, a fattori ambientali e al ruolo trofico (AMORE *et al.*, 2009). Le ninfe appartenenti ai Perlidae (Perloidea) e, in minor misura, ai Perlodidae (Perloidea), hanno dimensioni considerevoli e, tra l'altro, sono molto sensibili al livello di ossigeno disciolto nelle acque correnti in cui vivono (ZWICK, 2000), mentre le ninfe appartenenti a Taeniopterygidae, Nemouridae, Leuctridae (Nemouroidea) e Chloperlidae (Perloidea), sono molto più piccole

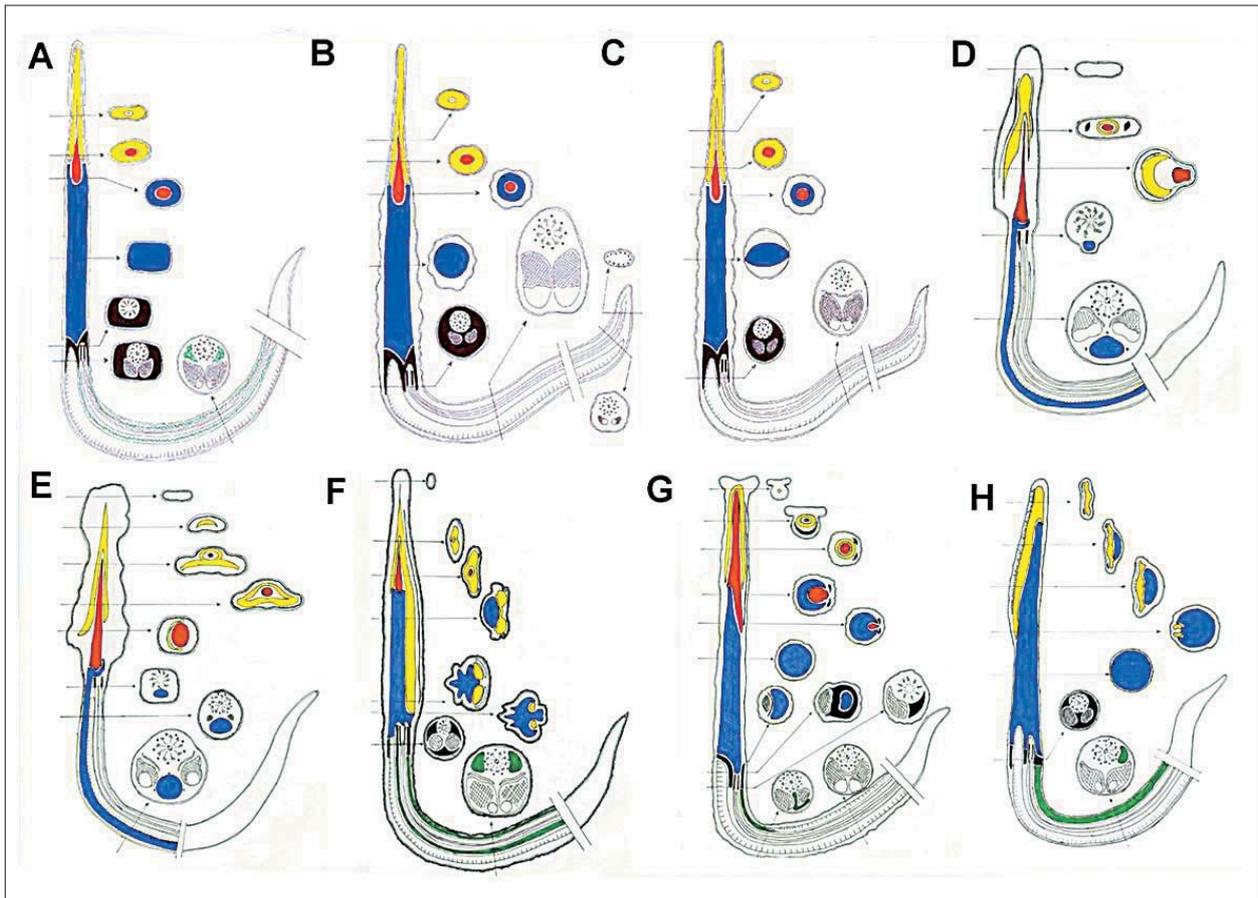


Fig. 5

Schema degli spermatozoi di *Dinocras cephalotes* (A), *Siphonoperla torrentium* (B), *Isoperla grammatica* (C); *Taeniopteryx stankovitshi* (D), *Brachyptera risi* (E), *Leuctra fusca* (F), *Capnia bifrons* (G), *Protonemura intricata* (H).

delle precedenti e il sistema tracheale e le branchie, quando presenti, potrebbero essere sufficienti a fornire i livelli di ossigeno richiesti. Inoltre, le specie di piccole dimensioni completano il ciclo in un solo anno (univoltine), invece, quelle di grandi dimensioni necessitano di più anni (semivoltine); queste ultime, quindi, hanno più probabilità di sperimentare condizioni ipossiche rispetto alle prime, fatto che può determinare la necessità di una proteina respiratoria. La terza ipotesi formulata considera il ruolo trofico: Perlidae e Perlodidae sono predatori, quindi hanno una richiesta metabolica maggiore dei Nemouroidea, che sono fitofagi o detritivori. Fino a questo momento però, nessuna delle ipotesi avanzate riesce a spiegare pienamente il quadro differenziato che si è evidenziato all'interno dell'ordine. I soli risultati certi riassumibili (AMORE *et al.*, 2010; 2011) sono che

1. non in tutte le ninfe delle specie analizzate è presente mRNA;
2. presente emocianina solo in due specie di adulti (anche se risulta presente nelle ninfe delle medesime specie);
3. l'emocianina è espressa se c'è mRNA.

Sono stati presi in considerazione anche gli aspetti funzionali dell'emocianina: essa potrebbe essere coinvolta in altre funzioni, ad esempio quella fenolossidasi, come nei Chelicerata (DECKER e RIMBKE, 1998, DECKER e TUCZEK, 2000) o di sorgente di peptidi antimicrobici, come in *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (Crustacea: Decapoda) (LEE *et al.*, 2002). In futuro vorremmo testare l'ipotesi che l'emocianina non sia solo una semplice proteina respiratoria, ma una proteina multifunzionale. HAGNER-HOLLER *et al.* (2004) hanno dimostrato, in vitro, che l'emocianina lega ossigeno, ma non che la sua funzione sia effettivamente solo respiratoria. L'idea di fondo sulla quale stiamo lavorando è che l'emocianina possa essere coinvolta in una pluralità di processi e che quindi non sia soltanto una proteina respiratoria ma una proteina multifunzione, anche quando si dimostra la sua capacità di legare ossigeno.

Da un punto di vista sistematico l'analisi e il confronto delle sequenze di emocianina relative alle specie studiate hanno evidenziato che le due subunità in cui si divide la proteina nei plecoteri (hc1 e hc2) hanno storie evolutive diverse e che le esa-

merine (hx), proteine multifunzione strettamente affini all'emocianina presenti in quasi tutte le specie saggiate, si siano probabilmente originate dalla subunità hc2. Le sequenze della parte conservata della proteina sembrano inoltre comportarsi come un buon marcatore di filogenesi. Infatti le ricostruzioni filogenetiche finora ottenute dal confronto delle sequenze ottenute, anche partendo da assunti diversi (distanza, parsimonia, maximum likelihood), forniscono alberi filogenetici molto robusti e supportati statisticamente, con topologie praticamente sovrapponibili e sostanzialmente in accordo con le tradizionali ricostruzioni filogenetiche, basate su un numero molto più grande di caratteri.

Si può sottolineare infine come i Plecotteri siano un gruppo di insetti con esigenze ambientali specifiche, per cui risultano altamente sensibili all'inquinamento e sono per questo abitualmente utilizzati come indicatori di buona qualità delle acque. La rarefazione che si è prodotta nelle popolazioni di molte specie dell'ordine è dovuta fondamentalmente alla distruzione dei loro habitat sia a causa dell'inquinamento che per altre minacce prevalentemente di natura antropica. L'influenza delle attività umane è particolarmente intensa nei tratti medi e bassi dei corsi d'acqua, dove si concentra in maggior parte la popolazione, i complessi industriali e l'agricoltura. A questi processi contaminanti si aggiungono le alterazioni fisiche provocate da escavazioni in alveo e fuori alveo, e a lavori che interessino direttamente o indirettamente le acque correnti (dighe, briglie, costruzione di strade, diversioni ecc.).

La maggior parte della plecotterofauna italiana sopravvive in sistemi montuosi di media o alta quota associati a sorgenti o ai tratti sorgivi dei corsi d'acqua. L'attuale situazione di rischio dei Plecotteri in Italia comincia ora ad essere nota, e molte specie sono state incluse in categorie a rischio riguardo il loro stato di conservazione. Essa può essere così riassunta:

- si sono estinte con certezza nel nostro paese negli ultimi 50 anni 5 specie, comunque a più vasta distribuzione in Europa;
- esiste un rischio di estinzione di interesse plecotteroceno: l'intero tratto potamale dei fiumi è gravemente minacciato e ben 22 specie delle 160 presenti in Italia sono da considerarsi minacciate di estinzione (FOCHETTI e TIERNO DE FIGUEROA, 2008b);
- molte specie endemiche della nostra regione sono note solo di due o tre popolazioni. In particolare 12 specie sono note della sola località tipica;
- Le popolazioni relitte e isolate di specie una volta ampiamente distribuite sono particolarmente vulnerabili;

- molte specie a più ampia distribuzione in Europa sono note in Italia di pochissime popolazioni (spesso una solamente).

In generale si assiste ad un forte impoverimento e ad una banalizzazione delle plecotterocenosi di quasi tutti i corsi d'acqua per i quali sia possibile un confronto con dati pregressi. Un esempio viene da alcuni corsi d'acqua dell'Italia centrale appenninica e antiappenninica, studiati in passato da Consiglio (1955/1980), dove le specie di Plecotteri sono state praticamente decimate se non azzerate nei tratti soggetti ad influenza antropica (fiumi: Aniene, Mignone, Tevere, Sangro ecc.). Di contro c'è da sottolineare che non sono presenti Plecotteri nelle liste degli animali protetti in diversa misura nelle varie direttive e leggi italiane ed europee.

#### RIASSUNTO

Sono riportati e discussi dati riguardanti la biodiversità la sistematica e la filogenesi dei Plecotteri. Sono state descritte a tutt'oggi circa 3500 specie appartenenti a questo ordine: il numero totale di specie è cresciuto enormemente negli ultimi 30 anni. L'ordine è attualmente diviso nei sott'ordini Arctoperlaria (3179 specie) e Antarctoperlaria (318 specie) e include 16 famiglie: 12 di arctoperlari e 4 di antarctoperlari. Il numero totale di generi descritti è 286. Viene inoltre fornito nel presente lavoro il numero stimato di specie per ogni famiglia e la distribuzione in numero di specie nei continenti e nelle regioni zoogeografiche.

Vengono inoltre espresse considerazioni sulla presenza differenziale di emocianina nelle ninfe e negli adulti e sono riportate alcune ipotesi in merito alla funzionalità di questo pigmento respiratorio. Sono infine riportate considerazioni sulla rarefazione delle plecotterocenosi e sull'estinzione di specie in Italia.

#### BIBLIOGRAFIA

- AMORE V., FOCHETTI R., 2009 – *Present knowledge on the presence of hemocyanin in stoneflies (Insecta: Plecoptera)*. Aquatic Insects 31 (1): 577-583.
- AMORE V., BELARDINELLI M., GUERRA L., BUONOCORE F., FAUSTO A.M., UBERO-PASCAL N., FOCHETTI R., 2009 – *Do all stoneflies nymphs have respiratory proteins? Further data on the presence of hemocyanin in the larval stages of Plecoptera species*. - Insect Molecular Biology, 18 (2): 203-211.
- AMORE V., PUIG GARCIA M.A., TIMPERIO A.M., EGIDI G., UBERO-PASCAL N., FOCHETTI R., 2010 – *Preliminary data on comparative proteomic analysis of hemocyanins in the stoneflies: Dinocras cephalotes and Perla marginata (Plecoptera)*. - Environmental Entomology, 40 (1): 167-171 (2011).
- AMORE V., GAETANI B., PUIG GARCIA M.A., FOCHETTI R., 2011 – *New data on the presence of hemocyanin in Plecoptera: recomposing a puzzle*. - Journal Insects Science, 11 (153): 1-20.

- BACCETTI B., 1979 – *Ultrastructure of sperm and its bearing on Arthropod phylogeny*. In: Gupta, A.P. (Ed), *Arthropod phylogeny*, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 609-644.
- BACCETTI B., 1987 – *Spermatozoa and phylogeny in orthopteroid insects*. In: Baccetti B. (Ed), *Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects*. Ellis Horwood, Chichester, pp. 12-112.
- BACCETTI B., 1996 – *Comparative spermatology in Insect taxonomy and phylogeny*. Proceedings of XX International Congress of Entomology, Firenze, August 25-31.
- BURMESTER T., HANKELN T., 2007 – *The respiratory proteins of insects*. Review. - *Journal Insect Physiology* 53: 285-94.
- DECKER H., RIMKE T., 1998 – *Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity*. - *Journal Biological Chemistry* 273: 25889-92.
- DECKER H., TUCZEK F., 2000 – *Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism*. - *Trends Biochemical Sciences* 25: 392-397.
- FAUSTO A. M., BELARDINELLI M., FOCHETTI R., MAZZINI M., 2001 – *Comparative spermatology in Plecoptera: an ultrastructural investigation in four species*. - *Arthropod structure and Development*, 30 (1): 55-62.
- FAUSTO A.M., BELARDINELLI M., FOCHETTI R., TIERNO DE FIGUEROA J.M, MAZZINI M., 2002 – *Comparative spermatology in Plecoptera. II. An ultrastructural investigation on four species of Systellognatha*. - *Arthropod structure and Development*, 31: 147-156.
- FOCHETTI R., BELARDINELLI M., GUERRA L., BUONOCORE F., FAUSTO A.M., CAPORALE C., 2006 – *Cloning and structural analysis of a haemocyanin from the stonefly Perla grandis*. - *The Protein Journal* 25 (7-8): 443-454.
- FOCHETTI R., TIERNO DE FIGUEROA J.M., 2008a – *Global diversity of stoneflies in freshwater*. In: Balian E., Lévêque C., Segers H. & Martens K., (Coord.), *Freshwater Animal Diversity Assessment*. Hydrobiologia, 595: 365-377.
- FOCHETTI R., TIERNO DE FIGUEROA J.M., 2008B – *Plecoptera*. Fauna d'Italia (XLIII). Calderini Ed agricole. 339 pp. ISBN: 9788850653072
- HAGNER-HOLLER S., SCHOEN S., ERKER A., MARDEN W., RUPPRECHT J.H., DECKER H., BURMESTER T., 2004 – *A respiratory haemocyanin from an insect*. - *Proceeding National Academy. Sciences*, 101 (3): 871-874.
- LEE S.Y., LEE B.L., SÖDERHÄLL S., 2003 – *Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish Pacifastacus leniusculus*. - *Journal Biological Chemistry* 278: 7927-7933.
- PICK C., SCHNEUER M., BURMESTER T., 2009 – *The occurrence of hemocyanin in Hexapoda*. - *FEBS Journal* 276: 1930-1941
- SIMON S., NARECHANIA A., DESALLE R., HADRY S., 2012 – *Insect phylogenomics: exploring the source of incongruence using new transcriptomic data*. *Genome Biology Evolution* 4(12): 1295-1309.
- MATTHEW D.T., WHITING M.F., 2005 – *Mantophasmatodea and phylogeny of the lower Neopterous insects*. - *Cladistics*, 3: 240-257.
- WHEELER W.C., WHITING M.F., WHEELER Q.D., CARPENTER J.M., 2001 – *The Phylogeny of the Extant Hexapod Orders*. *Cladistics* 17, 113-169 (2001)
- ZWICK P., 1980 – *Plecoptera* (Steinfliegen). In: *Handbuch der Zoologie* 26. Walter de Gruyter. Berlin: 1-115.
- ZWICK P., 1990 – *Transantarctic Relationships in the Plecoptera*. In: Campbell I.C. (ed.), *Mayflies and Stoneflies: Life Histories and Biology*; Proc. 5th Internat. Ephemeroptera Conference and 9th Internat. Plecoptera Conference. Kluwer Academic Publishers, pp. 141-148.
- ZWICK P., 2000 – *Phylogenetic System and Zoogeography of the Plecoptera*. - *Annual Review of Entomology*, 45: 709-746.



## BIOLOGY OF ITALIAN TERMITES (BLATTODEA, TERMITOIDAE): NATIVE AND INVASIVE SPECIES

ANDREA LUCHETTI (\*) - BARBARA MANTOVANI (\*)

(\*) Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Via Selmi 3, 40126, Bologna, Italia; barbara.mantovani@unibo.it  
Lettura tenuta durante la Giornata culturale su "Contributo alla conoscenza dei Polineotteri basali. Struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base e applicativi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 11 ottobre 2013.

### *Biology of Italian termites (Blattodea, Termitoidae): native and invasive species*

Termites are diplo-diploid, eusocial insects that efficiently degrade wood matter. Therefore, they are essential in terrestrial ecosystems, but they may also provoke damages to wooden structures (estimated up to 1 million € in EU). European termites are represented by the genera *Kaloterмес* (Kalotermitidae) and *Reticulitermes* (Rhinotermitidae): they show overlapping distribution but a significantly different number of species/subspecies, *Reticulitermes* exhibiting the higher biodiversity and species with high invasive potential. In fact, two major invasions took place in Europe leading to a wide, present-day distribution of two *Reticulitermes* alien species in France and in Italy. The two genera further show widely different life history traits such as nesting and feeding behaviour, castes development pathways and reproductive caste differentiation. This has a strong impact on colony structures and breeding systems; as a consequence, colony family types may vary largely, *Kaloterмес* being more prone to colony fusion than *Reticulitermes*. On the other hand, some *Reticulitermes* species show instance of parthenogenesis, but only for the production of secondary queens: this perpetuates the primary queen genotype in the following mating with the primary king (Asexual Queen Succession). The evolutionary biology and the ecological factors linked to *Kaloterмес* frequent colony fusions and the *Reticulitermes* parthenogenetic system are discussed.

KEY WORDS: colony breeding system; castes development; family types; parthenogenesis; social insects.

### INTRODUCTION

Termites are wood-feeding, diplo-diploid eusocial insects. They are essential components of soil communities in terrestrial ecosystems, where they produce positive effects on soil structure and productivity because of their ability to efficiently degrade the wood matter. They are, therefore, of great interest for their peculiar ecological role and biological traits, which have also led to peculiar evolutionary histories.

In Europe, termites are mainly distributed along the Atlantic and Northern Mediterranean coasts - from the Iberian to Anatolian peninsula - and are here represented by the more primitive *Kaloterмес* genus (family: Kalotermitidae) and the more derived *Reticulitermes* one (family: Rhinotermitidae). Albeit the overlapping and comparable distribution, the number of the respective taxonomic entities (i.e., species or subspecies) is significantly different.

The genus *Kaloterмес* is, in fact, mainly present with the species *Kaloterмес flavicollis*, distributed from the Aegean region through Dalmatian coasts up to the Thyrrenian shores of Italy. The numerous populations collected all through its

range resulted genetically quite uniform; the taxon has been indicated, therefore, as *K. flavicollis sensu stricto*. Westernmost, two genetic lineages closely related to *K. flavicollis s.s.* can be found: a Sardo-Corsican form, occurring in Sardinia and Corse, and a French lineage retrieved in Southern France (VELONÀ *et al.*, 2011 and reference therein; Fig. 1A). Their level of genetic differentiation suggests, at most, a subspecific rank of divergence. Finally, a new species has been described very recently, *K. italicus*, until now collected only along the Tuscan coast and on Monte Conero shores (GHESINI & MARINI, 2013; LUCHETTI *et al.*, 2013a; Fig. 1A).

On the other hand, the genus *Reticulitermes* comprises at least 12 taxa of specific/subspecific rank (MARINI AND MANTOVANI, 2002; KUTNIK *et al.*, 2004; LUCHETTI *et al.*, 2004a,b, 2007; LEFEBVRE *et al.*, 2008; VELONÀ *et al.*, 2010; GHESINI and MARINI, 2012). As an example of its greater diversity, in Italy the endemic species *R. lucifugus* is differentiated in three subspecies: the mainland *R. lucifugus lucifugus*, the Sardo-Corsican *R. lucifugus corsicus* and the Sicilian *R. lucifugus* subsp. (LUCHETTI *et al.*, 2013b and reference therein; Fig. 1B). Moreover, at least two invasive

*Reticulitermes* species further occur in Italy: the eastern taxon *R. urbis*, presently established in Apulia and Romagnan coasts, and *R. flavipes*, occasionally collected in the surrounding of Milan (GHESINI *et al* 2010, 2011; Fig. 1B).

A possible explanation of the different levels of biodiversity in the two genera may involve the colonization history. *Reticulitermes* ancestors might have colonized Europe before *Kalotermes* ones and thus they may have been influenced for a longer time by the paleogeographical and paleoclimatic events that have characterized the region's history. This would have generated the higher genetic variation presently observed.

On the other hand, the different ecological features of these termites give a further possible explanation. *Kalotermes* colonies settle in dead trees, allowing colonies to be passively transported more easily than *Reticulitermes* ones, these being, actually, ipogeous nests (hence the name of "subterranean termites"). This remarkable difference in nest construction and the higher mobility of entire colonies of *Kalotermes* may have allowed a higher gene flow between the populations of the latter, possibly causing the higher genetic homogeneity presently observed.

Obviously, the two hypotheses are not mutually

exclusive: actually, their combination could represent the best one (LUCHETTI *et al.*, 2004a,b; VELONÀ *et al.*, 2010, 2011).

#### INVASIVE SPECIES IN ITALY

Beside their unique ecological role, fundamentally beneficial for soil productivity, termites can be a serious pest for human-made wooden structures: the annual damage due to termite activity on these artefacts is estimated around 1 million € in the EU countries and around 3-5 billion US\$ in the USA (JEFFERY *et al.*, 2010).

*Reticulitermes* termites belong to the family Rhinotermitidae that comprises most of the invasive termite species including *Coptotermes formosanus*, listed among the top 100 worst invasive taxa (VARGO & HUSSENER, 2009; LOWE *et al.*, 2010; EVANS, 2011).

Based on present knowledge, the only two significant invasive termite species in Italy are the North American *R. flavipes* and the Balkanian *R. urbis* (Fig. 1B).

*R. flavipes* is presently widespread across Europe, its invasion probably dating back to the 17<sup>th</sup> - 18<sup>th</sup> century in the French Santonge region, passively transported along the wood commercial

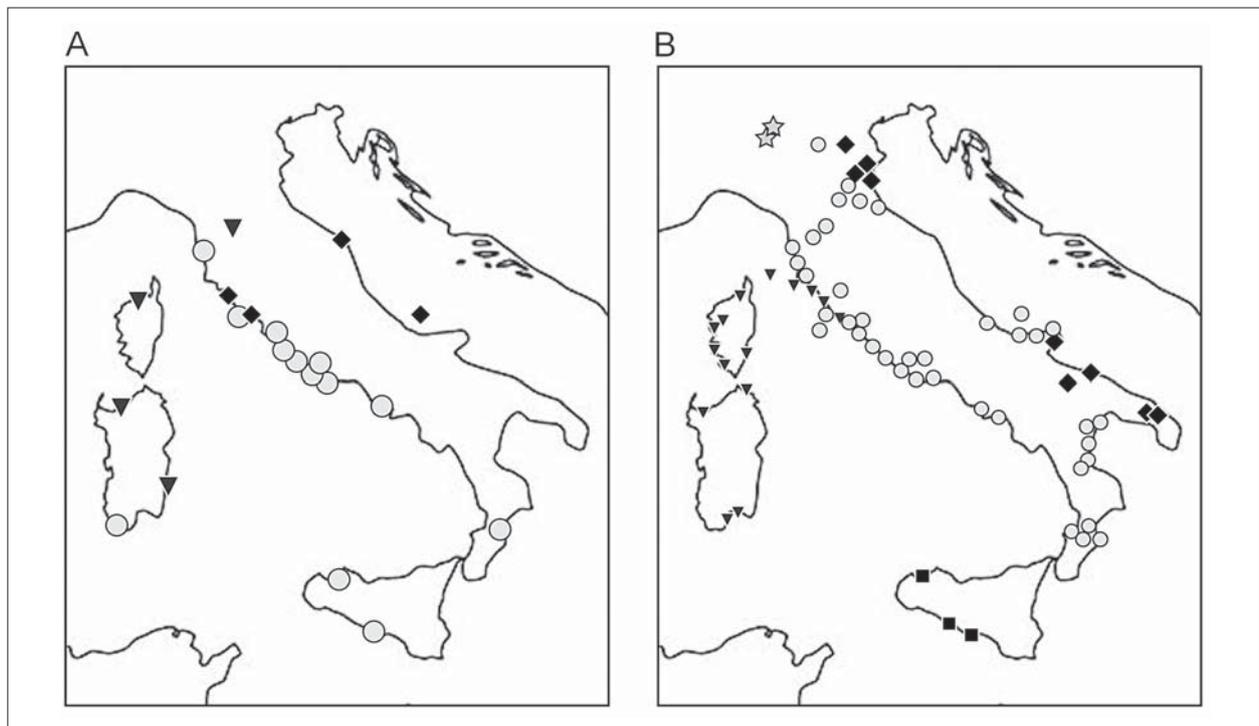


Fig. 1.

Distribution map of termite species in Italy. A) *Kalotermes* spp.: grey dots = *K. flavicollis sensu stricto*; black triangles = *K. flavicollis*, Sardo-Corsican lineage; black diamonds = *K. italicus*. B) *Reticulitermes* spp.: grey dots = *R. lucifugus lucifugus*; black triangles = *R. l. corsicus*; black squares = *Reticulitermes* Sicilian subsp.; black diamonds: *R. urbis*; grey stars: *R. flavipes*.

trade (PERDEREAU *et al.*, 2013a). It was first described as a new species and named *R. santonensis* by FEYTAUD (1924); the same author (FEYTAUD, 1925) though suggested the hypothesis of its synonymy with *R. flavipes*. Recent molecular analyses, indeed, evidenced the synonymy with the North American taxon (MARINI and MANTOVANI, 2002; AUSTIN *et al.*, 2005). In a nicely detailed study, PERDEREAU and coworkers (2013a) demonstrated the origin of the invasive populations from Missisipi/Louisiana (USA). These spread from the Santonge area to the rest of Europe (mainly Paris, Hamburg and Wien). In Italy, the presence of *R. flavipes* is, so far, quite limited: *R. flavipes* colonies have been found only in Southern Lombardy, probably originating from French populations (GHESINI *et al.*, 2010, 2011).

The most infesting invasive termites in Italy belong to the species *R. urbis*. Even in this case, it was first described as an autochthonous species (*R. lucifugus*), in particular in the old town of Bagnacavallo where a huge infestation occurred (MARINI & FERRARI, 1998). It was lately found also in Southern France and then described as a new species, *R. urbis* (BAGNERES *et al.*, 2003; UVA *et al.*, 2004). Further sampling campaigns led to the discovery of this termite also in Apulia and on the Dalmatian coasts down to the Peloponnese (LUCETTI *et al.*, 2004a, b, 2007, 2013c): genetic studies then evidenced that *R. urbis* is native of the Balkan peninsula and it was introduced in Italy and France in historical times (LUCETTI *et al.*, 2007; LENIAUD *et al.*, 2009). Also in this case, commercial routes between scattered human colonies might have facilitated the dispersion. For example, the distribution of *R. urbis* in Italy overlaps the territories occupied by two provinces of the Byzantine Empire (Apulia and Ravenna nearby; Fig. 1B) during the Middle Age, whose dominion extended also to Greece. French populations, similarly, might be linked to the presence in Southern France of the Greek colony Antipolis, settled up around the 5<sup>th</sup> century BC.

#### TERMITE LIFE HISTORY: THE COLONY, THE CASTES AND THE BREEDING SYSTEM

Biological traits and colony structure are difficult to analyze in subterranean termites owing to their cryptic lifestyle and their often-elusive breeding system.

It is well known, as in many other social organisms, that termites live in colonies, i.e. families of hundreds (as for *Kaloterme*s spp) or up

to a million (as for *Reticulitermes* spp) individuals sharing the same nest. The common view is that every colony is made by an “animate” part, the termites, and an “inanimate” part, the nest (EGGLETON, 2011); in contrast to tropical taxa, the temperate termite species do not build epigeous mounds or spectacular cathedrals, but dwell into rotting/dry wood logs or made their nest under the soil level. For example, *Kaloterme*s species build their nest within dry-wood (rarely within living wood, such as in vineyards; LOPEZ MA *et al.*, 2006); interestingly, in this case, the same nest constitutes the food source. Hence the classification of “one-piece nesters” for these termites (ABE 1990). On the contrary, *Reticulitermes* spp dig into the ground to build the nest and expand tunnels from there to the food sources (wood logs). Therefore, *Reticulitermes* termites forage outside the nest, being classified as “separate-piece nesters” (ABE, 1990). To be a single-piece or a separate-piece nester constitutes a fundamental ecological difference and has a deep impact on the social behaviour of the colony members.

Individuals constituting the colony, the animate part of it, are functionally different and this difference emerges in the polyphenism of caste patterns. Three castes are usually recognized within a termite colony: reproductives, soldiers and workers.

Beside rare exceptions, reproductives are the only individuals able to reproduce: the queen is the only egg-laying individual in the colony, while the king has the only task to mate with the queen. Notably, reproductives are the only individuals showing wings, which are long, both membranous and equal (hence the name “Isoptera”). Winged reproductives (alates) are heavily pigmented, at variance of other castes, and are devoted to leave the nest in order to found new colonies; after the new colony set up, these individuals are named primary reproductives. There are, in fact, also the so-called secondary reproductives: neotenic individuals, apterous or brachipterous, helping or replacing primary reproductives in their task. They are usually produced only after the first phases of colony development, in order to increase the offspring output, or develop upon death or senescence of primary reproductives.

Soldier caste is composed of individuals having the only task to defend the nest or the foraging tunnels. In almost all termite species, soldiers morphology differs dramatically from that of the other castes, due to development of “weapons” tools: these can be very large mandibles (as in the case of *Reticulitermes* and *Kaloterme*s) or a frontal

protrusion (a “nose”) from which defence chemicals, produced by the frontal gland, are sprayed (as in tropical genera *Nasutitermes* or *Tumulitermes*, Termitidae).

Finally, the worker caste embodies the great majority of nest members. They are almost undifferentiated individuals whose tasks range from nest construction, to helping queen in brood care and to foraging and feeding members of other castes. They are usually a neuter caste, i.e. lack the ability to reproduce, but in certain condition workers can moult into the so-called “ergatoids”, an apterous form of secondary reproductives. Further, in many lower termites (for examples in the families Archotermopsidae and Kalotermitidae) workers are actually false-workers: they are, indeed, called pseudoergates. These individuals are immatures that remain under a developmental stationary state and stay within the nest without (or only partially) giving their help (KORB, 2007; KORB *et al.*, 2012). Notably, pseudoergates always maintain the potential to become reproductive whenever the conditions are favourable.

From the above reported general aspects, it clearly emerges that pathways leading to the development of the different castes can be quite different, depending on the species and their caste composition. The Italian *Kalotermes* spp. and *Reticulitermes* spp. well reflect two widely different pathways (Fig. 2).

Kalotermitids have a linear pathway, i.e. larvae hatch from the eggs and reach a late instar larvae status (pseudoergates), where the development stops. Individuals can live long time in this condition and the development may be resumed to moult into soldier, neotenic reproductives or into the nymphal stage to give alates (future primary reproductives: Fig. 2A).

*Reticulitermes* termites, on the contrary, show a bifurcated pathway. After the second instar larval stage, individual may either take the apterous line, leading to workers and soldiers (the sterile castes) or take the nymphal (alate) line, eventually leading to neotenic (nymphoids) or alates reproductives (Fig. 2B). Basically, *Reticulitermes* maintains this bifurcated pathway, even if there are rare examples of reciprocal line switch (ROISIN & KORB, 2011).

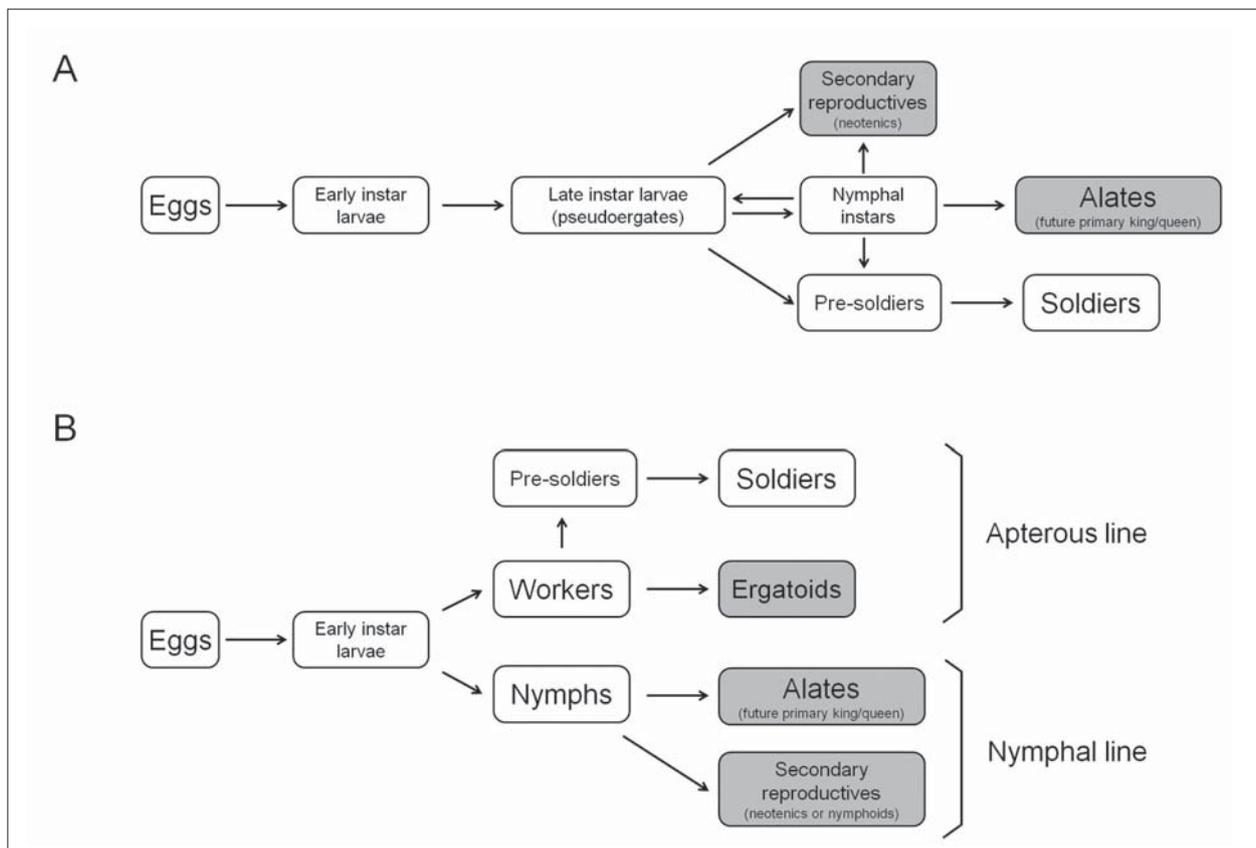


Fig. 2

Caste development pathways of A) *Kalotermes* spp. and B) *Reticulitermes* spp. (modified from ROISIN & KORB, 2011). Grey boxes indicate reproductive forms.

The colony life cycle is pretty similar in all termite species even if some differences exist, often masked by the elusive habits of these insects. We here report on the *Reticulitermes* spp. life cycle, as outlined by THORNE *et al.* (1999), to describe a general model.

After the swarming from the natal nest, alates form the so-called tandem pairs (primary queen and king) and found a new colony; after a slow-growing phase, the workers' number increases and the production of further offspring is, therefore, supported. Upon primaries' death or senescence, neotenics develop, thus replacing them in the reproductive task. Neotenics may also act as supplementary reproductives, contributing to the offspring output while primaries are still alive: their support in the reproductive task often allows the establishment of very large colonies. Finally, when the colony enters into a mature stage, new alates are seasonally produced, right before the swarming season: in Italy, this happens between late April and early June for *Reticulitermes lucifugus* and between late August and September for *Kalotermes flavicollis* (ANDREA LUCHETTI, personal observations).

The family structure of termite colonies is, often, quite difficult to understand: beside the cryptic life-style of these insects, the study of reproductives is even more complicated by the complex nest structures, particularly the position of the royal chamber. However, it is possible to infer the family types by sampling just workers and studying their genotypes (reviewed in VARGO & HUSSENER, 2011). Colonies can be classified as simple-families when worker genotypes are consistent with direct offspring of a single pair of reproductives, not significantly differing from Mendelian expectations. Colonies are considered as extended-families when worker genotypes are not consistent with a single pair of reproductives (i.e., more than four genotypes at a locus or more than two homozygote genotypes are observed) or when genotype frequencies deviate significantly from those expected in simple-family colonies. Colonies are finally considered as mixed-families when five or more alleles are found at a single locus, consistently with offspring produced by three or more unrelated reproductives.

A termite colony is therefore a family of individuals and new colonies, headed by two primary reproductives, or colonies where a single neotenics pair replaces primaries, are referred to as "simple families". However, the emergence of neotenics often leads to the establishment of multiple mating pair within the same nest, thus producing an "extended family". The occurrence

of secondary reproductives may vary depending on the species and the environmental conditions (see VARGO & HUSSENER, 2011 for a review). For example, in the North-American species *R. flavipes*, neotenics can be either present or not; however, colonies introduced in Europe have been shown to be supported only by a large number of secondary pairs (VARGO, 2003; DEHEER & VARGO, 2004; DRONNET *et al.*, 2005). On the contrary, the East European species *R. urbis* appears to be headed mainly by neotenics, in both native and introduced ranges (LENIAUD *et al.*, 2010; PERDEREAU *et al.*, 2013b). Moreover, the occurrence of neotenics can also lead to the establishment of displaced, multiple reproductive centres within the area covered by the nest: this may eventually provoke colony budding, i.e. the process by which part of a colony splits from the main one becoming independent (THORNE *et al.*, 1999; VARGO & HUSSENER, 2009). Extended families are, basically, supported by neotenics that are produced by the reigning pair(s) and do not disperse (LAINÉ & WRIGHT, 2003); therefore, when mating within the natal nest obviously a general high level of inbreeding is reached.

A third case of family type is the "mixed family", i.e. when nest mates are the offspring of three or more unrelated reproductives. Mixed families may emerge by three mechanisms: i) pleometrosis, when three or more primaries join together to fund a colony, ii) colony fusion, when two or more independent colony merge into a single one, or iii) by adoption of unrelated reproductives. While pleometrosis and adoption have been observed mainly in the more derived taxa of the family Termitidae, in lower termites colony fusion seems to be the preferential way to produce mixed families (LUCHETTI *et al.*, 2013a and reference therein).

The merging of unrelated colonies is a somehow paradoxical event, because the maintenance of the colony integrity is usually considered fundamental to keep the relatedness between reproductives and colony members such that the task of helping king and queen, foregoing own reproduction, would still be advantageous (HAMILTON 1964; MAYNARD SMITH 1964). On the other hand, in wood-dwelling termites, such as *Kalotermes flavicollis*, colony fusion is quite frequent also between more than two colonies (THORNE *et al.*, 2003; KORB & ROUX, 2012; LUCHETTI *et al.*, 2013a). This is probably due to the presence of pseudoergates that seem to live in the nest not to contribute to its development (indeed they completely or partially lack brood care, for example) but because of the possibility to inherit it. Indeed, pseudoergates

hold the possibility to moult into reproductives and when colonies merge, former reproductive pairs are killed. Therefore, colony fusion gives the opportunity to pseudoergates to become king or queen of the new colony: being the nest also the food resource, this means they inherit the resources as well. This process is called “accelerated nest inheritance” and some authors seem to suggest that fusion between the colonies could be intentionally provoked by pseudoergates (KORB & ROUX, 2012).

ASEXUAL QUEEN SUCCESSION:  
AN ALTERNATIVE REPRODUCTIVE STRATEGY  
FOR OUTBRED EXTENDED FAMILIES

Parthenogenesis is an unisexual way of reproduction; it consists in the development of eggs without the contribution of sperms. Its occurrence can be facultative (the same organism can reproduce either by parthenogenesis or amphimixis) or the only way of reproduction. Descendants can be females, males or of both sexes in the first instance, but only females when parthenogenesis is obligate. It is widespread among insects and the best-known example of unisexuality in social insects is given by the order Hymenoptera, where queens produce by parthenogenesis haploid males and females by amphimixis.

In some *Reticulitermes* species, instances of facultative thelytokous parthenogenesis (i.e., with only female offspring) have been recently discovered. In particular, it has been observed that primary queens produce secondary queens (nymphoids) unisexually, while other colony members (the whole apterous line, neotenic males and alates of both sexes) are produced by outcrossing (MATSUURA *et al.*, 2009; MATSUURA, 2011; Fig. 3A). In the case of *Reticulitermes*, the unisexual offspring is diploid: eggs undergo meiosis but, after the second division, haploid pronuclei fuse resulting in a completely homozygous zygote (automixis with terminal fusion; MATSUURA, 2011).

Field studies on *R. speratus* and *R. virginicus* (MATSUURA *et al.*, 2009; VARGO *et al.*, 2012) showed that after the onset of thelytokous secondary queens, the primary queen dies and, therefore, the primary king mates with multiple secondary queens. This has an interesting impact on the colony breeding system: being completely homozygous, secondary queens further propagate the primary queen genotype, maintaining the heterozygosity of the colony. In fact, the emergence of neotenic as replacement or sup-

plementary reproductives, unavoidably leads to some inbreeding: they are the offspring of the same primary pair, thus they would mate with their parents (if they replace one of the primaries) or with their brothers/sisters (Fig. 3B, left panel). On the contrary, parthenogenetically produced secondary queens mating with the primary king would always produce heterozygous offspring, thus keeping the genetic variability of the colony (Fig. 3B, right panel). In this system, therefore, the primary queen genotype would be maintained over generations, hence the name “Asexual Queen Succession” (AQS; MATSUURA *et al.*, 2009).

The AQS system has been found also in the two Italian subspecies *R. l. lucifugus* and *R. l. corsicus*: here, only female neotenic have been found, with completely homozygous genotypes (Table 1; LUCHETTI *et al.*, 2013c and unpublished). Interestingly, in the invasive species *R. urbis* neotenic of both sexes have been retrieved, with an heterozygosity comparable to that of workers, suggesting that this species is a non-AQS taxon (LUCHETTI *et al.*, 2013c).

From the colony breeding system point of view, AQS colonies are extended families, but they may not show a genetic pattern consistent this family type: for example, there cannot be more than four genotypes at a single locus or not more than two homozygote classes. Taking into account that, given the elusive life style of *Reticulitermes* termites, the breeding system is almost exclusively estimated based on genetic analyses, then the presence of AQS make essential to revise the family type estimation. This acquires even more importance considering the different colony structure that an extended family may show. The AQS-derived one is an extended family with a single reproductive centre, where the king mates with several secondary queens. This may hold for non-AQS extended families too, but these can also assume a colony structure with multiple reproductive centres established by several neotenic pairs. This latter family structure is quite important as it gives the possibility to establish very large colonies in term of area coverage, thus having serious implication for pest control programs. In at least one case, this kind of family structure led to the phenomenon of unicoloniality: a single macro-colony covering a huge area (LENIAUD *et al.* 2009), a quite common feature of invasive social insects (HELANTERÄ *et al.*, 2009).

The distribution of AQS within the genus *Reticulitermes* (and within the Isoptera as a whole) is still unchecked. To date, its presence has been found in *R. speratus*, *R. virginicus* and *R. lucifugus*. Five species, on the other hand, lack of this

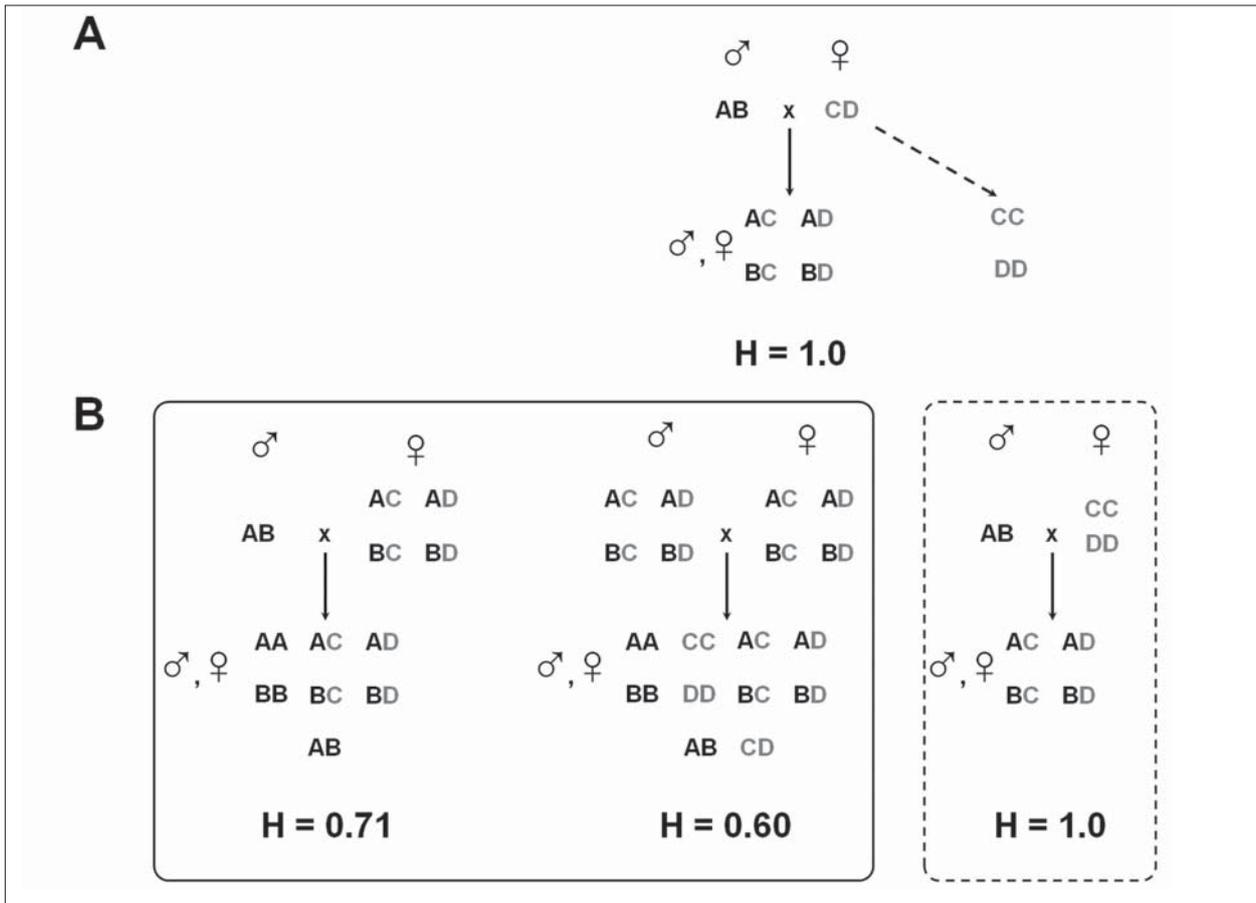


Fig. 3

Colony dynamics and genetic structure of AQS/non-AQS species. A) Early colony stage: unrelated primary king and queen found a new colony: their offspring has heterozygosity ( $H$ ) = 1.0. Lately, the primary queen lay parthenogenetic eggs (dashed arrow), producing homozygous secondary queens. B) Mature colony stage: if secondary queens are produced sexually and mate with the primary king or both primaries are replaced by sexually produced neotenic, the colony heterozygosity ( $H$ ) decrease due to consanguineous mating (left panel). If the primary king mates with parthenogenetically produced secondary queens, the heterozygosity is maintained at the original levels (AQS system; right panel).

Table 1 – Data on *Reticulitermes lucifugus* nymphoids: sex ratio with  $\chi^2$  probability level of significance (\* < 0.05; \*\* < 0.01; \*\*\* < 0.001) and the percentage of heterozygote workers and secondary queens.

Sampling locality	Nymphoids sex ratio			Percentage of heterozygotes	
	♀	♂	$P_{\chi^2}$	workers	♀ secondary queens
Massa Marittima	52	0	***	93.3	0
Castiglion della Pescaia	55	0	**	100.0	0
Marina di Grosseto	8	0	***	66,7	25.0 <sup>a</sup>
San Rossore	70	0	***	100.0	0

<sup>a</sup>: possible recombination products

peculiar system: *R. chinensis*, *R. okinawanus*, *R. yaeyamanus*, *R. urbis* (at least in the invasive range distribution) and *R. flavipes* (MATSUURA *et al.*, 2009; VARGO *et al.*, 2012; KOBAYASHI *et al.*, 2013; LUCHETTI *et al.*, 2013c; HUANG *et al.*, 2013). The scattered appearance of AQS across the phylogeny of *Reticulitermes*, as well as its putative presence outside the genus (possibly making the AQS an

ancestral character), pinpoints to multiple independent evolution of the system or, more likely, to multiple secondary loss in some species.

It is interesting to note that at least two of the non-AQS species, *R. urbis* and *R. flavipes*, have an high invasive potential; this raises the question whether the absence of AQS may be related to this feature. LUCHETTI and co-workers (2013c) spe-

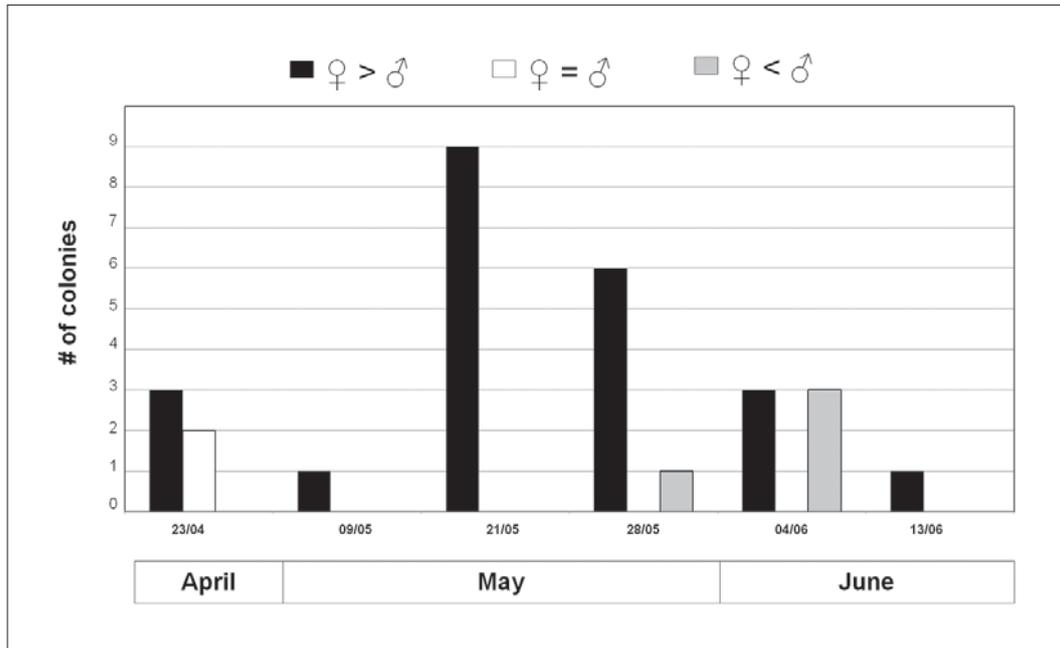


Fig. 4

Histogram showing the frequency of *R. lucifugus* colonies with female-biased, male-biased and unbiased sex ratio over the swarming season April-June 2013 (LUCHETTI, unpublished results).

culated that the absence of AQS might help during the first phases of invasion.

In the AQS species, due to unequal genetic contribution to the offspring of the primary queen and king, alates have significantly female-biased sex ratio (MATSUURA, 2011). For example, preliminary data on *R. lucifugus* alates showed a consistent female-biased sex ratio over the whole swarming season (Fig. 4; LUCHETTI, unpublished results), while *R. urbis* colonies did not (LUCHETTI *et al.*, 2013c). Invading populations are, usually, small-sized and a 1:1 sex ratio would help in faster population growth (SCHMICKL & KARSAI, 2010; LEE *et al.*, 2011): in this view the lack of AQS would result advantageous.

Another aspect could rely on the extent of genetic variability of invading population: in social insect the unavoidable bottleneck upon invasion constitutes a favourable condition for a successful establishment of the population. In fact, the lack of genetic diversity among colonies would decrease the extent of competition between invaders, possibly leading also to unicoloniality (TSUTSUI & SUAREZ, 2003; HELANTERA *et al.*, 2009). In this respect, the inbreeding resulting from the lack of AQS would generate better conditions for genetic homogeneity.

On the whole, beside theoretical aspect of termite biology on the presence of AQS, it may also play a major role in pest control applications;

obviously, more investigation are needed in order to have a full comprehension of the involvement of AQS in invasion biology of *Reticulitermes* termites.

#### REFERENCES

- ABE T., 1990 – *Evolution of worker caste in termites*. In: Social insects and the environment, Veeresh G.K., Mallik B., Viraktamath C.A. Eds, Proceedings 11<sup>th</sup> International Congress IUSSI, Bangalore, India, Oxford and IBH, New Delhi, pp 29-30.
- AUSTIN J.W., SZALANSKI A.L., SCHEFFRAHN R.H., MESSENGER M.T., DRONNET S., BAGNERES A.-G., 2005 – *Genetic evidence for the synonymy of two Reticulitermes species: Reticulitermes flavipes and Reticulitermes santonensis*. - Ann. Entomol. Soc. America, 98: 395-401.
- BAGNERES A.-G., UVA P., CLÉMENT J.-L., 2003 – *Description d'une nouvelle espèce de termite: Reticulitermes urbis n. sp. (Isopt., Rhinotermitidae)*. - Bull. Soc. Entomol. France, 108: 434-436.
- DEHEER C.J., VARGO E.L., 2004 – *Colony genetic organization and colony fusion in the termite Reticulitermes flavipes as revealed by foraging patterns over time and space*. - Mol. Ecol., 13: 431-441.
- DRONNET S., CHAPUISAT M., VARGO E.L., LOHOU C., BAGNERES A.G., 2005 – *Genetic analysis of the breeding system of an invasive subterranean termite, Reticulitermes santonensis, in urban and natural habitats*. - Mol. Ecol., 14: 1311-1320.
- EGGLETON P., 2011 – *An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology*. In: Biology of termites: a modern synthesis, Bignel D.E., Roisin Y., Lo N. Eds, Springer, Dordrecht, pp 1-26.

- EVANS T.A., 2011 – *Invasive termites*. In: *Biology of termites: a modern synthesis*, Bignell D.E., Roisin Y., Lo N. Eds, Springer, Dordrecht, pp 321-347.
- FEYTAUD J., 1924 – *Le termite de Saintonge*. - C. R. Acad. Sci. Paris, 178: 241–244.
- FEYTAUD J., 1925 – *Existe-il plusieurs races de Reticulitermes lucifugus (Rossi)?* - Rev. Zool. Agr. Appl., XXIV, 8: 161-169.
- GHESSINI S., MARINI M., 2012 – *Morphology and phylogeny of Reticulitermes sp. (Isoptera, Rhinotermitidae) from Cyprus*. - Bull. Entomol. Res., 102: 672-681.
- GHESSINI S., MARINI M., 2013 – *A dark-necked dry-wood termite (Isoptera: Kalotermitidae) in Italy: description of Kalotermes italicus sp. nov.* - Fla. Entomol., 96: 200-211.
- GHESSINI S., MESSENGER M.T., PILON N., MARINI M., 2010 – *First Report of Reticulitermes flavipes (Isoptera: Rhinotermitidae) in Italy*. - Fla. Entomol., 93: 327-328.
- GHESSINI S., PILON N., MARINI M., 2011 – *A new finding of Reticulitermes flavipes in northern Italy*. - B. Insectol., 64: 83-85.
- HAMILTON W.D., 1964 – *The genetical evolution of social behavior*. - J. Theor. Biol., 7: 1-16.
- HELANTERÄ H., STRASSMANN J.E., CARRILO J., QUELLER D.C., 2009 – *Unicolonial ants: where do they come from what are they and where are they going?* - Trends Ecol. Evol., 24: 341-349.
- HUANG Q., LI G., HUSSENER C., LEI C., 2013 – *Genetic Analysis of Population Structure and Reproductive Mode of the Termite Reticulitermes chinensis Snyder*. - PLoS ONE, 8(7): e69070.
- JEFFERY S., GARDI C., JONES A., MONTANARELLA L., MARMO L., MIKO L., RITZ K., PERES G., RÖMBKE J., VAN DER PUTTEN W. H. (Eds.), 2010 – *European Atlas of Soil Biodiversity*. European Commission, Luxembourg, Publications Office of the European Union.
- KOBAYASHI K., HASEGAWA E., YAMAMOTO Y., KAWATSU K., VARGO E.L., YOSHIMURA J., MATSUURA K., 2013 – *Sex ratio biases in termites provide evidence for kin selection*. Nat. Commun., 4: 2048.
- KORB J., 2007 – *Workers of a drywood termite do not work*. - Fron. Zool., 4:7.
- KORB J., BUSCHMANN M., SCHAFBG S., LIEBIG J., BAGNÈRES A.-G., 2012 – *Brood care and social evolution in termites*. - Proc. R. Soc. B, 279: 2662-2671.
- KORB J., ROUX E.A., 2012 – *Why join a neighbour: fitness consequences of colony fusions in Termites*. - J. Evol. Biol., 25: 2161-2170.
- KUTNIK M., UVA P., BRINKWORTH L., BAGNÈRES A.-G., 2004 – *Phylogeography of two European Reticulitermes (Isoptera) species: the Iberian refugium*. - Mol. Ecol. 13: 3099-3113.
- LAINÉ L.V., WRIGHT D.J., 2003 – *The life cycle of Reticulitermes spp. (Isoptera: Rhinotermitidae): what do we know?* - Bull. Entomol. Res., 93: 267-278.
- LEE A.M., SAETHER B.E., ENGEN S., 2011 – *Demographic stochasticity, Allee effects, and extinction: the influence of mating system and sex ratio*. - Am. Nat., 177(3): 301-313.
- LEFEBVRE T., CHÂLINE N., LIMOUSIN D., DUPONT S., BAGNÈRES A.-G., 2008 – *From speciation to introgressive hybridization: the phylogeographic structure on an island subspecies of termite, Reticulitermes lucifugus corsicus*. - BMC Evol. Biol., 8: 38.
- LENIAUD L., PICHON A., UVA P., BAGNÈRES A.-G., 2009 – *Unicoloniality in Reticulitermes urbis: a novel feature in a potentially invasive termite species*. - Bull. Entomol. Res., 99: 1-10.
- LENIAUD L., DEDEINE F., PICHON A., DUPONT S., BAGNÈRES A.-G., 2010 – *Geographical distribution, genetic diversity and social organization of a new European termite, Reticulitermes urbis (Isoptera: Rhinotermitidae)*. - Biol. Invasions, 12: 1389-1402.
- LÓPEZ MA Á., MAISTRELLO L., OCETE R., 2006 – *Incidence, size and structure of grapevine infesting groups of Kalotermes flavicollis (Isoptera: Kalotermitidae) in Sherry vineyards (Spain)*. - Sociobiology, 47: 401-414.
- LUCHETTI A., TRENTA M., MANTOVANI B., MARINI M., 2004a – *Taxonomy and phylogeny of North Mediterranean Reticulitermes termites (Isoptera, Rhinotermitidae): a new insight*. - Insectes Soc., 51: 117-122.
- LUCHETTI A., BERGAMASCHI S., MARINI M., MANTOVANI B. 2004b – *Mitochondrial DNA analysis of native European Isoptera: a comparison between Reticulitermes (Rhinotermitidae) and Kalotermes (Kalotermitidae) colonies from Italy and Balkans*. - Redia, LXXXVII: 149-153.
- LUCHETTI A., MARINI M., MANTOVANI B., 2007 – *Filling the European gap: biosystematics of the eusocial system Reticulitermes (Isoptera, Rhinotermitidae) in the Balkanic Peninsula and Aegean area*. - Mol. Phylogenet. Evol., 45: 377-383.
- LUCHETTI A., DEDEINE F., VELONÀ A., MANTOVANI B., 2013a – *Extreme genetic mixing within colonies of the wood-dwelling termite Kalotermes flavicollis (Isoptera, Kalotermitidae)*. - Mol. Ecol., 22: 3391-3402.
- LUCHETTI A., SCICCHITANO V., MANTOVANI B., 2013b – *Origin and evolution of the Italian subterranean termite Reticulitermes lucifugus (Blattodea, Termitoidea, Rhinotermitidae)*. - Bull. Entomol. Res., 103: 734-741.
- LUCHETTI A., VELONÀ A., MUELLER M., MANTOVANI B., 2013c – *Breeding systems and reproductive strategies in Italian Reticulitermes colonies (Isoptera: Rhinotermitidae)*. - Insectes Soc., 60: 203-211.
- MARINI M., FERRARI R., 1998 – *A population survey of the Italian subterranean termite Reticulitermes lucifugus Rossi in Bagnacavallo (Ravenna, Italy) using the Triple Mark Recapture technique (TMR)*. - Zool. Sci., 15: 963-969.
- MARINI M., MANTOVANI B., 2002 – *Molecular relationships among European samples of Reticulitermes (Isoptera, Rhinotermitidae)*. - Mol. Phylogenet. Evol., 22: 454-459.
- MATSUURA K., 2011 – *Sexual and asexual reproduction in termites*. In: *Biology of termites: a modern synthesis*, Bignell D.E., Roisin Y. and Lo N., Eds, Springer, Dordrecht, pp 321-347
- MATSUURA K., VARGO E.L., KAWATSU K., LABADIE P.E., NAKANO H., YASHIRO T., TSUJI K., 2009 – *Queen succession through asexual reproduction in termites*. - Science, 323: 1687.
- MAYNARD-SMITH J., 1964 – *Group selection and kin selection*. - Nature, 201:1145-1147.
- PERDEREAU E., BAGNÈRES A.-G., BANKHEAD-DRONNET S., DUPONT S., ZIMMERMANN M., VARGO E.L., DEDEINE F., 2013a – *Global genetic analysis reveals the putative native source of the invasive termite, Reticulitermes flavipes, in France*. - Mol. Ecol., 22: 1105-1119.
- PERDEREAU E., VELONÀ A., DUPONT S., LABÉDAN M., LUCHETTI A., MANTOVANI B., BAGNÈRES A.-G., 2013b – *Colony breeding structure of the invasive termite Reticulitermes urbis*. - J. Econ. Entomol., 106: 2216-2224.
- ROISIN Y., KORB J., 2011 – *Social organization and the status of workers in termites*. In: *Biology of termites: a modern synthesis*, Bignell D.E., Roisin Y., Lo N. Eds, Springer, Dordrecht, pp 133-164.
- SCHMICKL T., KARSAI I., 2010 – *The interplay of sex ratio,*

- male success and density independent mortality affects population dynamics.* - Ecol. Modell., 221: 1089-1097.
- SCHMID-HEMPEL P., SCHMID-HEMPEL R., BRUNNER P.C., SEEMAN O.D., ALLEN G.R., 2007 – *Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck.* - Heredity, 99: 414-422.
- THORNE B.L., TRANIELLO J.F.A., ADAMS E.S., BULMER M., 1999 – *Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological and genetic studies.* - Ethol. Ecol. Evol., 11: 149-169.
- THORNE B.L., BREISCH N.K., MUSCEDERE M.L., 2003 – *Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: influence of intraspecific competition and accelerated inheritance.* - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 12808-12813.
- TSUTSUI N.D., SUAREZ A.V., 2003 – *The colony structure and population biology of invasive ants.* - Conserv. Biol., 17: 48-58.
- VARGO E.L., 2003 – *Hierarchical analysis of colony and population genetic structure of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*, using two classes of molecular markers.* - Evolution, 57: 2805-2818.
- VARGO E.L., HUSSENER C., 2009 – *Biology of subterranean termites: insights from molecular studies of *Reticulitermes* and *Coptotermes*.* - Annu. Rev. Entomol., 54: 379-403.
- VARGO E.L., HUSSENER C., 2011 – *Genetic structure of termite colonies and populations.* In: *Biology of termites: a modern synthesis*, Bignell D.E., Roisin Y., Lo N. Eds, Springer, Dordrecht, pp 321-347.
- VARGO E.L., LABADIE P.E., MATSUURA K., 2012 – *Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*.* - Proc. R. Soc. B, 279: 813-819.
- VELONÀ A., GHESINI S., LUCHETTI A., MARINI M., MANTOVANI B., 2010 – *Starting from Crete, a phylogenetic re-analysis of the genus *Reticulitermes* in the Mediterranean area.* - Mol. Phylogenet. Evol., 56: 1051-1058.
- VELONÀ A., LUCHETTI A., GHESINI S., MARINI M., MANTOVANI B., 2011 – *Mitochondrial and nuclear markers highlight the biodiversity of *Kalotermites flavicollis* (Fabricius, 1793) (Insecta, Isoptera, Kalotermitidae) in the Mediterranean area.* - Bull. Entomol. Res., 101: 353-364.

## LA SPERMATOLOGIA COMPARATA DEI PHASMATODEA (INSECTA: POLYNEOPTERA) CONFERMA LA POSIZIONE FILOGENETICA BASALE DI *TIMEMA*

MARCO GOTTARDO (\*) - DAVID MERCATI (\*) - ROMANO DALLAI (\*)

(\*) *Department of Life Science, University of Siena, Italy; gottardo@unisi.it*

Lettura tenuta durante la Giornata culturale su "Contributo alla conoscenza dei Polineotteri basali. Struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base e applicativi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 11 ottobre 2013.

### *Comparative spermatology of Phasmatodea (Insecta: Polyneoptera) and the basal phylogenetic placement of Timema*

The sperm structure of two members of Phasmatodea was studied by transmission electron microscopy (TEM). In *Timema poppensis* (suborder Timematodea), spermatozoa exhibit a three-layered acrosomal complex, a flagellum with a 9+9+2 axonal pattern, two accessory bodies, two membranous sacs, and two elongated mitochondrial derivatives. In *Xylica oedematosa*, as well as in other members of the suborder Euphasmatodea, spermatozoa are characterized by the reduction of the acrosomal complex, the loss of both mitochondria and membranous sacs, and the presence of two strongly expanded accessory bodies. Results indicate that *Timema* retains more sperm character states found in the polyneopteran ground pattern, and accordingly it is mostly characterized by plesiomorphic traits. The presence of 17 protofilaments in the wall of accessory microtubules, and the general laminar configuration of the flagellum are recognized as potential apomorphic groundplan features of Phasmatodea.

KEY WORDS: Polyneoptera; Insect ultrastructure; Transmission electron microscopy (TEM); Sperm evolution

### INTRODUZIONE

L'ordine Phasmatodea costituisce un gruppo di insetti polineotteri comprendente circa 3000 specie note (BRADLER *et al.*, 2014). Il gruppo è prevalentemente distribuito nelle regioni tropicali e subtropicali (BEDFORD, 1978). Si tratta di insetti fitofagi che spesso presentano elaborati adattamenti nella morfologia esterna e nel comportamento per rassomigliare a parti di piante come ramoscelli, foglie, o cortecce. Per questo loro spinto criptismo i Phasmatodea vengono comunemente denominati "insetti stecco" e "insetti foglia".

I rapporti filogenetici dei Phasmatodea con gli altri ordini di Polyneoptera non sono chiari (BRADLER, 2009). A tale riguardo le ipotesi maggiormente supportate sembrano indicare un rapporto "sister-group" con gli Orthoptera (BEUTEL & GORB, 2006; YOSHIZAWA, 2011) oppure con gli Embioptera (WHEELER, *et al.* 2004; TERRY & WHITING, 2005; BRADLER, 2009; WIPFLER *et al.*, 2011). Anche le relazioni tra i taxa interni all'ordine sono notevolmente discordanti. Tuttavia, vari studi filogenetici supportano l'ipotesi che il genere *Timema* SCUDDER, 1895 possa rappresentare il taxon più ancestrale dei Phasmatodea ed il "sister-group" di tutti i rimanenti taxa che sono stati raggruppati nel clade Euphas-

matodea (BRADLER, 1999). Il genere *Timema* comprende 21 specie con distribuzione ristretta alla regione Sudoccidentale degli USA e a parte del Messico (VICKERY & SANDOVAL, 2001).

La prima caratterizzazione della struttura dello spermatozoo di un Phasmatodea è stata basata sulla specie olomediterranea *Bacillus rossius* (ROSSI) (BACCETTI *et al.*, 1973). Successive osservazioni sono state presentate da BACCETTI (1987) su altre sei specie di Euphasmatodea. In seguito, AFZELIUS *et al.* (1990) e DALLAI & AFZELIUS (1990) hanno studiato la struttura fine dell'assonema flagellare.

Di seguito verranno esposti alcuni recenti aggiornamenti relativi alla spermatologia comparata dei Phasmatodea, con particolare attenzione ai caratteri di *Timema* che rappresenta il taxon chiave per comprendere la storia evolutiva del gruppo.

### LA STRUTTURA DELLO SPERMATOZOO DI *TIMEMA POPPENSIS* E *XYLICA OEDEMATOSA*

Lo spermatozoo di *Timema poppensis* VICKERY & SANDOVAL è una cellula flagellata di circa 55-60 micron di lunghezza (GOTTARDO *et al.*, 2012). Il complesso acrosomale è a forma di campana e presenta una vescicola acrosomale, un perforato-

rium ben sviluppato e un residuo apicale di citoplasma (o materiale extra-acrosomale) (Fig. 1A). Il nucleo è cilindrico e uniformemente elettrondenso. La regione centriolare presenta un corpo basale costituito da doppietti di microtubuli. Il corpo basale è immerso nel materiale elettrondenso dell'aggiunto centriolare che si presenta strutturato come un cilindro che anteriormente avvolge la base del nucleo e posteriormente circonda la porzione iniziale del flagello (Fig. 2A). Il flagello sezionato trasversalmente mette in evidenza la presenza di un assonema con struttura 9+9+2, due corpi accessori di modeste dimensioni e due derivati mitocondriali piriformi (Fig. 3A). I 9 microtubuli accessori dell'assonema presentano 17 protofilamenti nella loro parete tubulare e sono separati da materiale intertubulare a forma di due piccoli blocchi densi (Fig. 3A, riquadro). Una cisterna membranosa è interposta tra il corpo accessorio e il derivato mitocondriale. I due derivati mitocondriali sono caratterizzati dalla presenza di creste ordinate disposte parallelamente tra loro con una ripetizione di circa 35 nm. La posizione dei corpi accessori e dei derivati mitocondriali allungati conferisce al flagello una forma leggermente appiattita (Fig. 3A).

Lo spermatozoo di *Xylica oedematosa* KARSCH ha caratteristiche molto simili a quelle descritte in *B. rossius* e in altre specie di Euphasmatodea esaminate in precedenti lavori (AFZELIUS *et al.*, 1990;

BACCETTI *et al.*, 1973; BACCETTI, 1987; DALLAI & AFZELIUS, 1990). Si tratta di una cellula flagellata lunga circa 150 micron. All'estremità apicale del nucleo il complesso acrosomale risulta ridotto (Fig. 1B). Il nucleo è allungato e uniformemente elettrondenso. La regione centriolare è caratterizzata dalla presenza di abbondante materiale dell'aggiunto centriolare all'interno del quale il corpo basale si presenta disorganizzato, con le 9 triplete disposte in maniera altamente asimmetrica (Fig. 2B). Il flagello è costituito da un assonema di tipo 9+9+2 e da tre corpi accessori, due laterali molto sviluppati ed uno centrale di più piccole dimensioni (Fig. 3B). I derivati mitocondriali e le cisterne membranose risultano mancanti. I 9 microtubuli accessori dell'assonema presentano 17 protofilamenti nella loro parete esterna (Fig. 3B, riquadro).

#### CONSIDERAZIONI SULL'EVOLUZIONE DELLO SPERMATOZOO DEI PHASMATODEA

L'analisi spermatologica effettuata su *Timema* fornisce una serie caratteri filogeneticamente rilevanti per comprendere l'evoluzione dello spermatozoo dei Phasmatodea.

Il complesso acrosomale di *Timema* è di tipo tristratificato, con una vescicola acrosomale, il perforatorium e del materiale extra-acrosomale. Questo modello di acrosoma si riscontra nella maggio-

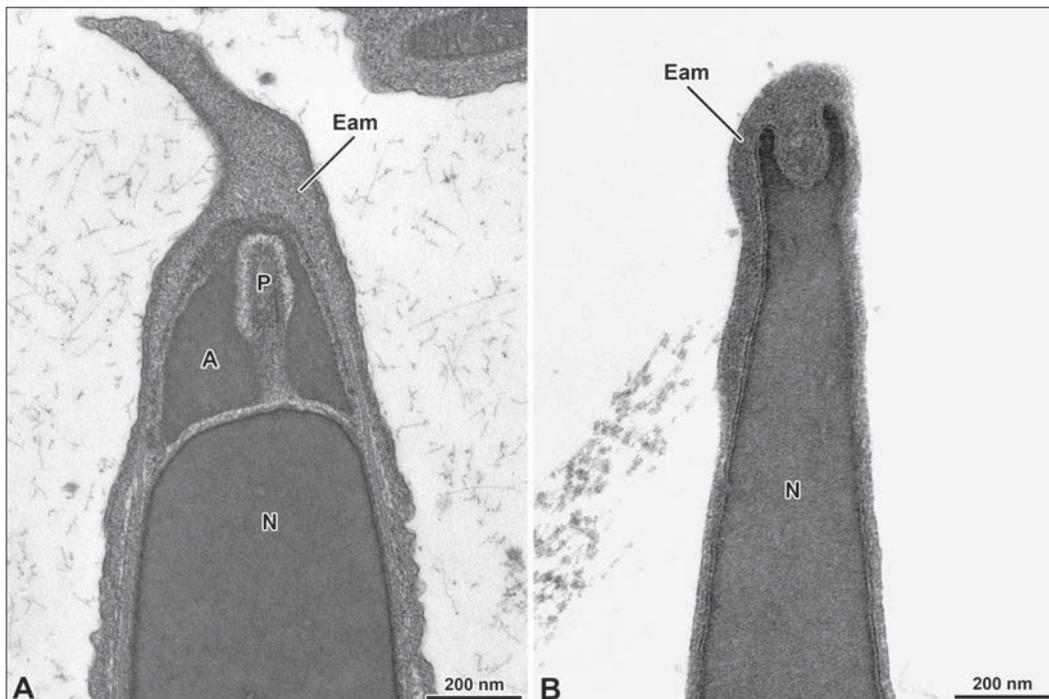


Fig. 1

Struttura dell'acrosoma dei Phasmatodea in sezione longitudinale. A, *Timema poppensis*. B, *Xylica edematosa*. A, vescicola acrosomale; Eam, materiale extra-acrosomale; N, nucleo; P, perforatorium. (A, da GOTTARDO *et al.*, 2012).

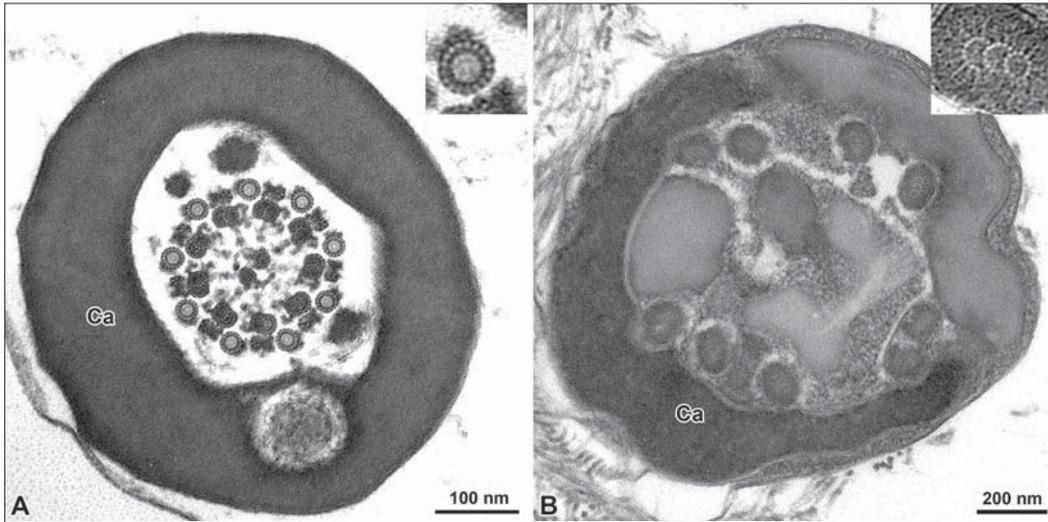


Fig. 2

Regione centriolare dei Phasmatodea in sezione longitudinale. A, *Timema poppensis*; il riquadro mostra il dettaglio di un microtubulo accessorio. B, *Xylica edematosa*; il riquadro mostra il dettaglio di una tripletta del centriolo. Ca, aggiunto centriolare (A, da GOTTARDO *et al.*, 2012).

ranza dei Polyneoptera (FAUSTO *et al.*, 2001; DALLAI *et al.*, 2003) e probabilmente rappresenta uno stato plesiomorfo. Negli Euphasmatodea studiati finora il complesso acrosomale si presenta secondariamente semplificato per la mancanza del perforatorium (BACCETTI *et al.*, 1973; BACCETTI, 1987) e/o della vescicola acrosomale, come osservato in *Xylica oedematosa*.

L'assonema flagellare dei Phasmatodea è caratterizzato dalla struttura 9+9+2 tipica degli insetti pterigoti (DALLAI *et al.*, 2011). I 9 microtubuli accessori esterni alle doppietti dell'assonema sono particolarmente importanti dal punto di vista filogenetico. Questi microtubuli tipicamente hanno 16 protofilamenti nella loro parete tubulare (JAMIESON *et al.*, 1999) mentre in *Timema* e negli Euphasmatodea essi sono costituiti da 17 protofilamenti (AFZELIUS *et al.*, 1990; DALLAI & AFZELIUS, 1990; GOTTARDO *et al.*, 2012). Questa caratteristica può essere interpretata come una sinapomorfia dei Phasmatodea.

Altri caratteri spermatologici di *Timema* sono la presenza di due cisterne membranose e di due derivati mitocondriali ben sviluppati nel flagello. I derivati mitocondriali si differenziano durante la

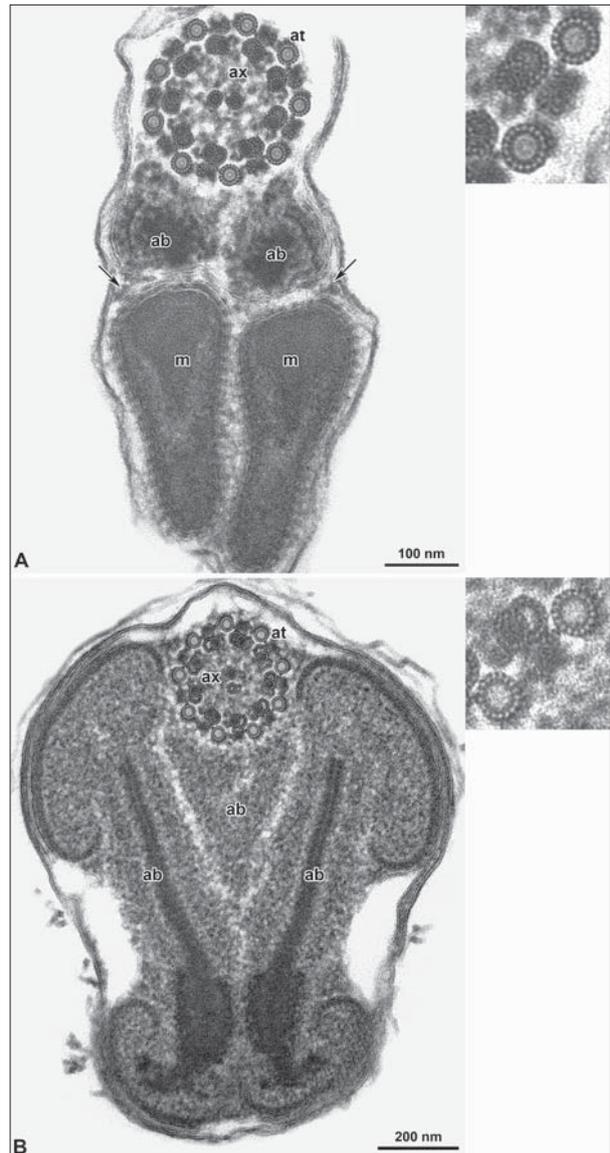


Fig. 3

Flagello dei Phasmatodea in sezione longitudinale. A, *Timema poppensis*; il riquadro mostra un dettaglio dei microtubuli assonemali. B, *Xylica edematosa*; il riquadro mostra un dettaglio dei microtubuli assonemali. Ab, corpi accessori; at, microtubuli accessori; ax, assonema flagellare; m, derivati mitocondriali. Le frecce indicano le cisterne membranose aderenti ai derivati mitocondriali (A, da GOTTARDO *et al.*, 2012).

spermiogenesi attraverso un processo di raggruppamento e rimodellamento dei mitocondri presenti nei giovani spermatidi. Tale processo è caratteristico della maggior parte degli insetti pterigoti (JAMIESON *et al.*, 1999) ed è stato descritto accuratamente da PRATT (1968). I due derivati mitocondriali di *Timema* sono caratteristici per la forma allungata e la presenza di creste parallele, mentre sembrano non avere una distinta cristallizzazione della matrice mitocondriale. Dal punto di vista filogenetico, i derivati mitocondriali e cisterne appiattite di *Timema* possono essere considerati caratteri plesiomorfi a supporto della posizione basale di questo taxon (GOTTARDO *et al.*, 2012). Al contrario, gli Euphasmatodea hanno perso secondariamente entrambe queste componenti del flagello (BACCETTI, 1987).

I corpi accessori sono strutture extra-asonemali con funzioni citoscheletriche. Solitamente queste strutture sono associate alla presenza di un aggiunto centriolare ben sviluppato, come nel caso dei Phasmatodea. In *Timema* i due corpi accessori sono ben sviluppati ma di dimensioni modeste come nella maggioranza dei Polyneoptera (JAMIESON *et al.*, 1999). È interessante notare che corpi accessori molto simili a quelli di *Timema* sono presenti nella spermatozoi degli Embioptera (BACCETTI *et al.*, 1974; DALLAI *et al.*, 2007). Negli Euphasmatodea i due corpi accessori sono molto più sviluppati e costituiscono la componente strutturale più voluminosa del flagello dello spermatozoo. Si tratta di strutture allungate che presentano forma variabile a seconda della specie considerata (BACCETTI, 1987). La presenza di corpi accessori giganti può essere considerata una sinapomorfia degli Euphasmatodea.

Un ulteriore carattere riguarda la forma generale del flagello, che risulta simile ad una “membrana ondulante”. Questa caratteristica conferisce al flagello un aspetto appiattito e laminare. È interessante notare che questa particolare configurazione è presente sia in *Timema* (GOTTARDO *et al.*, 2012) che in svariate specie di Euphasmatodea (BACCETTI, 1987). Tuttavia in *Timema* la membrana ondulante è determinata dalla specifica disposizione dei corpi accessori e dei derivati mitocondriali, mentre negli Euphasmatodea la forma del flagello è determinata sostanzialmente dai corpi accessori notevolmente espansi.

In conclusione, l'analisi comparata dei caratteri spermatologici indica che *Timema* conserva caratteri tipici della struttura degli spermidi degli insetti polineotteri, a supporto della posizione basale di questo taxon all'interno dei Phasmatodea. Al contrario, gli Euphasmatodea hanno acquisito complesse modificazioni nella struttura degli spermidi,

come la riduzione o la perdita completa dell'acrosoma, la perdita dei mitocondri ed il notevole sviluppo dei corpi accessori.

#### RIASSUNTO

La struttura dello spermatozoo è stata studiata in due specie di Phasmatodea mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). In *Timema poppensis* (rappresentante del sottordine Timematodea) gli spermatozoi presentano un complesso acrosomale tristratificato, un flagello con assonema 9+9+2, due corpi accessori di piccole dimensioni, due cisterne membranose e due derivati mitocondriali di forma allungata. In *Xylica oedematosa*, così come in altre specie del sottordine Euphasmatodea, gli spermatozoi sono caratterizzati dalla riduzione del complesso acrosomale, dalla perdita dei mitocondri e delle cisterne membranose, e dalla presenza di due corpi accessori fortemente sviluppati. I risultati indicano che *Timema* conserva vari caratteri associati al “ground pattern” dei Polyneoptera e di conseguenza è caratterizzata da un maggior numero di plesiomorfie. La presenza di 17 protofilamenti nella parete dei microtubuli accessori e la configurazione laminare del flagello possono essere considerati come sinapomorfie dei Phasmatodea.

#### BIBLIOGRAFIA

- AFZELIUS B.A., BELLON P.L., LANZAVECCHIA S., 1990 – *Microtubules and their protofilaments in the flagellum of an insect spermatozoon*. - J. Cell. Sci., 95: 207-217.
- BACCETTI B., 1987 – *Spermatozoa and stick insect phylogeny (The spermatozoon of Arthropoda, XXXIII)*. In: MAZZINI M., SCALI V. (eds), 1st Int Symp on Stick-Insects: Phylogeny and Reproduction. Centroofset, Siena, pp. 117-123.
- BACCETTI B., BURRINI A.G., DALLAI R., PALLINI V., PERITI P., PIANTELLI F., ROSATI F., SELMI G., 1973 – *Structure and function in the spermatozoon of Bacillus rossius. The spermatozoon of Arthropoda. XIX*. - J. Ultrastruct. Res. Suppl., 12: 5-73.
- BACCETTI B., DALLAI R., ROSATI F., GIUSTI F., BERNINI F., SELMI G., 1974 – *The spermatozoon of Arthropoda XXVI. The spermatozoon of Isoptera, Embioptera and Dermaptera*. - J. Microsc., 21: 159-172.
- BEDFORD G.O., 1978 – *Biology and ecology of the Phasmatodea*. - Ann. Rev. Entomol., 23: 125-149.
- BEUTEL R.G., GORB S.N., 2006 – *A revised interpretation of the evolution of attachment structures in Hexapoda with special emphasis on Mantophasmatodea*. - Arthropod Syst. Phylog., 64: 3-25.
- BRADLER S., 1999 – *The vomer of Timema Scudder, 1895 (Insecta: Phasmatodea) and its significance for phasmatodean phylogeny*. - Cour. Forschungstinst Senckenb., 215: 43-47.
- BRADLER S., 2009 – *Die Phylogenie der Stab- und Gespenstschrecken (Insecta: Phasmatodea)*. - Species Phylog. Evol., 2: 3-139.
- BRADLER S., ROBERTSON J.A., WHITING M.F., 2014 – *A molecular phylogeny of Phasmatodea with emphasis on Necroscinae, the most species-rich subfamily of stick insects*. - Syst. Entomol., 39: 205-222.
- DALLAI R., AFZELIUS B.A., 1990 – *Microtubular diversity in insect spermatozoa: Results obtained with a new fixative*. - J. Struct. Biol., 103: 164-179.
- DALLAI R., FRATI F., LUPETTI P., ADIS J., 2003 – *Sperm ultrastructure of Mantophasma zephyra (Insecta, Mantophasmatodea)*. - Zoomorphology, 122: 67-76.

- DALLAI R., MACHIDA R., JINTSU J., FRATI F., LUPETTI P., 2007 – *The sperm structure of Embioptera (Insecta) and phylogenetic considerations*. - Zoomorphology, 126: 53-59.
- DALLAI R., MERCATI D., CARAPELLI A., NARDI F., MACHIDA R., SEKIYA K., FRATI F., 2011 – *Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sistergroup of Insecta s.s.* - Arthropod Struct. Dev. 40: 77-92.
- FAUSTO A.M., BELARDINELLI M., FOCHETTI R., MAZZINI M., 2001 – *Comparative spermatology in Plecoptera (Insecta): an ultrastructural investigation on four species*. - Arthropod Struct. Dev., 30: 55-62.
- GOTTARDO M., MERCATI D., DALLAI R., 2012 – *The spermatogenesis and sperm structure of Timema poppensis (Insecta: Phasmatodea)*. - Zoomorphology, 131: 209-223.
- JAMIESON B.G.M., DALLAI R., AFZELIUS B.A., 1999 – *Insects. Their Spermatozoa and Phylogeny*. Scientific Publishers, New Hampshire, USA.
- PRATT S.A., 1968 – *An electron microscope study of Nebenkern formation and differentiation in spermatids of Murgantia histrionica (Hemiptera, Pentatomidae)*. - J. Morphol., 126: 31-66.
- TERRY M.D., WHITING M.F., 2005 – *Mantophasmatodea and phylogeny of the lower neopterous insects*. - Cladistics, 21: 240-257.
- WHEELER W.C., GIRIBET G., EDGECOMBE G.D., 2004 – *Arthropod systematics. The comparative study of genomic, anatomical and paleontological information*. In: Cracraft J., Donoghue M.J. (eds) *Assembling the Tree of Life*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 281-295.
- WIPFLER B., MACHIDA R., MÜLLER R., BEUTEL R.G., 2011 – *On the head morphology of Grylloblattodea (Insecta) and the systematic position of the order, with a new nomenclature for the head muscles of Dicondylia*. - Syst. Entomol., 36: 241-266.
- VICKERY V.R., SANDOVAL C.P., 2001 – *Descriptions of three new species of Timema (Phasmatoptera: Timematodea: Timematidae) and notes on three other species*. - J. Orthopt. Res., 10: 53-61.
- YOSHIZAWA K., 2011 – *Monophyletic Polyneoptera recovered by wing base structure*. - Syst. Entomol., 36: 377-394.



## L'APPARATO GENITALE MASCHILE E FEMMINILE DEGLI ZORAPTERA (INSECTA-POLYNEOPTERA) E LORO COMPORTAMENTO RIPRODUTTIVO

ROMANO DALLAI (\*) - DAVID MERCATI (\*) - MARCO GOTTARDO (\*) - YUTA MASHIMO (\*\*)  
RYUICHIRO MACHIDA (\*\*\*) - YOKO MATSUMURA (\*\*\*) - ROLF G. BEUTEL (\*\*\*)

(\*) *Dipartimento di Scienze della vita - Università di Siena, Italia; romano.dallai@unisi.it*

(\*\*) *Sugadaira Montane Research Center, University of Tsukuba, Japan*

(\*\*\*) *Entomology Group, Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie mit Phyletischem Museum, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Erbertstr. 1, D-07743 Jena, Germany.*

Lettura tenuta durante la Giornata culturale su "Contributo alla conoscenza dei Polineotteri basali. Struttura, comportamento e riproduzione: aspetti di base e applicativi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 11 ottobre 2013.

### *The male and female genital systems of Zoraptera (Insecta - Polyneoptera) and their reproductive behavior*

The male and female reproductive systems of three species of Zoraptera is here described. Emphasis is on the great difference between the genital structures of *Zorotypus caudelli* in comparison with those of *Z. hubbardi* and *Z. impolitus*. The two latter species are provided with giant sperm characterized by large mitochondrial derivatives and accessory bodies. The females of the same species have coevolved a huge spermatheca to contain the giant sperm. An unexpected mating behavior has been discovered in *Z. impolitus*, with external transfer of a small spermatophore containing a single giant sperm, which is attached to the apical region of the female abdomen. After a series of transfers repeated with the same sequence the male has provided the female with a number of sperm to be used for egg fertilization. This mode of sperm transfer is unique among pterygote insects and it recalls the common indirect sperm transfer occurring among the basal apterygote hexapods.

KEY WORDS: Polyneoptera; Insect anatomy; Insect sperm ultrastructure; Transmission electron microscopy (TEM); Sperm evolution.

### INTRODUZIONE

Nel 1913, un secolo fa, Silvestri descriveva un nuovo ordine di insetti, gli Zoraptera. È interessante ricostruire come l'Autore sia giunto alla identificazione del nuovo gruppo tassonomico.

Nel 1909, Silvestri ricevette una lettera dal Sig. E. Jacobson, naturalista di Giava (Fig. 1), con la quale gli veniva richiesto di determinare il materiale della fauna del suolo che aveva raccolto, seguendo le indicazioni di Silvestri. In questo materiale, Silvestri riconobbe un esemplare con caratteristiche diverse da ogni altro ordine conosciuto. Verso la fine del 1911, l'entomologo di Ceylon, il Sig. E.E. Green, inviò a Silvestri un preparato con due esemplari di un insetto che a suo parere apparivano interessanti. Silvestri, dopo aver osservato con cura gli esemplari, confermò l'opinione di Green, ma decise di rinviare la descrizione a causa della non perfetta preservazione del materiale.

Poco tempo dopo, durante una spedizione in Africa occidentale, il Silvestri ebbe modo di raccogliere piccoli artropodi del terreno e di rinvenire alcuni esemplari interessanti, tra i quali, ad Aburi (Costa d'Oro = Ghana), "5 esemplari che riconobbi subito

congenerici a quelli avuti dal Green" (Fig. 2). Appena tornato in Italia, dopo aver dissezionato un maschio che aveva spermatozoi completamente sviluppati, e dunque riferibile ad un adulto, riconobbe di avere "sotto gli occhi un nuovo genere rappresentante di un nuovo ordine". Silvestri si rese conto che gli esemplari raccolti nell'Africa occidentale erano specificamente diversi sia da quelli di Ceylon, inviatigli da Green, sia dall'esemplare di Giava, inviatogli da Jacobson (Fig. 3).

È su questo materiale che Silvestri definì il nuovo ordine Zoraptera (zoros = puro; apterus = privo di ali), la nuova famiglia Zorotypidae ed il genere *Zorotypus* (Silvestri, 1913) (Fig. 2). Avendo riconosciuto che gli esemplari raccolti o speditigli non risultavano appartenere alla stessa specie, descrisse le prime tre specie: *Zorotypus guineensis* (Costa d'Oro), *Z. javanicus* (Giava) e *Z. ceylonicus* (Sri Lanka).

Da quella data ad oggi sono state descritte 39 specie viventi e 9 specie fossili (ENGEL, 2008; MASHIMO *et al.*, 2014b).

Il nome utilizzato per la definizione dell'ordine è stato successivamente contestato perché, in effetti l'ordine comprende anche individui provvisti di ali, che perdono solamente dopo qualche tempo.

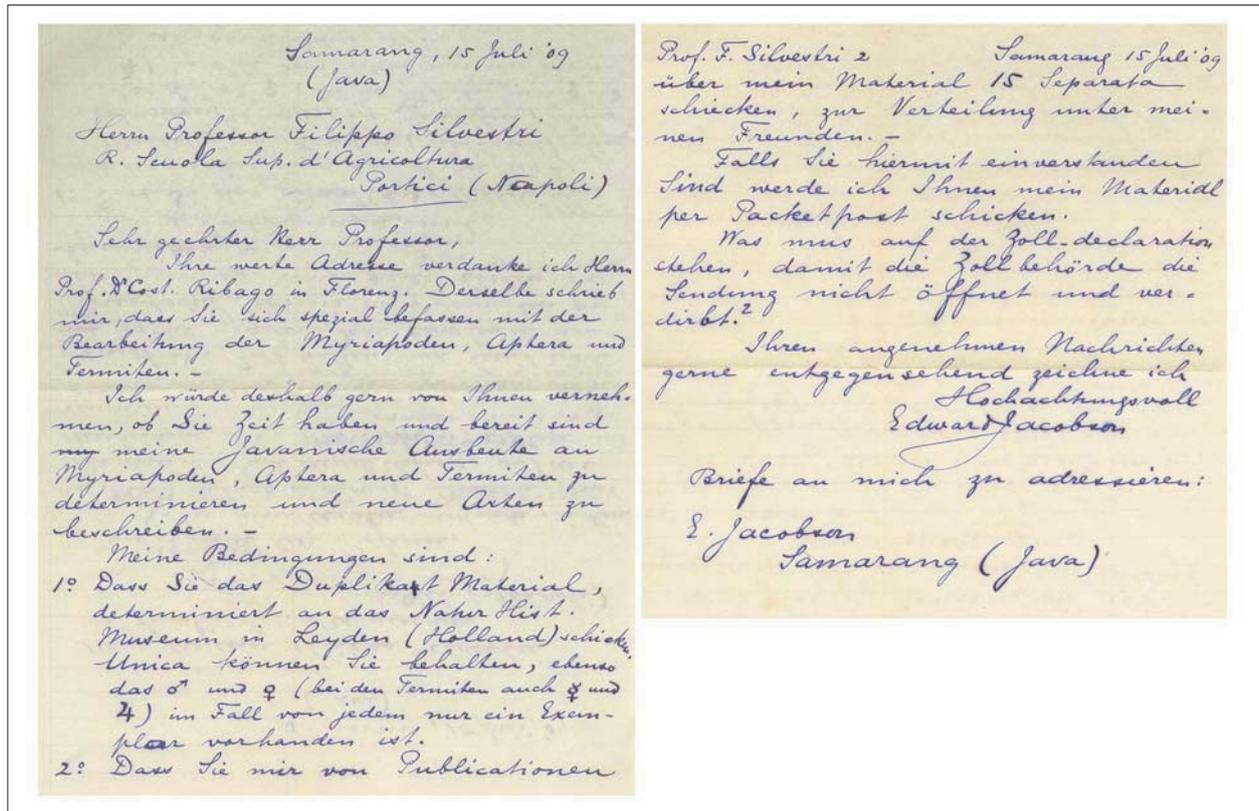


Fig. 1  
Lettera inviata a Silvestri dal Sig. E. Jacobson.



Fig. 2  
Disegno di Silvestri di *Zorotypus guineensis*.



Fig. 3  
Preparato di Silvestri di *Zorotypus ceylonicus*.

Gli Zoraptera sono dunque primariamente alati (CAUDELL, 1920) e gli autori che si sono succeduti a Silvestri hanno sottolineato questa incongruenza (MASHIMO *et al.*, 2014b). Le specie sinora descritte sono caratterizzate da piccole dimensioni (2-4 mm di lunghezza), rapidi movimenti, pigmentazione chiara o scura a seconda se gli esemplari siano provvisti o meno di ali, presenza di occhi ed ocelli oppure completamente cieche.

Questo polimorfismo ha indotto i primi Autori a considerare gli Zoraptera affini alle termiti e ai Blattodea (SILVESTRI, 1913; CAUDELL, 1918; CRAMPTON, 1920) o agli Psocoptera (CRAMPTON, 1920; GURNEY, 1938). L'ipotesi di una separazione precoce degli Zorapteri dai Blattoneoptera (Isoptera + Blattodea + Mantodea) è stata ipotizzata da KUKALOVÁ-PECK e PECK (1993) e da ENGEL e GRIMALDI (2002). WEIDNER (1970), tuttavia, dopo aver sottolineato le difficoltà di inquadramento degli Zoraptera, considera il gruppo come un ramo obsoleto dei Blattodea.

Il gruppo costituisce ancora oggi un problema, “the zorapteran problem”, per quanto riguarda l'inquadramento tassonomico e filogenetico (per una analisi approfondita vedi BEUTEL *et al.*, 2013).

Le indagini molecolari più recenti, anche se non risolutive, hanno indicato una affinità (sister-group relationship) con i Dictyoptera; tuttavia, la presenza di rapide sostituzioni geniche e di modificazioni della struttura secondaria dell'assetto genetico, rendono instabile la posizione dell'ordine (WANG *et al.*, 2013).

In uno studio preliminare di filogenomica includente anche gli Zoraptera, il gruppo è considerato come il sister-group di tutti i Polyneoptera (SIMON *et al.*, 2012).

Come è stato precedentemente indicato, gli Zoraptera hanno una distribuzione geografica attuale di tipo tropicale e subtropicale (RAFAEL e ENGEL, 2006). La prima specie fossile è stata descritta da POINAR (1988) nell'ambra domenicana del Miocene medio. In anni più recenti sono state descritte specie più antiche, del Cretaceo (ENGEL e GRIMALDI, 2000).

Si ritiene che il gruppo abbia dunque origine antica e che la distribuzione attuale sia il risultato della frammentazione dei continenti, avvenuta nel pre-Cretaceo.

Gli Zoraptera abitano preferibilmente sotto le corteccie ove si nutrono di nematodi, collemboli e acari. Una specie (*Z. hubbardi*) ha notevolmente ampliato la sua distribuzione e si è adattata a vivere nei residui di legname lavorato delle regioni temperate ed è stato segnalato in Indiana, Iowa e Illinois (RIEGEL, 1963). Su questa specie in particolare, sono state condotte indagini citologiche e di anatomia interna (GURNEY, 1938; CRAMPTON, 1920; BEUTEL e WEIDE, 2005; HÜNEFELD, 2007; KUZNETSOVA *et al.*, 2002).

Lo studio degli Zoraptera ha ricevuto negli ultimi

anni nuovo interesse, grazie alla collaborazione di tre gruppi di ricerca: University of Tsukuba (R. Machida e Y. Mashimo), University of Jena (R.G. Beutel e Y. Matsumura) e Università di Siena (R. Dallai, M. Gottardo e D. Mercati).

A seguito di questa fattiva collaborazione, sono stati recentemente acquisiti dati sulla embriologia del gruppo, sulla struttura dell'uovo e sul significato della particolare struttura spiralata (il flagellum) presente nell'apparato riproduttore di alcune specie (MASHIMO *et al.*, 2011; 2013; 2014a; MATSUMURA *et al.*, 2014), sulla struttura dell'apparato riproduttore maschile e femminile (DALLAI *et al.*, 2011; 2012a,b; 2013a) e sul comportamento riproduttivo (DALLAI *et al.*, 2014). In particolare, nelle pagine che seguono, verranno descritti questi ultimi dati.

#### L'APPARATO RIPRODUTTORE MASCHILE DI *ZOROTYPUS CAUDELLI*, *Z. HUBBARDI* E *Z. IMPOLITUS*

L'apparato riproduttore maschile di *Z. caudelli* è formato da due lunghi testicoli, ciascuno provvisto di due follicoli, che si continuano con due lunghi e sottili deferenti. Questi ultimi si riuniscono per immettersi in un canale eiaculatore che riceve, durante il suo percorso, le secrezioni di due ghiandole accessorie (DALLAI *et al.*, 2011). L'apparato genitale comprende un edeago ed una struttura spiralata definita “flagellum” (Mashimo *et al.*, 2013) (Fig. 4A,B).

L'apparato riproduttore maschile di *Z. hubbardi*, al contrario delle specie precedente, è costituito da due testicoli globosi, da due brevissimi deferenti che immettono in una voluminosa vescicola seminale dalla quale si diparte un lungo canale eiaculatore. Questo riceve, nella sua porzione distale, le secrezioni di tre ghiandole accessorie. L'apparato genitale comprende un edeago, ma il flagello risulta assente (HÜNEFELD, 2007; DALLAI *et al.*, 2012b) (Fig. 4C,D).

L'apparato riproduttore maschile di *Z. impolitus* non è molto diverso da quello di *Z. hubbardi*. Come in quest'ultimo, esso mostra una vistosa vescicola seminale e un lungo dotto eiaculatore che riceve le secrezioni di quattro ghiandole accessorie, due delle quali con identica struttura. Anche in questa specie l'apparato genitale manca della struttura spiralata (DALLAI *et al.*, 2014).

#### L'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE DI *Z. CAUDELLI*, *Z. HUBBARDI* E *Z. IMPOLITUS*

L'apparato riproduttore femminile di *Z. caudelli* comprende due ovari provvisti di 5-6 ovaroli cia-

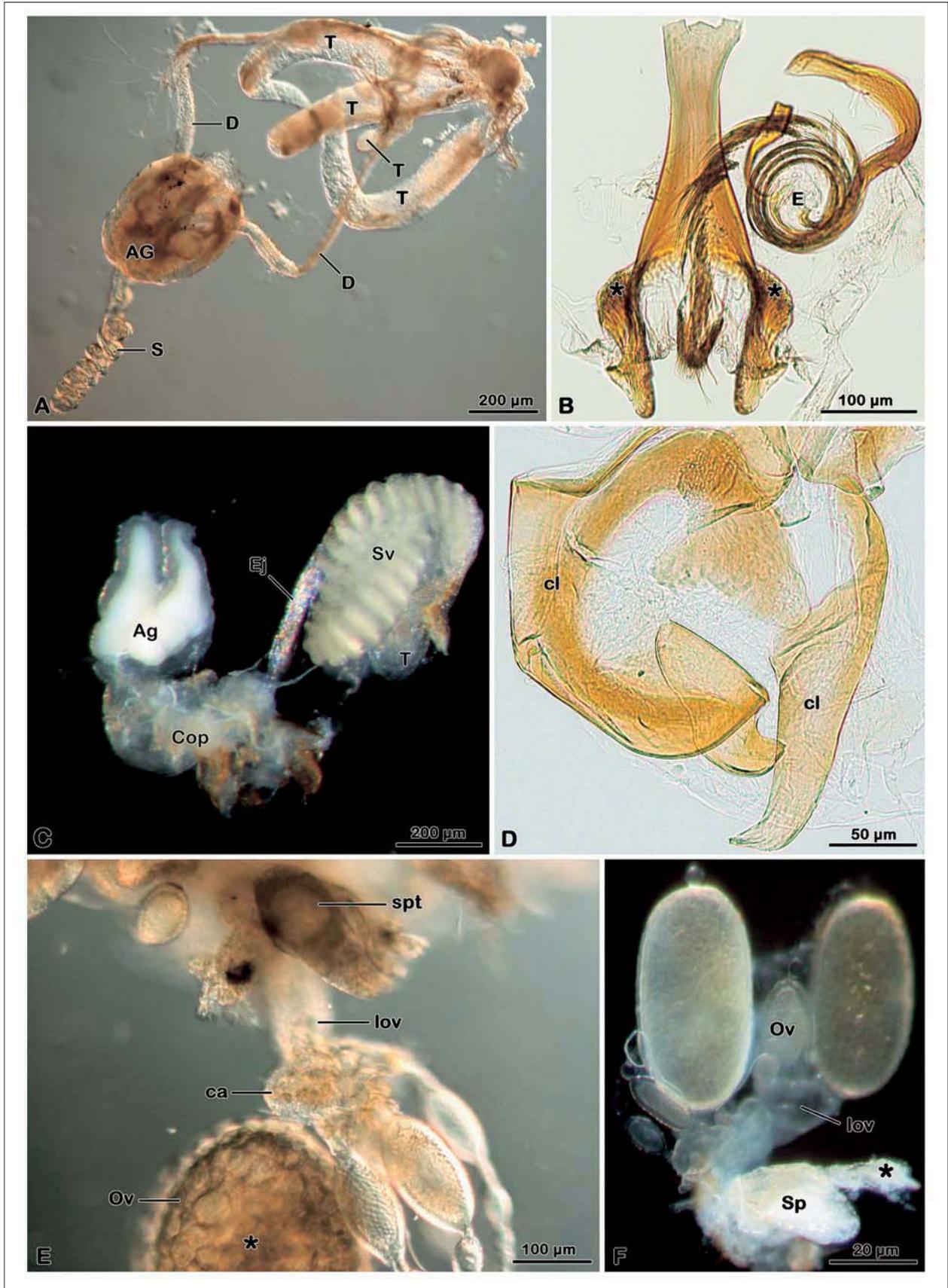


Fig. 4

A, apparato riproduttore maschile di *Zorotypus caudelli*. B, organo genitale maschile di *Z. caudelli* per mostrare la struttura spiralata (flagellum). C, apparato riproduttore maschile di *Z. hubbardi*. Notare la grande vescicola seminale e il lungo condotto eiaculatore. D, organo genitale di *Z. hubbardi* sprovvisto della struttura spiralata. E, apparato riproduttore femminile di *Z. caudelli*, per mostrare la piccola spermateca. F, apparato riproduttore femminile di *Z. hubbardi* con la grande spermateca. Da: Dallai *et al.*, 2011, *Arthropod Struct. Develop.*, 40, 531-547; Dallai *et al.*, 2012a, *Arthropod Struct. Develop.*, 41, 51-63; Dallai *et al.*, 2012b, *Arthropod Struct. Develop.*, 41, 337-359.

scuno. Ogni ovario mostra solamente un ovocito maturo e diversi ovociti in fase previtellogenica. Gli ovariole versano i loro prodotti negli ovidotti laterali tramite dei larghi calici. Gli ovidotti laterali sboccano in un ovidotto comune nel quale sbocca il lungo e contorto canale spermatecale. Quest'ultimo è dilatato all'estremità distale in un ricettacolo seminale (100 micron di diametro) (DALLAI *et al.*, 2012a) (Fig. 4E).

L'apparato riproduttore femminile di *Z. hubbardi* è composto, similmente a quello di *Z. caudelli* di due ovari con circa 5-6 ovariole. Ciò che distingue questo apparato è l'enorme sviluppo del ricettacolo apicale della spermateca (lungo 400 micron e largo 150-400 micron), che occupa gran parte della cavità posteriore dell'addome. Un lungo, sottile e sinuoso condotto spermatecale si apre presso l'apertura genitale femminile in una camera dilatata (DALLAI *et al.*, 2012b) (Fig. 4F).

L'apparato riproduttore di *Z. impolitus* non differisce molto da quello della specie precedente. Come in *Z. hubbardi* è presente uno vistoso ricettacolo apicale della spermateca e un lungo condotto spermatecale che sbocca in una posizione prossima all'apertura genitale femminile (DALLAI *et al.*, 2014).

#### LA STRUTTURA DELLO SPERMATOZOO DI *Z. CAUDELLI*, *Z. HUBBARDI* E *Z. IMPOLITUS*

Lo spermatozoo di *Z. caudelli* è una cellula allungata (lungo circa 800 micron) provvista di un breve acrosoma bi-stratificato, un nucleo cilindrico ed un lungo flagello. Quest'ultimo comprende un assonema, tre piccoli corpi densi e due derivati mitocondriali di uguale forma. L'assonema è da pterigote classico 9+9+2, con 9 microtubuli accessori esterni al 9+2 centrale, provvisti di 17 protofilamenti nella loro parete esterna. I doppietti microtubulari hanno braccia dineiniche sul sub-tubulo A; i doppietti in posizione 1 e 6 presentano la insolita condizione di possedere i sub-tubuli A e B separati ed al loro livello il materiale intertubulare è assai più esteso che fra gli altri doppietti. La caratteristica più originale, tuttavia, è la presenza di due cisterne allungate poste lateralmente all'assonema. L'assonema, nella sua estremità posteriore si modifica vistosamente per la degenerazione dei doppietti che perdono la normale configurazione e si deformano (DALLAI *et al.*, 2011) (Fig. 5A).

Lo spermatozoo di *Z. hubbardi* è lungo circa 3 mm ed è caratterizzato da un lungo acrosoma (lungo 16 micron) e da un lungo nucleo (lungo 300 micron). Il flagello, al contrario della specie prece-

dente, presenta un assonema di tipo 9+9+2 privo delle particolarità descritte in precedenza, ma con tubuli accessori sempre con 17 protofilamenti. Ciò che caratterizza il flagello dello spermatozoo di questa specie è tuttavia, la presenza di due enormi derivati mitocondriali, di due corpi accessori assai espansi posti al di sopra di questi e di un terzo corpo denso ed allungato posto al di sotto dell'assonema DALLAI *et al.*, 2012b) (Fig. 5B).

Lo spermatozoo di *Z. impolitus* condivide con quello di *Z. hubbardi* alcune caratteristiche. In particolare l'enorme sviluppo dei derivati mitocondriali e dei corpi accessori. Peculiarità dello spermatozoo di questa specie sono la notevole lunghezza dell'acrosoma (100 µm) e del nucleo (300 micron) e soprattutto quella dell'intero flagello. L'assonema flagellare, sempre di tipo complesso 9+9+2, mostra tubuli accessori con 17 o 18 protofilamenti (DALLAI *et al.*, 2014).

Sia lo spermatozoo di *Z. hubbardi* che quello di *Z. impolitus*, sono da considerare spermigiganti per il diametro del loro flagello che supera le normali dimensioni. Il rapporto fra il diametro dell'assonema flagellare (sempre 0.23 µm di diametro) e la larghezza del flagello a livello dei 2 derivati mitocondriali è di circa 1:10-12, molto superiore dunque a quello normalmente presente nelle altre specie, dove è generalmente compreso fra 1:2 e 1:3.

#### IL PARTICOLARE COMPORTAMENTO RIPRODUTTIVO DI *ZOROTYPUS* SPP. E QUELLO DI *Z. IMPOLITUS*.

Il comportamento riproduttivo degli Zoraptera è stato descritto accuratamente da CHOE (1994; 1995) che ha preso in esame due specie: *Zorotypus gurneyi* e *Z. barberi*. Dati sintetici e meno informativi erano tuttavia già noti da lavori di precedenti Autori (SHETLAR, 1978; GURNEY, 1938). Sebbene Choe abbia evidenziato aspetti comportamentali diversi ed importanti fra le due specie esaminate, in particolare per quanto riguarda le fasi preliminari della copula, la posizione dei due partner non appare diversa da quella tipica dell'ordine e riferita anche da precedenti Autori.

Secondo quanto descritto dai diversi Autori, il maschio, dopo essersi posizionato dietro alla femmina, compie una rotazione con il proprio corpo portando la sua parte posteriore a contatto con quella della femmina. A questo punto il maschio inizia la penetrazione dell'organo copulatore e nel contempo inizia a ruotare il proprio corpo sull'asse longitudinale per assumere una posizione supina. Durante questa operazione, la femmina piega leggermente il proprio addome per agevolare i movimenti del maschio.

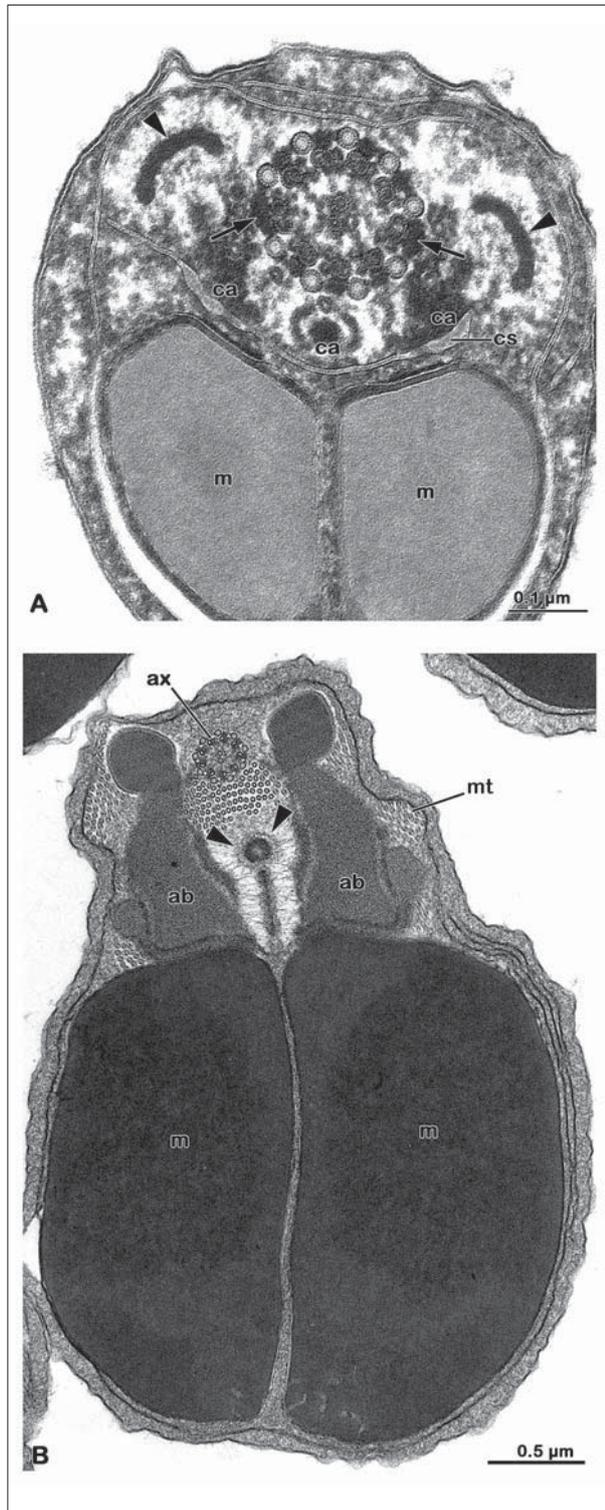


Fig. 5

A, sezione trasversale del flagello di uno spermatidio quasi al termine della sua maturazione di *Z. caudelli* per mostrare le due cisterne appiattite al di sopra dell'assonema flagellare. Da notare altresì il distacco dei subtubuli A e B dei doppietti 1 e 6 dell'assonema e il maggiore sviluppo del materiale intertubulare. B, sezione trasversale di uno spermatidio quasi maturo di *Z. hubbardi*. Osservare l'enorme sviluppo dei due derivati mitocondriali e dei corpi accessori. Per le sue dimensioni lo spermatozoo può definirsi gigante. Risultano assenti le due cisterne appiattite tipiche di *Z. caudelli* così come manca il distacco dei subtubuli A e B dei doppietti 1 e 6. L'assonema è del tipo classico. Da: Dallai *et al.*, 2011, *Arthropod Struct. Develop.*, 40, 531-547; Dallai *et al.*, 2012b, *Arthropod Struct. Develop.*, 41, 337-359).

Al termine di questi movimenti il maschio è completamente disteso sul dorso e risulta attaccato alla femmina che, invece, mantiene una posizione naturale (Fig. 6 a-i). Essa, se disturbata, si muove in avanti trascinando il maschio, che resta immobile (DALLAI *et al.*, 2013). CHOE (1994; 1995; 1997), studiando il comportamento riproduttivo di *Zorotypus gurneyi* e di *Z. barberi*, notò due distinte modalità riproduttive. In *Z. gurneyi* egli evidenziò la presenza di maschi dominanti che si affermano attraverso una antennazione reciproca. I maschi dominanti fecondevano il 72% delle femmine. La specie sembra essere monogama. *Z. barberi*, al contrario, non sembra mostrare tale caratteristica, ma presenta un corteggiamento che prevede anche il rilascio da parte del maschio, come dono nuziale, di secrezioni da ghiandole cefaliche. Sebbene le due specie mostrino una durata dell'accoppiamento assai diversa, solamente 50.7 secondi in *Z. barberi*, mentre in *Z. gurneyi* i due partner restano uniti in accoppiamento per quasi un'ora (55.6 minuti), la posizione dei due partner nell'accoppiamento, come già accennato, risulta essere sempre la stessa, con la femmina posta anteriormente e il maschio dietro ad essa e supino con la sua estremità addominale aderente a quella della femmina.

Recentemente è stata descritta la modalità riproduttiva della specie asiatica *Zorotypus impolitus* (DALLAI *et al.*, 2013). Caso unico fra gli Pterygota, questa specie effettua un trasferimento esterno di spermatofores. Il comportamento riproduttivo della specie è assai peculiare e prevede una stimolazione del maschio da parte della femmina attraverso vibrazioni antennali sia a distanza che a contatto con il maschio. Al termine di questi preliminari, la femmina, che appare dunque attiva, a differenza delle specie precedentemente studiate da Choe, si gira e si pone con la sua estremità addominale verso il maschio. Quest'ultimo, se recettivo, inizia una serie di movimenti della testa in avanti ed indietro sotto l'estremità addominale della femmina, mantenendo tuttavia fissa la posizione del corpo. Al termine di questi movimenti, il maschio compie una rapida vibrazione del corpo e si porta completamente sotto la femmina. Compiuto questo movimento, esso piega il suo addome verso l'alto e attacca una piccola spermatofores (100 μm di diametro) sull'estremità dell'addome della femmina (Fig. 7). Compiuta questa operazione, esso si porta velocemente in avanti evitando talvolta il tentativo della femmina di ostacolarlo, sfilandosi da sotto la femmina e allontanandosi. Dopo pochi secondi il maschio ripiega il proprio corpo portando il proprio apparato boccale in prossimità della sua apertura genitale. Dopo circa 3 minuti dal trasferimento della spermatofores,

anche la femmina ripiega il proprio corpo per portare l'apparato boccale a livello della spermatofora. Si presume che essa raccolga la spermatofora e la trasferisca nella sua apertura genitale (Fig. 6 l-q).

Dopo questi atteggiamenti, infatti, la spermatofora non è più presente sull'addome della femmina. Inoltre, esperimenti effettuati con una femmina vergine, hanno permesso di dimostrare che dopo



Fig. 6

a-i sequenza dell'accoppiamento di *Z. magnicaudelli*, specie affine a *Z. caudelli*, che ripete lo stesso comportamento riproduttivo di questa specie. l-q, sequenza del trasferimento esterno della spermatofora di *Z. impolitus*. Da: Dallai *et al.*, 2013, *Naturwissenschaften*, 100, 581-594.



Fig. 7

Il maschio di *Z. impolitus* si trova dietro la femmina in attesa di poter effettuare una seconda trasmissione esterna di una spermatofora. Sull'estremità dell'addome della femmina si può osservare la piccola spermatofora donata dal maschio nel precedente trasferimento. Da: Dallai *et al.*, 2013, *Naturwissenschaften*, 100, 581-594.

aver ricevuto una serie di spermatofores, la femmina, dopo dissezione, mostrava spermatofores nel proprio ricettacolo seminale.

Il meccanismo di trasferimento della spermatofora si ripete con identica modalità più volte (22 volte per un totale di 8 ore consecutive di osservazione) e può essere giustificato dal fatto che ogni spermatofora contiene solo uno spermatozoo gigante (Fig. 8) (3 mm di lunghezza per 3 μm di diametro). È legittimo ipotizzare che il maschio voglia assicurare di fornire la femmina di un numero adeguato di propri spermatozoi per la fecondazione delle uova. Secondo SHETLAR (1978) una femmina può deporre da 5 a 7 uova durante la sua vita e per ogni uovo da deporre impiega circa 10 giorni. La durata di vita di un individuo adulto è di circa 30-40 giorni, ma si possono trovare individui più longevi, fino a qualche mese e un individuo nel nostro laboratorio ha vissuto per quasi un anno.

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Gli studi sulla filogenesi dei Polyneoptera non hanno ancora chiarito quale gruppo sia affine agli Zoraptera. Apparentemente essi ricordano gli isotteri, gli psocidi ed i plecoteri (CRAMPTON, 1920). Essi sono stati considerati il sister-group dagli Acercaria (HENNING, 1969; BEUTEL e

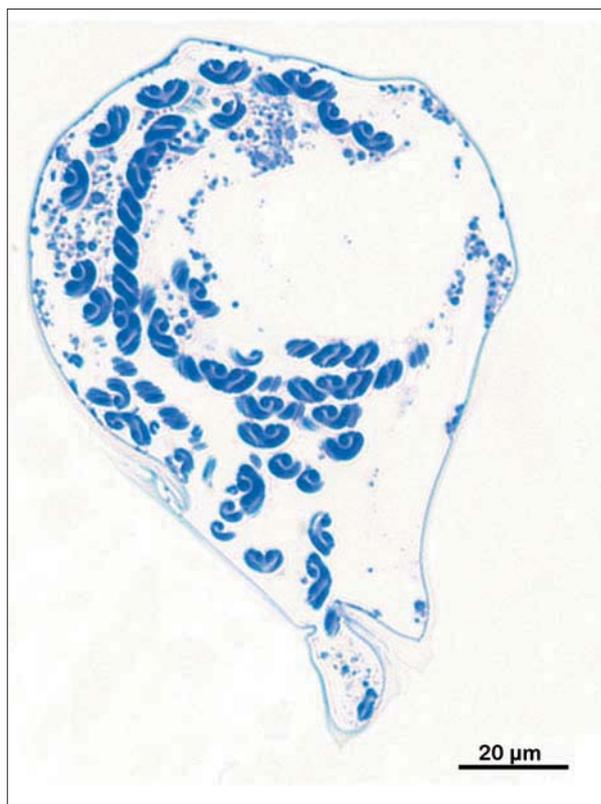


Fig. 8

Sezione trasversale di una spermatofora di *Z. impolitus* contenente al suo interno uno spermatozoo gigante. Da: Dallai *et al.*, 2013, *Naturwissenschaften*, 100, 581-594.

WEIDE, 2005) Gli studi di cladistica condotti su dati molecolari e su strutture morfologiche (YOSHIZAWA, 2007, 2011) indicano una affinità con gli Embioptera e le analisi molecolari più recenti una affinità con Dictyoptera (WHEELER *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2013; MASHIMO *et al.*, 2014b). Secondo Simon *et al.*, (2012) l'ordine potrebbe essere il "sister group" di tutti i Polyneoptera. Le indagini recenti sulla morfologia dell'apparato riproduttore maschile e femminile di alcune specie dell'ordine, hanno messo in evidenza che a fronte di una sostanziale uniformità morfologica esterna, le specie finora esaminate differiscono profondamente nelle loro strutture genitali e nella ultrastruttura dello spermatozoo, nel senso che sono stati evidenziati due modelli di spermatozoo (DALLAI *et al.*, 2011, 2012a; 2014). Inoltre si deve sottolineare la estrema diversità di comportamento riproduttivo di *Zorotypus impolitus* (DALLAI *et al.*, 2013) in confronto con quello condiviso dalle altre specie studiate (SHETLAR, 1978; CHOE, 1995, 1997). Di particolare interesse è la coevoluzione degli apparati riproduttori maschili e femminili. *Zorotypus hubbardi* e *Z. impolitus*, come si è descritto in precedenza, hanno un apparato riproduttore maschile molto diverso da quello di *Z.*

*caudelli* e, ugualmente hanno una spermateca molto più grande per accogliere gli spermatozoi giganti prodotti da queste due specie (DALLAI *et al.*, 2012b, 2014) (Fig. 9 A, B). La presenza di spermatozoi giganti induce dunque una modificazione anche dell'apparato genitale femminile. Una coevoluzione comparabile a quella osservata negli Zoraptera è stata descritta in alcune specie di *Drosophila* da MILLER e PITNICK (2002) e negli Scathophagidae da MINDER *et al.*, (2005). Una simile co-evoluzione era già stata identificata da DYBAS e DYBAS (1981) in alcuni coleotteri. Più recentemente, HIGGINSON *et al.*, (2012), hanno indicato che tale co-evoluzione sembrerebbe essere guidata dalla struttura dell'apparato riproduttore della femmina.

Un aspetto che merita di essere sottolineato è la modalità di trasferimento delle spermatofore in *Z. impolitus*. Gli Pterygota che producono spermatofore, con l'eccezione degli Odonata, inseriscono queste strutture, parzialmente o completamente, nelle vie genitali femminili. Il caso più noto è quello degli ortotteri ensiferi, (GWYNNE, 1988; 1990; GWYNNE *et al.*, 1984). In queste specie, le sperma-

tofore contengono fasci di spermatozoi nella loro parte interna, che subiscono vistosi rimaneggiamenti con disgregazione dei fasci e successiva riaggregazione dei medesimi (VISCUSO *et al.*, 2002). La porzione esterna della spermatofora, che costituisce lo spermatophylax, viene utilizzato dalla femmina e rappresenta un dono nuziale del maschio, che assume grande importanza nella scelta sessuale (GWYNNE, 1990).

Il trasferimento esterno delle spermatofore è un tratto caratteristico dei bassi Hexapoda. Sia i maschi dei Collembola (DALLAI *et al.*, 2009), che quelli dei Diplura producono spermatofore che poi abbandonano sul terreno. La femmina, talvolta stimolata dal maschio, recupererà le spermatofore per inseminarsi (SHALLER, 1971; 1979). Non è noto se i Protura praticino il trasferimento esterno delle spermatofore o se essi effettuino una copula (EWING, 1940). Negli Archaeognatha, il trasferimento delle spermatofore avviene attraverso l'ausilio di filamenti di seta tessuti dal maschio. In *Petrobius*, tuttavia, il maschio attacca una spermatofora in prossimità dell'apertura genitale femminile (STURM, 1978). Un modello assai simile a

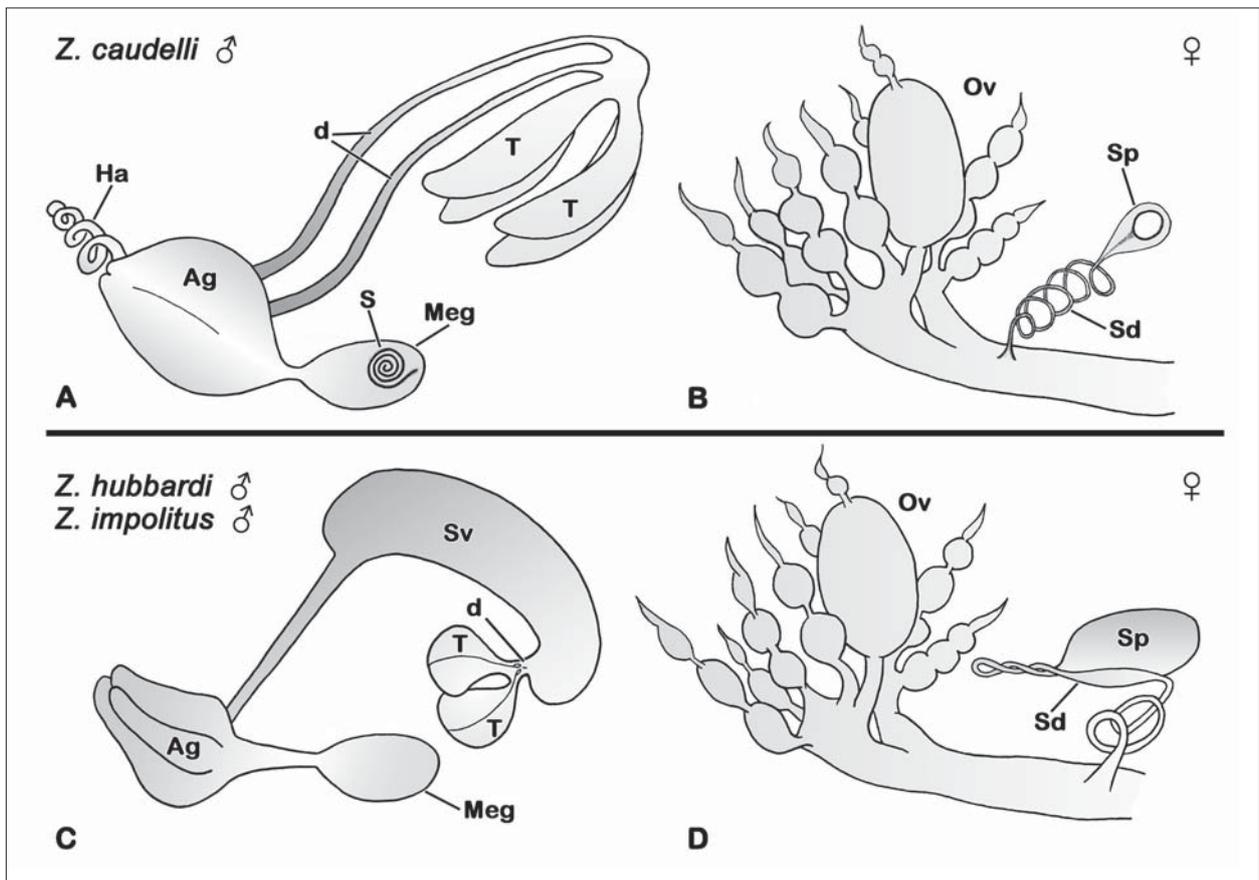


Fig. 9

Disegni schematici degli apparati riproduttori maschile e femminile di *Z. caudelli* e di *Z. hubbardi* e *Z. impolitus*. Da: Dallai *et al.*, 2012b, *Arthropod Struct. Develop.*, 41, 337-359 modificato.

questo comportamento è stato osservato di recente in *Z. impolitus*. Sotto questo aspetto, la specie sembrerebbe aver recuperato un meccanismo di trasferimento esterno che era stato abbandonato con l'acquisizione della copula e la conseguente intromissione delle spermatofore nelle vie genitali della femmina; una acquisizione evolutiva importante che garantiva una maggiore efficienza riproduttiva. Il ritorno al trasferimento esterno delle spermatofore di *Z. impolitus* rappresenta dunque un processo involutivo, del quale tuttavia non è chiara la causa determinante, considerando che nel gruppo tutte le altre specie seguono un modello riproduttivo differente e uniforme, condiviso, fra l'altro, anche da rappresentanti di altri ordini di insetti (ALEXANDER, 1964).

Sarà interessante estendere lo studio ad altre specie dell'ordine per conoscere se quanto è stato osservato fino ad ora sulla struttura degli apparati riproduttori possa essere generalizzato all'intero ordine oppure se nuovi modelli siano possibili.

Come si è già anticipato, l'uniformità morfologica esterna degli Zoraptera nasconde in realtà una struttura interna dell'apparato riproduttore assai differente, e non possiamo escludere che altri modelli possano essere presenti. Lo studio avviato certamente apporterà nuovi dati per la caratterizzazione dell'ordine, utile per una migliore comprensione della filogenesi dei Polyneoptera.

#### RIASSUNTO

Sono stati studiati gli apparati riproduttivi maschili e femminili di tre specie di Zoraptera enfatizzando le differenze che si riscontrano tra le strutture genitali di *Zorotypus caudelli* e quelle di *Z. hubbardi* e *Z. impolitus*. Le ultime due specie sono dotate di uno spermatozoo gigante caratterizzato da grandi derivati mitocondriali e da corpi accessori molto sviluppati. Nell'apparato genitale femminile delle stesse si è evoluta un'enorme spermatoteca per contenere adeguatamente uno spermatozoo di queste dimensioni. Inoltre, in *Z. impolitus*, è stata scoperta una modalità di accoppiamento insolita, con trasferimento esterno di una piccola spermatofora, contenente un singolo spermatozoo gigante. Dopo un complicato corteggiamento, questa spermatofora è attaccata alla parte posteriore dell'addome femminile. A seguito di una serie di accoppiamenti, ripetuti con la stessa sequenza, la femmina ha nella sua spermatoteca spermatozoi sufficienti per fertilizzare tutte le sue uova. Questa modalità di trasferimento degli spermatozoi è unica tra gli insetti pterigoti e richiama il trasferimento indiretto degli spermatozoi che si verifica comunemente tra gli esapodi basali quali Collemboli, Dipluri, Microcoryphia e Zygentoma.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER R.D., 1964 – *The evolution of mating behavior in arthropods*. - Symposium of the Royal Entomological Soc of London., 2: 78-94.  
BEUTEL R.G., WEIDE D., 2005 – *Cephalic anatomy of*

- Zorotypus hubbardi* (Hexapoda: Zoraptera): new evidence for a relationship with Acercaria. - *Zoomorphology*, 124: 121-136.  
BEUTEL R.G., WIPLER B., GOTTARDO M., DALLAI R. – *Polyneoptera or "Lower Neoptera" - New light on old and difficult phylogenetic problems* (in stampa).  
CAUDELL A.N., 1918 – *Zorotypus hubbardi*, a new species of the order Zoraptera from the United States. - *Can. Entomol.*, 50: 375-381.  
CAUDELL A.N., 1920 – *Zoraptera not an apterous order*. - *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 22: 84-97.  
CHOE J.C., 1994 – *Sexual selection and mating system in Zorotypus gurneyi* (Insecta: Zoraptera): I. *Dominance hierarchy and mating success*. - *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 34: 87-93.  
CHOE J.C., 1995 – *Courtship feeding and repeated mating in Zorotypus barberi* (Insecta: Zoraptera). - *Animal Behaviour*, 49:1511-1520.  
CHOE J.C., 1997 – *The evolution of mating systems in the Zoraptera: Mating variations and sexual conflicts*. In: *The evolution of mating systems in Insects and Arachnids*, Choe J.C & Crespi B.J. Eds., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 130-145.  
CRAMPTON G.C., 1920 – *Some anatomical details of the remarkable winged zorapteron Zorotypus hubbardi* [sic] Caudell, with notes on its relationships. - *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 22 :98-106.  
DALLAI R., ZIZZARI Z.V., FANCIULLI P.P., 2009 – *Different sperm number in the spermatophores of Orchesella villosa* (Geoffroy) (Entomobryidae) and *Allacma fusca* (L.) (Sminthuridae). - *Arthropod Struct. Develop.*, 38: 227-234.  
DALLAI R., MERCATI D., GOTTARDO M., MACHIDA R., MASHIMO Y., BEUTEL R.G., 2011 – *The male reproductive system of Zorotypus caudelli* Karny (Zoraptera): *Sperm structure and spermiogenesis*. - *Arthropod Struct. Develop.*, 40: 531-547.  
DALLAI R., MERCATI D., GOTTARDO M., MACHIDA R., MASHIMO Y., BEUTEL R.G., 2012a – *The fine structure of the female reproductive system of Zorotypus caudelli* Karny (Zoraptera). - *Arthropod Struct. Develop.*, 41: 51-63.  
DALLAI R., MERCATI D., GOTTARDO M., DOSSEY A.T., MACHIDA R., MASHIMO Y., BEUTEL R.G., 2012b. *The male and female reproductive systems of Zorotypus hubbardi* Caudell, 1918 (Zoraptera). - *Arthropod Struct. Develop.*, 41: 337-359.  
DALLAI R., GOTTARDO M., MERCATI D., MACHIDA R., MASHIMO Y., MATSUMURA Y., BEUTEL R.G., 2013. *Divergent mating patterns and a unique mode of external sperm transfer in Zoraptera: an enigmatic group of pterygote insects*. - *Naturwissenschaften.*, 100: 581-594.  
DALLAI R., GOTTARDO M., MERCATI D., MACHIDA R., MASHIMO Y., MATSUMURA Y., BEUTEL R.G., 2014. *Giant spermatozoa and a huge spermatheca: A case of coevolution of male and female reproductive organs in the ground louse Zorotypus impolitus* (Insecta, Zoraptera). - *Arthropod Struct. Develop.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.asd.2013.10.002>.  
DYBAS L.K., DYBAS H.S., 1981 – *Coadaptation and taxonomic differentiation of sperm and spermathecae in featherwing beetles*. - *Evolution.*, 35: 168-174.  
ENGEL M.S., 2008 – *A new apterous Zorotypus in Miocene amber from the Dominican Republic* (Zoraptera: Zorotypidae). - *Acta Entomol. Slo.*, 16(2): 127-136.  
ENGEL M.S., GRIMALDI D.A., 2000 – *A winged Zorotypus. Miocene amber from the Dominican Republic* (Zoraptera:

- Zorotypidae*, with discussion on relationships of and within the order. - Acta Geo. Hisp., 35: 149-164.
- ENGEL M.S., GRIMALDI D., 2002 - *The first Mesozoic Zoraptera (Insecta)*. - Am. Mus. Novit., 3362:1-20.
- EWING H.E., 1940 - *The Protura of North America*. - Ann. Entomol. Soc. Am., 33(3): 495-551.
- GURNEY A.B., 1938 - *A synopsis of the order Zoraptera, with notes on the biology of Zorotypus hubbardi Caudell*. - Proc. Entomol. Soc. Wash., 40: 57-87.
- GWYNNE D.T., 1988 - *Courtship feeding and the fitness of female katydids (Orthoptera: Tettigoniidae, Requena verticalis)*. - Evolution., 42: 545-555.
- GWYNNE D.T., 1990 - *The katydid spermatophore: evolution of a parental investment*. In: The biology of Tettigoniidae, Rentz D.C. & Bailey W. Ed., pp 27-40.
- GWYNNE D.T., BOWEN B., CODD C., 1984 - *The function of the katydid spermatophore and its role in fecundity and insemination (Orthoptera: Tettigoniidae)*. - Aust. J. Zool., 32: 15-22.
- HIGGINSON D.M., MILLER K.B., SEGRAVES K.A., PITNICK S., 2012 - *Female reproductive tract form drives the evolution of complex sperm morphology*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 109: 4538-4543.
- HÜNEFELD F., 2007 - *The genital morphology of Zorotypus hubbardi Caudell, 1918 (Insecta: Zoraptera: Zorotypidae)*. - Zoomorphology., 126: 135-1519.
- KUKALOVÁ-PECK J., PECK S.B., 1993 - *Zoraptera wing structures: Evidence for new genera and relationship with the blattoid orders (Insecta: Blattoneoptera)*. - Syst. Entomol., 18: 333-350.
- KUZNETSOVA V.G., NOKKALA S., SHCHERBAKOV D.E., 2002 - *Karyotype, reproductive organs, and pattern of gametogenesis in Zorotypus hubbardi Caudell (Insecta: Zoraptera, Zorotypidae), with discussion on relationships of the order*. - Can. J. Zool., 80: 1047-1054.
- MASHIMO Y., MACHIDA R., DALLAI R., GOTTARDO M., MERCATI D., BEUTEL R.G., 2011 - *Egg structure of Zorotypus caudelli Karny (Insecta, Zoraptera, Zorotypidae)*. - Tissue Cell., 43: 230-237.
- MASHIMO Y., YOSHIZAWA K., ENGEL M.S., GHANI A.B., DALLAI R., BEUTEL R.G., MACHIDA R., 2013 - *Zorotypus in Peninsular Malaysia (Zoraptera: Zorotypidae), with the description of three new species*. - Zootaxa., 3717 (4): 498-514.
- MASHIMO Y., BEUTEL R.G., DALLAI R., LEE C., MACHIDA R., 2014a - *Embryonic development of Zoraptera with special reference to external morphology, and its phylogenetic implications (Insecta)*. - J. Morphol., 275: 295-312.
- MASHIMO Y., MATSUMURA Y., MACHIDA R., DALLAI R., GOTTARDO M., YOSHIZAWA K., FRIEDRICH F., BEUTEL R. G., 2014b - *100 years Zoraptera - a phantom in insect evolution and the history of its investigation*. - Insect Syst. Evol., (in stampa)
- MATSUMURA, Y., YOSHIZAWA, K., MACHIDA, R., MASHIMO, Y., DALLAI, R., GOTTARDO, M., KLEINTEICH, T., MICHELS, J., GORB, S.N., BEUTEL, R.G., 2014 - *Two intromittent organs in Zorotypus caudelli (Insecta, Zoraptera): a paradox coexistence of an extremely long tube and a large spermatophore*. - Biol. J. Linn. Soc. Lond., (in stampa).
- MILLER G.T., PITNICK S., 2002 - *Sperm-female coevolution in Drosophila*. Science., 298: 1230-1233
- MINDER A.M., HOSKEN D.J., WARD P.I., 2005 - *Coevolution of male and female reproductive characters across the Scathophagidae (Diptera)*. - J. Evol. Biol., 18: 60-69.
- POINAR G.O., 1988 - *Zorotypus palaeus, new species, a fossil Zoraptera (Insecta) in Dominican amber*. - J. New York Entomol. Soc., 96: 253-259.
- RAFAEL J.A., ENGEL M.S., 2006 - *A new species of Zorotypus from central Amazonia, Brazil (Zoraptera: Zorotypidae)*. - Am. Mus. Novit., 3528: 1-11.
- RIEGEL G.T., 1963 - *The distribution of Zorotypus hubbardi (Zoraptera)*. - Ann. Entomol. Soc. Am., 56: 744-747.
- SCHALLER F., 1971 - *Indirect sperm transfer by soil arthropods*. - Annu. Rev. Entomol., 16: 407-446.
- SCHALLER F., 1979 - *Significance of sperm transfer and formation of spermatophores in arthropod phylogeny*. In: Arthropod Phylogeny, Gupta A.P. Ed. Van Nostrand Reinhold Co, New York-Toronto-London, pp 587-608
- SHETLAR D.J., 1978 - *Biological observations on Zorotypus hubbardi Caudell (Zoraptera)*. - Entomol. News., 89: 217-223.
- SILVESTRI F., 1913 - *Descrizione di un nuovo ordine di insetti*. - Boll. Lab. Zool. Gen. Agr., 7: 193-209.
- SIMON S., NARECHANIA A., DESALLE R., HADRY S., 2012 - *Insect Phylogenomics: Exploring the source of incongruence using new transcriptomic data*. - Genome Biol. Evol., 4: 1259-1309.
- STURM H., 1978 - *Zum Paarungsverhalten von Petrobius maritimus Leach (Macbilidae: Archaeognatha: Insecta)*. - Zool. Anz., 201:5-20.
- VISCUSO R., BRUNDO M.V., SOTTILE L., 2002 - *Mode of transfer of spermatozoa in Orthoptera Tettigoniidae*. - Tissue Cell., 34:337-348.
- WANG Y., ENGEL M.S., RAFAEL J.A., DANG K., WU H., WANG Y., XIE Q., BU W., 2013 - *A unique box in 28S rRNA is shared by the enigmatic insect order Zoraptera and Dictyoptera*. - PLoS ONE., 8(1):e53679.
- WEIDNER H. 1970 - *Zoraptera (Bodenläuse)*. In: Handbuch der Zoologie, Helmcke J.G., Starck D., Wermuth H. Eds., Vol. 4.
- WHEELER W.C., WHITING M., WHEELER Q.D., CARPENTER J.M. 2001 - *The phylogeny of the extant hexapod orders*. - Cladistics, 17: 113-169.
- YOSHIZAWA K., 2007 - *The Zoraptera problem: evidence for Zoraptera + Embiodea from the wing base*. - Syst. Entomol., 32: 197-204.
- YOSHIZAWA, K., 2011 - *Monophyletic Polyneoptera recovered by wing base structure*. - Syst. Entomol., 36: 377-394.







## 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 cala 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. Pepicciello, 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 PENNA 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: Areaceae).* - 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. Econo. 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.*

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.

### *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 (Curculionioidea) 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 (Curculionioidea). 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 (FAGHIIH, 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  $F_u$  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.

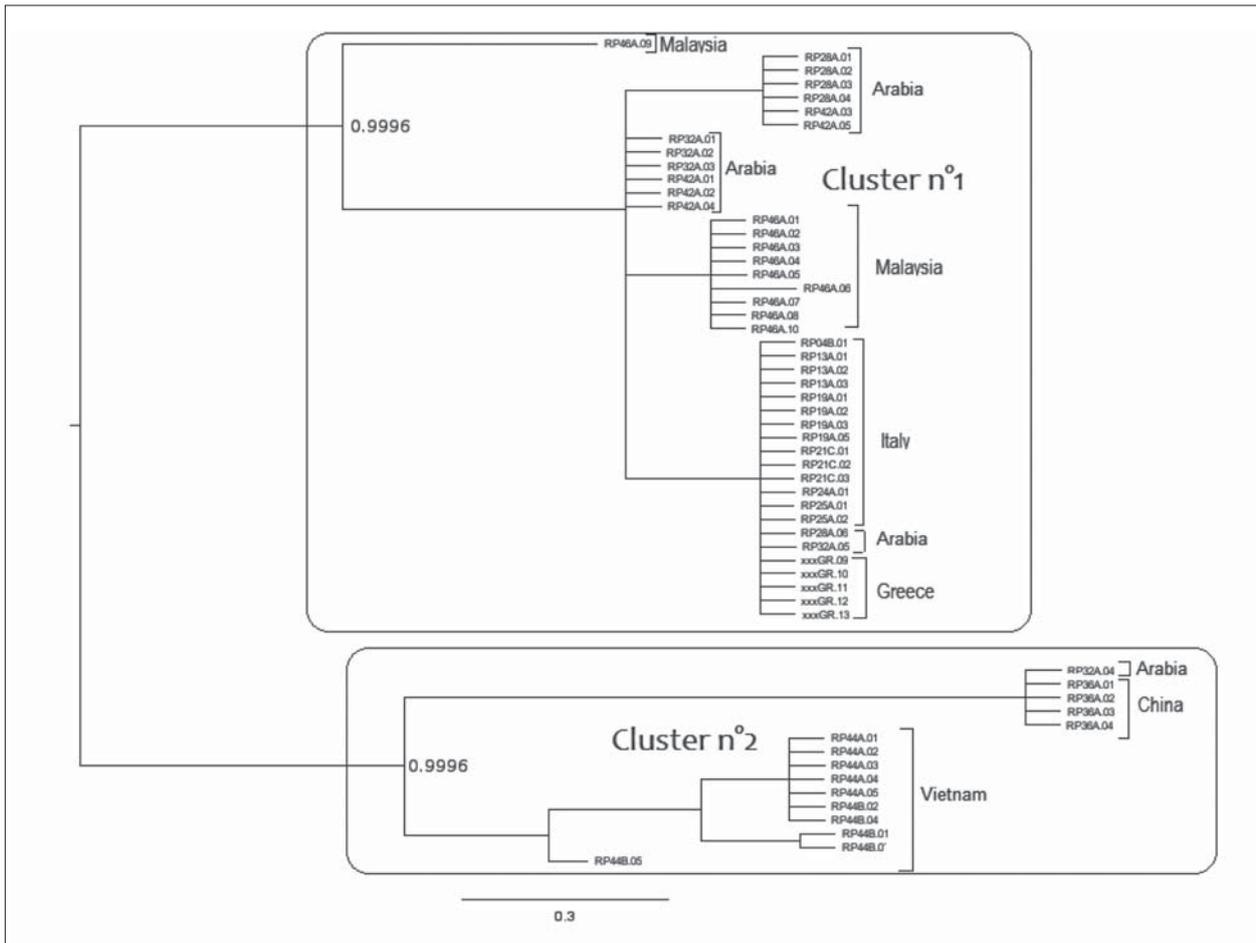


Fig. 1  
Bayesian phylogenetic tree based upon *coxI* sequence data; node figures refer to posterior probability support.

## 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., ABUZHAIRAH 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.
- ALLENTOFT 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-FAGHIIH 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 BIASE A., SMITH L., 2013 – *Field release of a prospective biological control agent of weeds, Ceratopium 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 N., STECHER 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., SOVOROV A., STARCHENKO G., TATSOV R.L., TATSOVA 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 (EPP0, 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 *Trabulsilla*), *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.
- LLÁCER 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 *Metarbizium 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*, *Metarbizium 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 *Metarbizium 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., BGHAM 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., BGHAM 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-FAGHIIH 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., OEHLSCHLAGER 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., BROWNBIDGE 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.
- OEHLISCHLAGER 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_n-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 autoctone 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).

#### FUNGHI

*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 cocophilus*. 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 ovari 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 swifftae* 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 *Platymeris 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'opportunisto 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). È 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 - *Chelisoche 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., ÇOBANO LU S., YÜSEL O., ALI BAL D., 2009 - *Kirmizipalmyeböcegi [Rhynchophorus ferrugineus (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae)] üzerindeki üropodidakarlar (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 BGHAM 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 BGHAM 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.
- FRANCESCA 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 Steinernemacarpocapsae 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.
- MERGHAM 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., ABDELRAZEK 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

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.

### *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 caimonale (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 agiscono 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 OEHLSCHLAGER & 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. (OEHLSCHLAGER & 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 BIOSAGGIATI	PROVE DI LABORATORIO			PROVE DI CAMPO % riduzione catture
	EAG	antifeedant	Deterrenza 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 artopodi. 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., OEHLSCHLAGER 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.*

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.

### *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

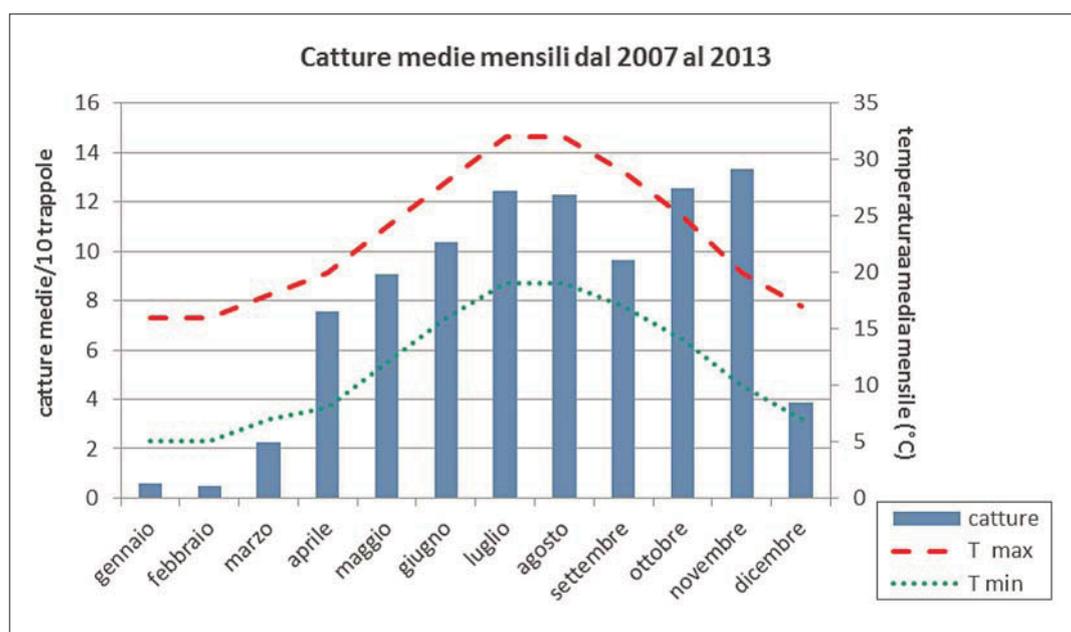


Fig. 1

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.

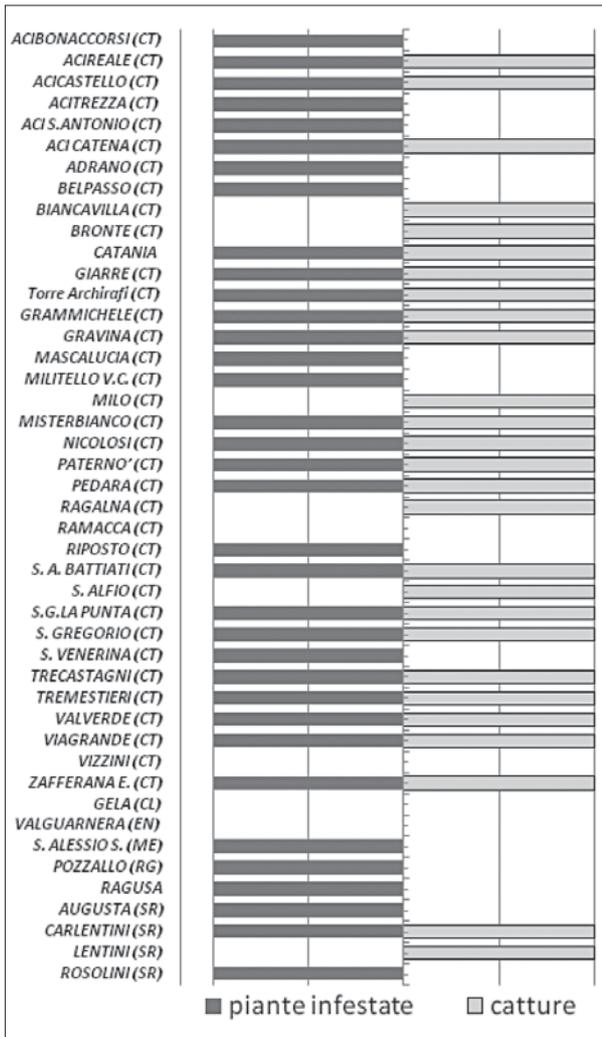


Fig. 2

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

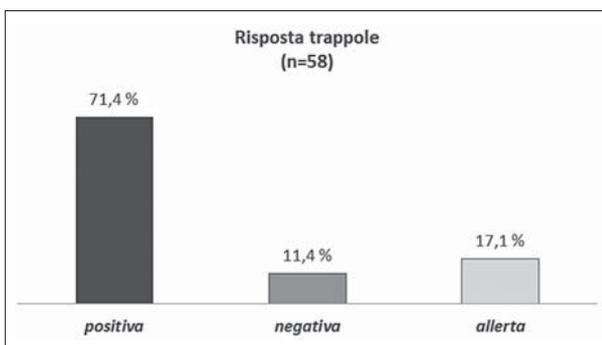


Fig. 3

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  $13\ \mu\text{m}$ ) 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> (mean% ± SE)	False/positive responses <sup>c</sup> (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., KLESIUS 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

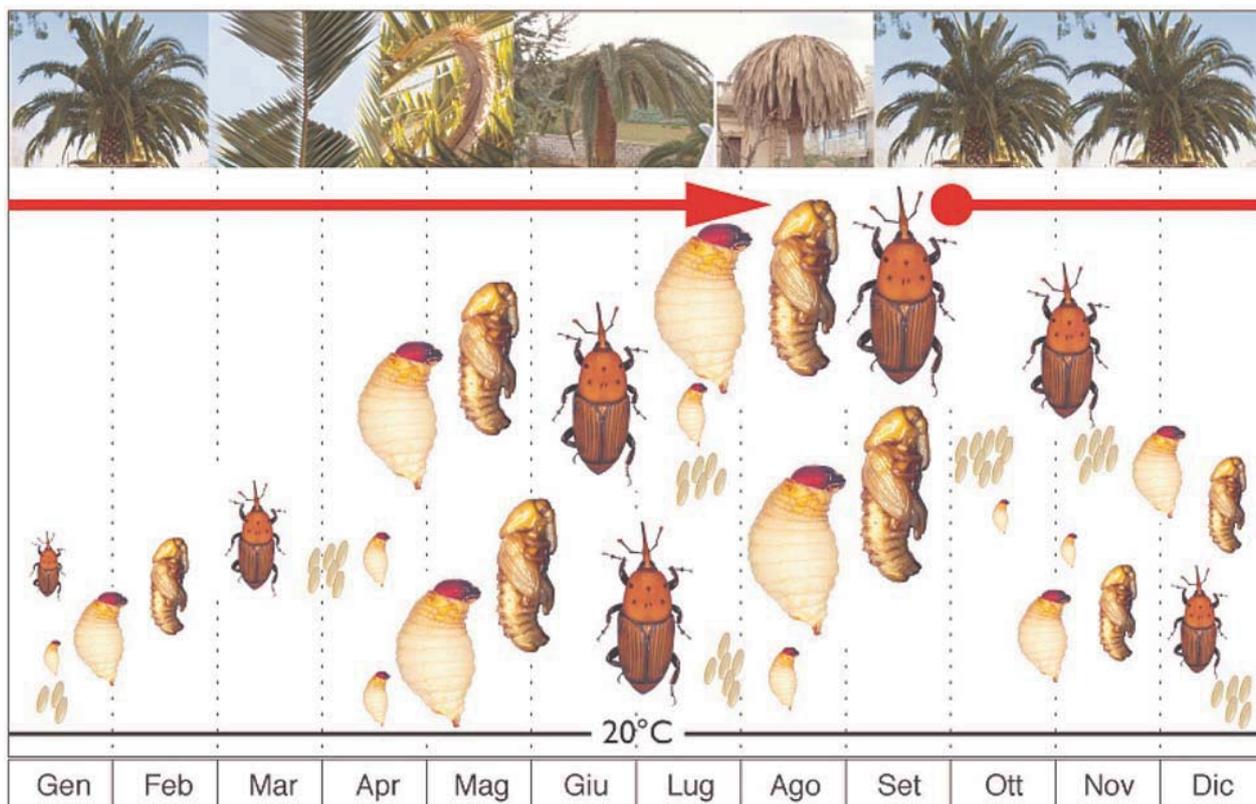


Fig. 1  
Fenologia dell'infestazione di *Rhyncophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), su *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud.

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'additività 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

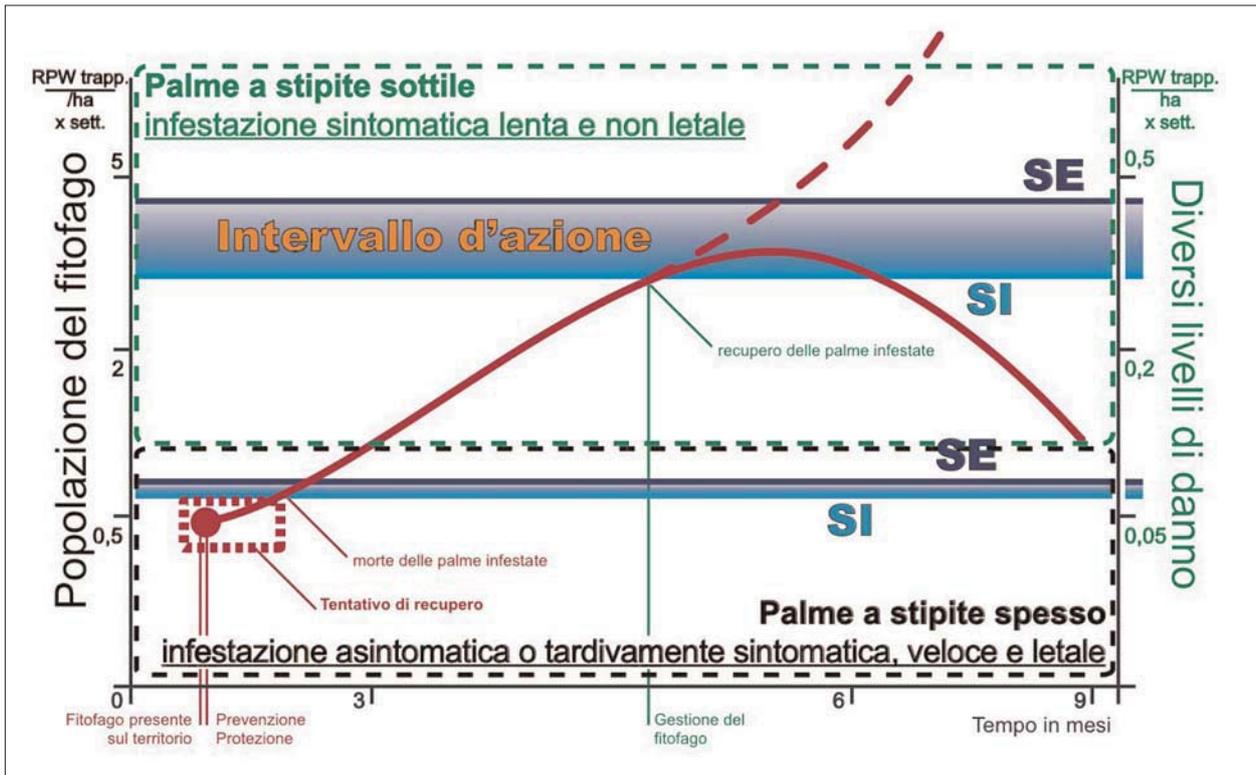


Fig. 2

Relazione fra il *Rhyncophorus 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 irreperabili 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).



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

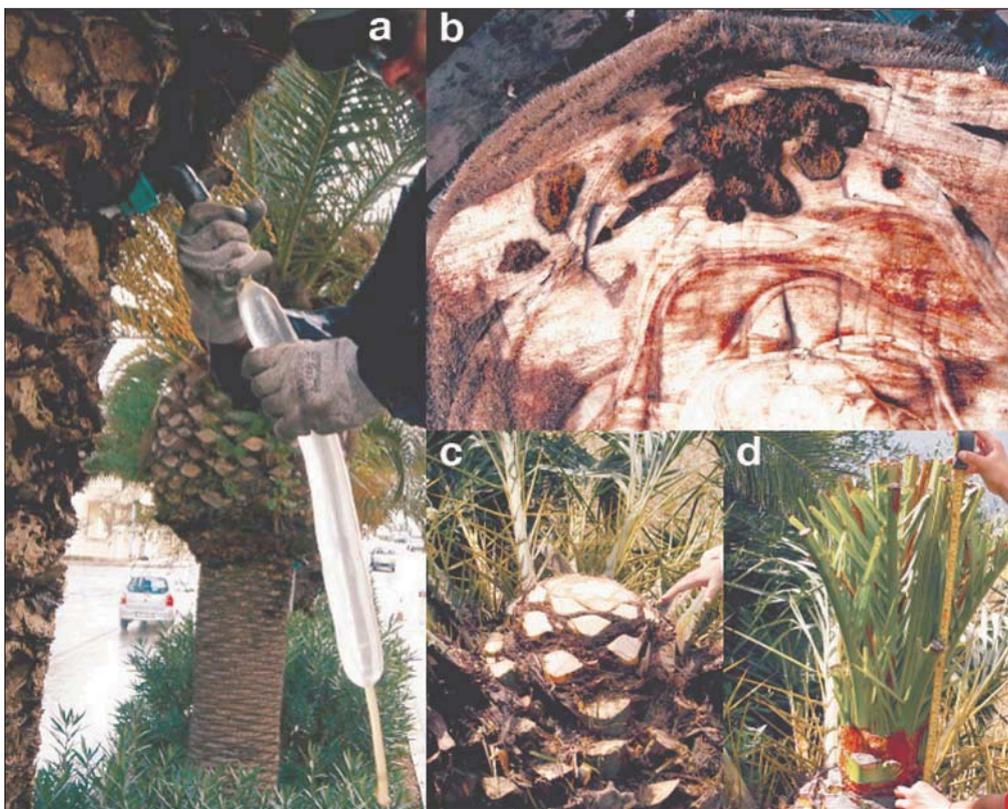


Fig. 5

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 Rapisexelsa 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.

(\*\*\*) BBKA-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 *Ceratitits capitata*, *Pectinophora gossypiella* e *Cydia pomonella* (BLOEM *et al.*, 2005; KLASSEN *et al.*, 1994; HENDRICHES *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 poliantrico 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).

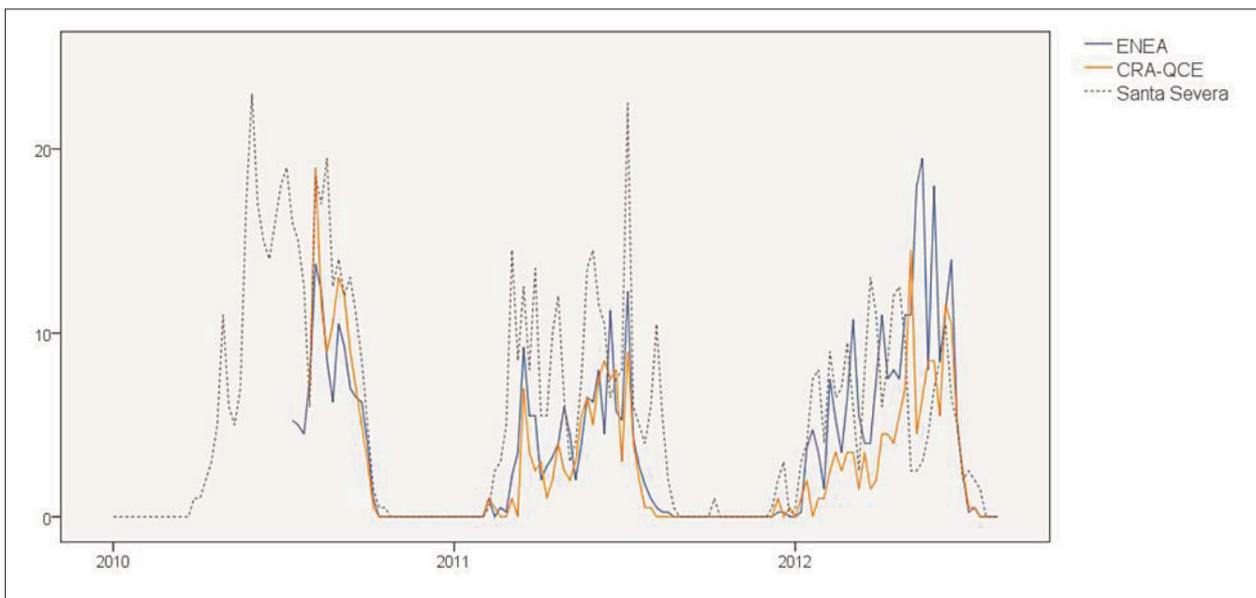


Fig. 2

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-

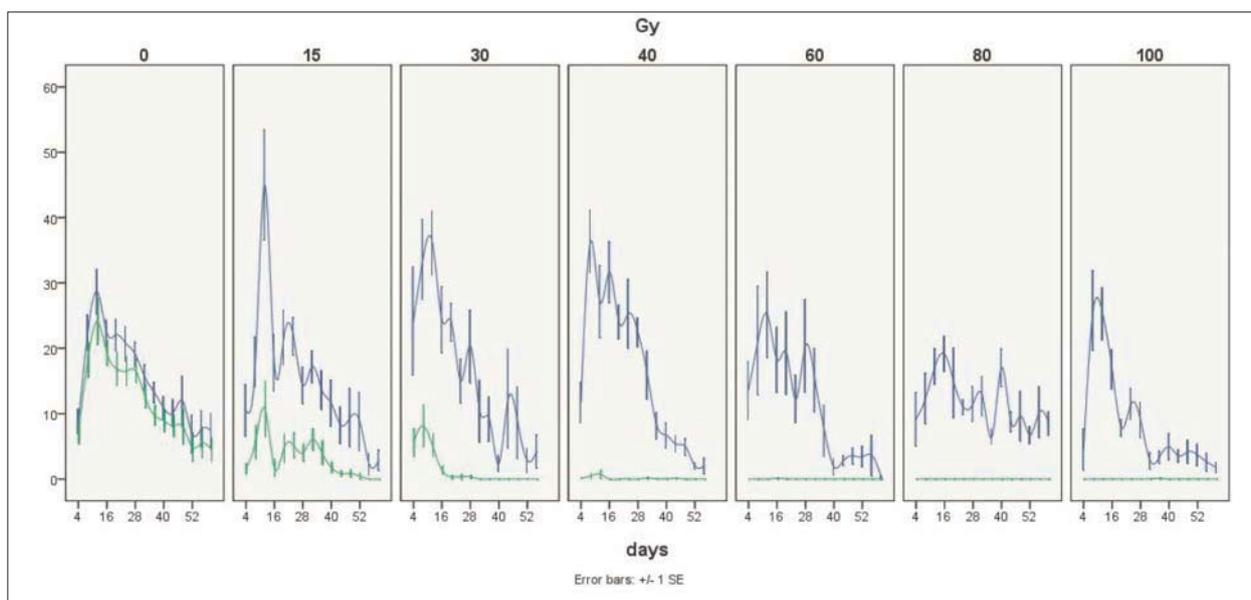


Fig. 3

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

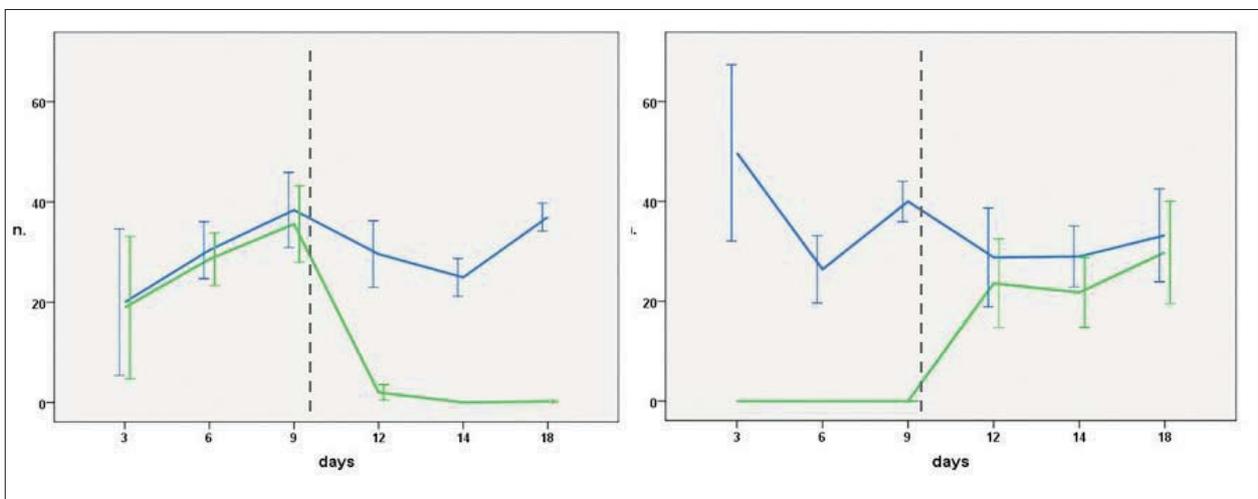


Fig. 4

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; INGHIRESI *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* (Oliver) (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. 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 Prociada 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.
- HENDRICH S.J., 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., Klassern 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. Entomol.*, 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.*, 45: 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.
- PRA BHU 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., CAMERA 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 preminente 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 spermatozoi, 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 spermatoziti 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 paracrillino. 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 cerambicidi (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 spermatozoi.

#### 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 spermiogenesi 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.

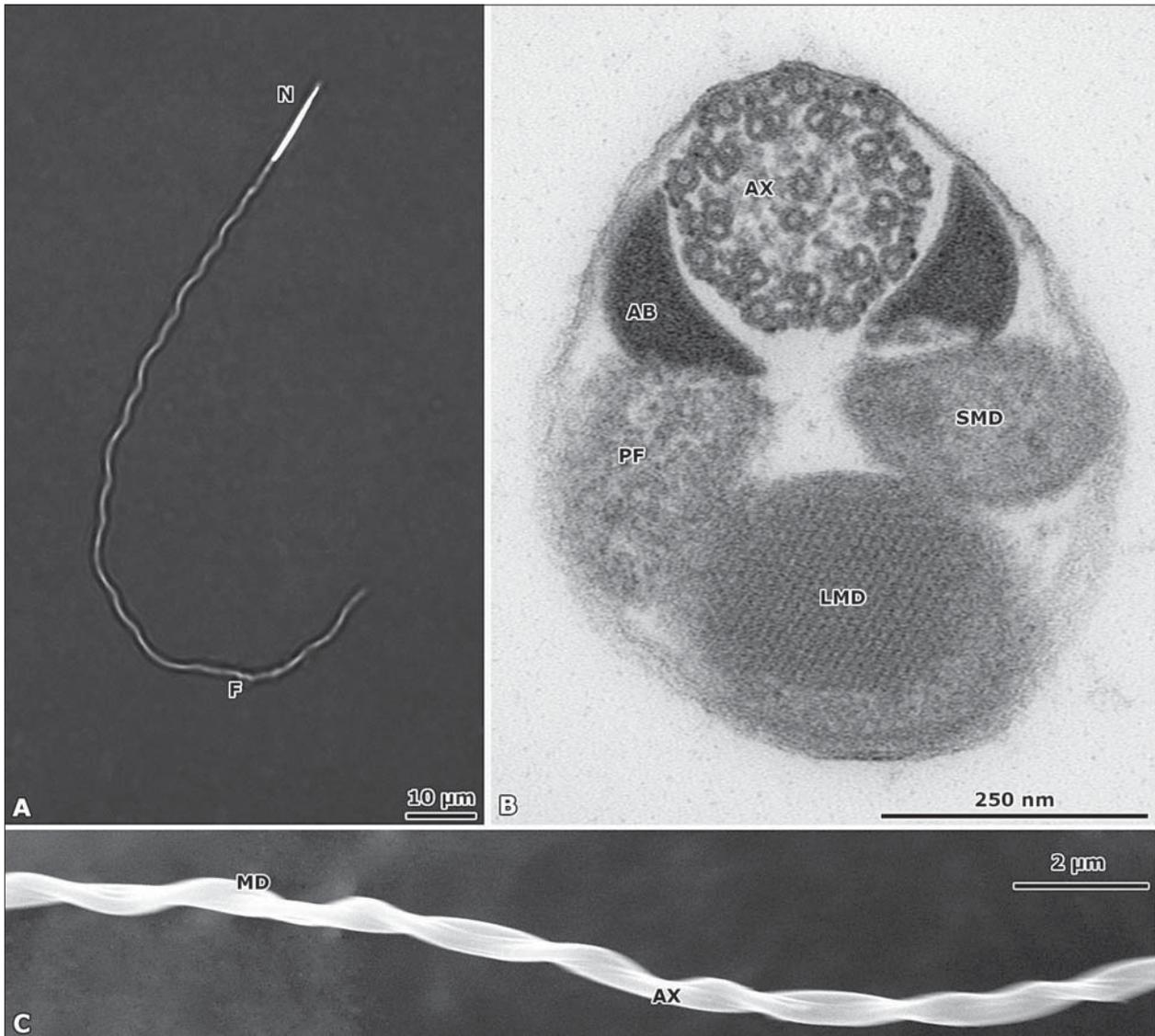


Fig. 1

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, assonema; 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'assonema (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., ABUZUHAIH 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., MOURSRY 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., HENDRICHS 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.
- HENDRICHS 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 (Uroacarina: 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 ultrastructural 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.