



ATTI
DELLA
ACCADEMIA
NAZIONALE ITALIANA
DI ENTOMOLOGIA

RENDICONTI
Anno LX
2012



ISSN 0065-0757

TIPOGRAFIA COPPINI - FIRENZE

ATTI
DELLA
ACCADEMIA
NAZIONALE ITALIANA
DI ENTOMOLOGIA

RENDICONTI
Anno LX
2012



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
Verbalì delle adunanze del 17-18 febbraio 2012	» 9
Verbalì delle adunanze del 8-9 giugno 2012	» 15
Verbalì delle adunanze del 16-17 novembre 2012	» 21

Commemorazioni

ROMANO DALLAI – <i>Baccio Baccetti e la spermatologia comparata degli insetti</i>	» 29
PIO FEDERICO ROVERSI – <i>Ricordo di Baccio Baccetti</i>	» 43
ROBERTO POGGI – <i>In memoria di Cesare Conci (1920-2011)</i>	» 53

Tavola Rotonda su:

LA TIGNOLA DEL POMODORO, TUTA ABSOLUTA (MEYRICK)

CARMELO RAPISARDA, GAETANO SISCARO, GIOVANNA TROPEA GARZIA, LUCIA ZAPPALÀ – <i>Origine, diffusione e valenza fitosanitaria della Tignola del pomodoro, Tuta absoluta (Meyrick)</i>	» 61
LUIGI SANNINO – <i>Inquadramento sistematico e aspetti morfo-biologici di Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae)</i>	» 67
MASSIMO GIORGINI, UMBERTO BERNARDO, PAOLO ALFONSO PEDATA – <i>Il complesso dei parassitoidi di Tuta absoluta (Meyrick) in Italia</i>	» 77
LUCIA ZAPPALÀ, ANTONIO BIONDI, GAETANO SISCARO, GIOVANNA TROPEA GARZIA, KEES VAN ACHTERBERG, NICOLAS DESNEUX – <i>Adattamento di limitatori indigeni di Tuta absoluta in Italia: il parassitoide Bracon nigricans</i>	» 85
LUCIANA TAVELLA, CHIARA FERRACINI, BARBARA LETIZIA INGEGNO, MARCO MOSTI, PAOLO NAVONE, ALBERTO ALMA – <i>Adattamento di limitatori indigeni: i parassitoidi del genere Necremnus e il predatore Dicyphus errans</i>	» 95
GAVINO DELRIO, ARTURO COCCO, SALVATORE DELIPERI – <i>Prospettive e limiti dell'impiego di feromoni sessuali per la lotta contro la Tignola del pomodoro</i>	» 103
GAETANO SISCARO, ANTONIO BIONDI, KHALID HADDI, CARMELO RAPISARDA, GIOVANNA TROPEA GARZIA, LUCIA ZAPPALÀ – <i>Orientamenti di lotta integrata per il contenimento di Tuta absoluta (Meyrick) in Italia</i>	» 111
LUIGI PONTI, ANDREW PAUL GUTIERREZ, MIGUEL A. ALTIERI – <i>Holistic management of invasive species: the case study of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae)</i>	» 125
MIGUEL A. ALTIERI – <i>Insect pest Management in the agroecosystems of the future</i>	» 137

Tavola Rotonda su:

ANTAGONISTI, SIMBIONTI E NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO DEGLI INSETTI DANNOSI

FRANCESCO PENNACCHIO, BARBARA GIORDANA – <i>Interazioni multitrofiche degli insetti e nuove strategie di controllo</i>	» 147
MATTEO LORITO, FELICE SCALA – <i>Le biotecnologie per la difesa delle piante in accordo con la nuova direttiva UE 2009/128 sull'uso sostenibile dei pesticidi</i>	» 155
ALBERTO ALMA, ELENA GONELLA – <i>I microrganismi simbiotici: una risorsa per il controllo di agenti patogeni e insetti dannosi</i>	» 159
LUCIA RUIU, IGNAZIO FLORIS – <i>Nuove prospettive di controllo microbiologico degli insetti nocivi</i>	» 173
MORENA CASARTELLI – <i>L'intestino medio degli insetti: bersaglio e barriera dei bioinsetticidi</i>	» 177

Tavola Rotonda su:

LA RESISTENZA DEGLI INSETTI DI INTERESSE AGRARIO AGLI INSETTICIDI

EMANUELE MAZZONI, PIERO CRAVEDI – <i>La resistenza agli insetticidi dell'afide Myzus persicae (Sulzer)</i>	» 187
IAN DENHOLM – <i>Recent advances in understanding and combating insecticide resistance</i>	» 193
GIAN CARLO MANICARDI, STEFANO CASSANELLI – <i>La resistenza agli insetticidi nei lepidotteri: Cydia pomonella come caso studio</i>	» 195
CARLO DUSO, ALBERTO POZZEBON, STEFANO CASSANELLI, PAOLA TIRELLO, THOMAS VAN LEEUWEN – <i>La resistenza ai prodotti fitosanitari in acari fitofagi e predatori: esperienze e casi di studio</i>	» 201
VINCENZO NICOLA TALESA, CINZIA ANTIGNELLI, LETIZIA MEZZASOMA – <i>Ruolo delle colinesterasi nella resistenza agli insetticidi</i>	» 215
KEVIN GORMAN, NEIL MORRISON, LUKE ALPHEY – <i>Next generation insecticide resistance management: transgenic contributions</i>	» 221

ANNO ACCADEMICO

2012

CONSIGLIO DI PRESIDENZA

PRESIDENTE

DALLAI Prof. Dott. Romano

VICE-PRESIDENTE

GIORDANA Prof. Dott.sa Barbara

SEGRETARIO

CRAVEDI Prof. Dott. Piero

TESORIERE

NANNELLI Dott. Roberto

ELENCO DEGLI ACCADEMICI

ACCADEMICI EMERITI

ARZONE Prof. Dott. Alessandra	– Torino	1984
BOLCHI SERINI Prof. Dott. Graziella	– Milano	1986 - 2003
BRIOLINI Prof. Dott. Giovanni	– Bologna	1977 - 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
RIVOSCHI Prof. Dott. Leo	– Roma	1987 - 2003
SOLINAS Prof. Dott. Mario	– Perugia	1978
ZANGHERI Prof. Dott. Sergio	– Padova	1970 - 1977

ACCADEMICI ORDINARI

BARBAGALLO Prof. Dott. Sebastiano	– Catania	1982
BARONIO Prof. Piero	– Bologna	2001 - 2012
BIN Prof. Dott. Ferdinando	– Perugia	1998 - 2002
BINAZZI Dott. Andrea	– Firenze	1998 - 2012
BOLOGNA Prof. Marco	– Roma	2001 - 2008
BONVICINI PAGLIAI Prof. Dott. Anna	– Modena	1983 - 2001
BULLINI Prof. Dott. Luciano	– Roma	1986
CASALE Prof. Dott. Achille	– Sassari	1996 - 2002
COVASSI Dott. Marco Vittorio	– Firenze	1983 - 1997
CRAVEDI Prof. Dott. Piero	– Piacenza	1999 - 2005
DALLAI Prof. Dott. Romano	– Siena	1979 - 1982
DELRIO Prof. Dott. Gavino	– Sassari	1989 - 2000
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
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
SANTINI Prof. Dott. Luciano	– Pisa	1993 - 2000
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

ALMA Prof. Dott. Alberto	– Torino	2007
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
COLUZZI Prof. Dott. Mario (*)	– Roma	1986
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
GASPERI Prof. Dott. Giuliano	– Pavia	2005
LUCIANO Prof. Dott. Pietro	– Sassari	2009
MAINI Prof. Dott. Stefano	– Bologna	2005
MASSA Prof. Dott. Bruno	– Palermo	2011
NAZZI Prof. Francesco	– Udine	2012
OLMI Prof. Dott. Massimo	– Viterbo	2002
PELLIZZARI Prof. Dott. Giuseppina	– Padova	2011
RUSSO Prof. Dott. Agatino	– Catania	2011
VANNINI Prof. Dott. Marco	– Firenze	2003
ZAPPAROLI Prof. Marzio	– Viterbo	2012

(*) † 21 ottobre 2012.

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 17 - 18 FEBBRAIO 2012

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

SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 17 febbraio 2012, alle ore 15.00, presso la “Sala degli scheletri” al piano terra in Via Romana 17 a Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

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

Straordinari: A. BATTISTI, A. BINAZZI, E. DE LILLO, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, G. GASPERI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, G. PELLIZZARI SCALTRITI, C. RAPISARDA, A. RUSSO.

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, F. FRILLI, A. GALVAGNI, L. MASUTTI, M.M. PRINCIPI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Onorari:* J.C. VAN LENTEREN; *Ordinari:* M. BOLOGNA, A.M. BONVICINI PAGLIAI, A. CASALE, C. MALVA, M. MAZZINI, G. NUZZACI, P.F. ROVERSI, V. SBORDONI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI; *Straordinari:* A. ALMA, P. BARONIO, M. COBOLLI, M. DACCORDI, M. OLM, O. TRIGGIANI, M. VANNINI.

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

La tignola del pomodoro, Tuta absoluta (Meyrick)

Il Presidente Romano DALLAI apre la seduta pubblica e invita l'Accademico Carmelo RAPISARDA a coordinare i lavori.

Si susseguono gli interventi:

- C. RAPISARDA (Università degli Studi di Catania): *Origine, diffusione e valenza fitosanitaria della Tignola del pomodoro, Tuta absoluta (Meyrick)*.
- L. SANNINO (C.R.A., Unità di ricerca per le colture alternative al tabacco): *Inquadramento sistematico e aspetti morfo-biologici di Tuta absoluta (Meyrick)*.
- M. GIORGINI (C.N.R., Istituto per la Protezione delle Piante): *I parassitoidi di Tuta absoluta (Meyrick) in Italia*.
- L. ZAPPALÀ (Università degli Studi di Catania): *Adattamento di limitatori indigeni: il parassitoide Bracon nigricans*.
- L. TAVELLA (Università degli Studi di Torino): *Adattamento di limitatori indigeni: i parassitoidi del genere Necremnus e il predatore Dicyphus errans*.
- G. DELRIO (Università degli Studi di Sassari): *Prospettive e limiti dell'impiego di feromoni sessuali per la lotta contro la Tignola del pomodoro*.
- G. SISCARO (Università degli Studi di Catania): *Orientamenti di lotta integrata per il contenimento di Tuta absoluta (Meyrick) in Italia*.

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 2012 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 18 febbraio 2012 alle ore 10:00, presso la propria sede in Via Lanciola 12/A, Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea ordinaria alla presenza degli Accademici:

Emeriti: L. MASUTTI, M. SOLINAS;

Ordinari: S. BARBAGALLO, M. BOLOGNA, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, R. POGGI, S. RAGUSA DI CHIARA, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, S. TURILLAZZI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, M.M. PRINCIPI, S. ZANGHERI; *Ordinari:* A.M. BONVICINI PAGLIAI, A. CASALE, C. MALVA, M. MAZZINI, G. NUZZACI, V. SBORDONI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

- 1) Approvazione del verbale della seduta precedente (19 novembre 2011).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Esame e approvazione conto consuntivo anno finanziario 2011.
- 4) Varie ed eventuali.

1) APPROVAZIONE DEL VERBALE SEDUTA PRECEDENTE (29 NOVEMBRE 2011)

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea ordinaria del 19 novembre 2011, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici. Il Segretario Piero CRAVEDI segnala di aver rilevato un'inesattezza nelle date riportate sul verbale inviato agli Accademici e di aver già provveduto alla correzione. Il verbale viene approvato all'unanimità.

2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente comunica che:

- a norma dell'art. 7 del regolamento, la disponibilità di posti nelle diverse categorie di Accademici, al 30 aprile 2012 è la seguente:
 - per Accademico Ordinario: posti liberi 6;
 - per Accademico Straordinario: posti liberi 7.

3) ESAME E APPROVAZIONE CONTO CONSUNTIVO ANNO FINANZIARIO 2011

Il Presidente invita il Tesoriere NANNELLI a presentare il Conto consuntivo per l'anno 2011.

Il Tesoriere fa presente che il 7 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 2012 e il Conto consuntivo 2011.

Alla riunione non ha potuto partecipare la Dott.ssa Adele DE LUCA, Presidente del Collegio, impossibilitata a venire a Firenze a causa delle proibitive condizioni climatiche. La Dott.ssa DE LUCA ha però fatto pervenire tramite e-mail una dichiarazione di approvazione dei bilanci che aveva ricevuto in precedenza insieme agli altri membri del Collegio. Il Collegio ha quindi esaminato e ratificato sia il Bilancio preventivo 2012, già presentato nell'Assemblea del novembre 2011, sia il Conto consuntivo 2011; la dichiarazione della Dott.ssa DE LUCA è stata acclusa al verbale.

Il Tesoriere illustra quindi all'Assemblea i principali capitoli del Conto consuntivo evidenziando la notevole contrazione della disponibilità finanziaria dell'Accademia in conseguenza del soltanto parziale rimborso da parte del MIPAAF delle spese sostenute per le Tavole Rotonde effettuate nel 2011.

Completata l'illustrazione e non essendovi richieste di ulteriori dettagli, il Presidente pone in votazione il Conto consuntivo 2011 che viene approvato all'unanimità e che verrà conservato agli atti.

4) VARIE ED EVENTUALI

Nessuna

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 il dott. Luigi PONTI, dell'ENEA C.R. Casaccia Roma, a presentare la lettura dal titolo:

*Gestione di specie invasive nel quadro di una visione agro-ecologica:
il caso di Tuta absoluta (Meyrick)*

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

Il Presidente Romano DALLAI prende la parola per presentare il proprio contributo alla commemorazione del Presidente Emerito Baccio BACCETTI.

Il Presidente invita poi l'Accademico ordinario Pio Federico ROVERSI a proseguire col proprio contributo alla commemorazione del Presidente Emerito Baccio BACCETTI.

Il Presidente dà successivamente la parola all'Accademico ordinario Roberto POGGI per la commemorazione dell'Accademico emerito Cesare CONCI.

Il testo della lettura e delle tre commemorazioni verrà pubblicato sugli Atti-Rendiconti 2012.

La Seduta è tolta alle ore 12:45.

ASSEMBLEA PLENARIA

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

Alle ore 12:50 di sabato 18 febbraio 2012 il Presidente Romano DALLAI apre la Seduta alla presenza degli Accademici:

Emeriti: L. MASUTTI, M. SOLINAS;

Ordinari: S. BARBAGALLO, M. BOLOGNA, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, M. MAROLI, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, R. POGGI, S. RAGUSA DI CHIARA, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, S. TURILLAZZI;

Straordinari: A. BATTISTI, M. COBOLLI, E. DE LILLO, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, G. GASPERI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, M. OLMI, G. PELLIZZARI SCALTRITI, C. RAPISARDA, A. RUSSO.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, M.M. PRINCIPI, S. ZANGHERI; *Onorari:* J.C. VAN LENTEREN; *Ordinari:* A.M. BONVICINI PAGLIAI, A. CASALE, C. MALVA, M. MAZZINI, G. NUZZACI, V. SBORDONI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI; *Straordinari:* A. ALMA, P. BARONIO, A. BINAZZI, M. DACCORDI, O. TRIGGIANI, M. VANNINI.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

- 1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti (18-19 novembre 2011).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Proclamazione e consegna Diplomi ai nuovi Accademici Straordinari .
- 4) Fauna d'Italia.
- 5) XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (Bologna, 2013).
- 6) Premio "Marco Osella 2013".
- 7) Varie ed eventuali.

1) APPROVAZIONE DEI VERBALI DELLE SEDUTE PRECEDENTI (18-19 NOVEMBRE 2011)

Vengono esaminati i verbali della Seduta pubblica di venerdì 18 novembre 2011 e dell'Assemblea plenaria di sabato 19 novembre 2011, già inviati a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici.

I verbali vengono approvati all'unanimità.

2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente comunica che l'Accademico ordinario Piero Cravedi ha chiesto il patrocinio dell'Accademia per la IX edizione del Simposio "*La difesa antiparassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti*" che si terrà a Piacenza nel settembre 2012.

Il Consiglio di Presidenza, nella riunione del 17 gennaio 2012 ha espresso parere favorevole alla concessione del patrocinio, come già avvenuto per le precedenti edizioni del Simposio che si tiene con cadenza quinquennale.

3) PROCLAMAZIONE E CONSEGNA DIPLOMI NUOVI ACCADEMICI STRAORDINARI

Il Presidente consegna i Diplomi ai neo nominati Accademici Straordinari: Enrico DE LILLO, Anna Maria FAUSTO, Ignazio FLORIS, Bruno MASSA, Giuseppina PELLIZZARI SCALTRITI, Agatino RUSSO.

L'Assemblea si congratula con i medesimi accogliendoli con un caloroso applauso.

4) FAUNA D'ITALIA

Su invito del Presidente, l'Accademico Marco BOLOGNA, Segretario uscente del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia, prende la parola e riferisce sulla situazione.

Anzitutto presenta la situazione editoriale: il vol. 47 (Poriferi) è appena stato stampato e consegnato al Ministero dell'Ambiente (MATTM). Al contempo, il Presidente uscente del Comitato, Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI, nei prossimi giorni firmerà il rinnovo dell'intesa tra il Comitato e il MATTM per la stampa dei due volumi dell'anno in corso 2012. Tali volumi, per i quali si è ottenuto il finanziamento ministeriale, sono già pronti e verranno inviati entrambi all'Editore per la stampa nella settimana entrante o nella successiva. In particolare il volume dei Mammalia 1-Chiroptera, a cura di B. LANZA, è già in possesso del Comitato, mentre il volume degli Orthoptera, a cura dell'Accademico B. MASSA et al., sta per essere consegnato al Comitato stesso.

Per quanto riguarda il rinnovo dei membri del Comitato per il quadriennio 2012-2015, come si evince dalla lettera inviata dall'Accademico VIGNA TAGLIANTI, Presidente del Comitato, al Presidente DALLAI, erano al momento presenti in rappresentanza dell'Accademia gli Accademici BACCETTI, BARBAGALLO, BOLOGNA, CASALE e VIGNA TAGLIANTI. Gli ultimi tre sono rinnovabili, mentre è necessario sostituire Baccio Baccetti, deceduto, e Sebastiano BARBAGALLO che, pur mantenendo forte interesse alla Fauna d'Italia, ha generosamente messo a disposizione di entomologi più giovani questo incarico. Anche in questa sede sembra doveroso indirizzare un affettuoso ricordo al collega BACCETTI ed un sentito ringraziamento al collega BARBAGALLO per tutta l'attività da lui svolta per la conoscenza dell'emitterofauna italiana.

Per quanto riguarda l'Unione Zoologica Italiana, erano finora membri Ferdinando BOERO, Marco CURINI GALLETTI, Gilberto GANDOLFI, Folco GIUSTI e l'accademico Alessandro MINELLI. Anche in questo caso BOERO, Marco CURINI GALLETTI e Alessandro MINELLI sono rinnovabili, mentre si dovrà provvedere a sostituire Gilberto GANDOLFI e Folco GIUSTI, non più disponibili, e ciò avverrà nella prossima Assemblea che si svolgerà a Roma 13 marzo p.v.

In una riunione del Comitato Scientifico svoltasi a Roma il 15 luglio 2011, dopo ampia discussione, si è deciso di proporre all'Accademia, in sostituzione di Baccio BACCETTI e Sebastiano BARBAGALLO, i nominativi dell'Accademico prof. Bruno MASSA, della Facoltà di Agraria dell'Università di Palermo, ortoterologo e autore di uno dei volumi in stampa, e del prof. Marzio ZAPPAROLI, della Facoltà di Agraria dell'Università della Tuscia, specialista di Miriapodi. I nuovi nominativi che verranno proposti all'UZI, saranno quelli dei proff. Lucio BONATO di Padova e Marco OLIVERIO di Roma « Sapienza ».

I tre membri rinnovabili rappresentanti dell'Accademia (M. BOLOGNA, A. CASALE, A. VIGNA TAGLIANTI) e i due nuovi nominativi proposti (B. MASSA, M. ZAPPAROLI) vengono quindi accolti all'unanimità.

5) XXIV CONGRESSO NAZIONALE ITALIANO DI ENTOMOLOGIA (BOLOGNA 2013)

Il Presidente invita l'Accademico Stefano MAINI a riferire in merito all'organizzazione del XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. L'Accademico Stefano MAINI presenta le due possibili soluzioni alternative, premettendo che in base alla situazione economica attuale, che rende sempre più difficile ottenere aiuti finanziari da Enti pubblici e da privati, la quota di iscrizione dovrà essere con ogni probabilità più elevata di quelle delle edizioni precedenti.

Un'impostazione, suggerita dall'Accademia, prevede una quota a "pacchetto" comprendente oltre all'iscrizione al Congresso, l'albergo, i pasti, la cena sociale e la gita sociale, che faciliterebbe il rimborso spese ai congressisti strutturati. In questo caso, il Congresso potrebbe svolgersi in un'u-

nica grande struttura dislocata anche lontano da Bologna, quali ad esempio località turistiche della Riviera Romagnola o San Marino nel mese di settembre, anziché a giugno. La seconda ipotesi prevederebbe l'utilizzo delle aule universitarie situate nel centro storico di Bologna, mentre la prenotazione e la sistemazione alberghiera individuale verrebbe lasciata all'iniziativa libera dei congressisti. In questo caso, la parte organizzativa potrebbe essere affidata a un'agenzia che si assumerebbe il rischio, e l'eventuale guadagno, derivante dall'amministrazione del Congresso. Il personale dell'Università di Bologna potrebbe fornire un supporto per le scelte sia dell'agenzia sia dei preventivi e di altri aspetti organizzativi. La cena sociale e la gita, che potrebbe effettuarsi sull'Appennino tosco-romagnolo, dovrebbero essere pagati separatamente in aggiunta alla quota d'iscrizione. Il periodo del congresso potrebbe rimanere a giugno e vengono indicati i giorni 17-18-19 e 20 giugno 2013 come quelli più idonei a consentire la partecipazione senza sovrapporsi alle lezioni dei corsi universitari e delle altre scuole.

Si potrebbe allestire un sito web dell'Università di Bologna collegato con quelli dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia e della Società Entomologica Italiana.

Segue un breve dibattito da cui emergono suggerimenti anche per i temi delle Sessioni poster e delle presentazioni orali, in rapporto alle conseguenze che le diverse scelte possono avere sui costi e sull'organizzazione complessiva del Congresso.

Al termine della discussione l'Assemblea si esprime orientativamente in favore delle proposte degli organizzatori bolognesi, con l'invito a presentare al più presto al Consiglio di Presidenza una proposta articolata con un dettagliato bilancio preventivo relativo all'intero Congresso.

6) PREMIO OSELLA 2013

Il Premio Osella 2013 verrà bandito subito dopo la diffusione del primo avviso del XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia.

7) VARIE ED EVENTUALI

Nessuna

La seduta dell'Assemblea plenaria è tolta alle ore 13:30

Il Segretario
Piero CRAVEDI

Il Presidente
Romano DALLAI

VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 8 - 9 GIUGNO 2012

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

SEDUTA PUBBLICA

Venerdì 8 giugno 2012 alle ore 15:00, presso l'aula S1 della Specola (anziché presso la "Sala degli scheletri") in Via Romana 17 a Firenze, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

Ordinari: P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, R. NANNELLI, F. PENNACCHIO, R. POGGI, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, S. TURILLAZZI.

Straordinari: A. ALMA, P.A. AUDISIO, P. BARONIO, A. BATTISTI, E. DE LILLO, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, G. GASPERI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, M. OLMI, G. PELLIZARI, C. RAPISARDA.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, F. PEGAZZANO, M. M. PRINCIPI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Ordinari:* S. BARBAGALLO, M.A. BOLOGNA, A. CASALE, C. MALVA, M. MAROLI, M. MAZZINI, A. MINELLI, S. RAGUSA DI CHIARA, L. SANTINI, L. SÜSS, A. VIGNA TAGLIANTI; *Onorari:* J.C. VAN LERTEREN; *Straordinari:* A. BINAZZI, P. BRANDMAYR, M. COLUZZI, M. DACCORDI, A. RUSSO, O. TRIGGIANI.

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

Il tema della Tavola Rotonda verte su:

Antagonisti, simbiotici e nuove strategie di controllo

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

– Accademico Francesco PENNACCHIO: *introduzione*

Si susseguono gli interventi

- Accademici Francesco PENNACCHIO e Barbara GIORDANA: *Interazioni multitrofiche degli insetti e nuove strategie di controllo.*
- Prof. Matteo LORITO (Università di Napoli "Federico II"): *Microrganismi benefici per il controllo di importanti fitopatie: nuove strategie e prodotti di ultima generazione.*
- Accademico Alberto ALMA: *I microrganismi simbiotici: una risorsa per il controllo di agenti patogeni e insetti dannosi.*
- Dott. Luca RUIU (Università di Sassari) e Accademico Ignazio FLORIS: *Nuove prospettive di controllo microbiologico di insetti nocivi.*
- Dott.ssa Morena CASARTELLI (Università di Milano): *L'intestino medio degli insetti: bersaglio e barriera dei bioinsetticidi.*

Segue un'interessante discussione, al termine della quale la Seduta si conclude alle ore 18,30. I testi delle relazioni verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2012 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 9 giugno 2012 alle ore 10:00, a Firenze via Lanciola 12/A, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea ordinaria.

Sono presenti gli Accademici:

Ordinari: S. BARBAGALLO, M.A. BOLOGNA, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, F. PENNACCHIO, R. POGGI, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI.

Onorari: M.A. ALTIERI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, M. M. PRINCIPI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Ordinari:* C. MALVA, M. MAROLI, A. MINELLI, S. RAGUSA DI CHIARA, L. SÜSS; *Onorari:* J.C. VAN LENTEREN.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno.:

- 1) Approvazione del verbale della seduta precedente (18 febbraio 2012)
- 2) Comunicazioni del Presidente
- 3) Varie ed eventuali

1) APPROVAZIONE DEL VERBALE DELLA SEDUTA PRECEDENTE (18 FEBBRAIO 2012)

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea ordinaria del 18 febbraio 2012, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici, che viene approvato all'unanimità.

2) Comunicazioni del Presidente

Il Presidente comunica che:

- a) a norma di Statuto (Art. 12) e Regolamento (Art. 7), a fronte di 6 posti disponibili per Accademico Ordinario e 7 per Accademico Straordinario, sono pervenute le seguenti proposte per nuovi Accademici, per essere votate nell'Assemblea ordinaria di novembre 2012:

Quattro proposte per Accademico Ordinario per gli Accademici Straordinari:

- Alberto ALMA, presentato dagli Accademici Alessandra ARZONE, Sebastiano BARBAGALLO, Achille CASALE, Luciano SÜSS.
- Mario COLUZZI, presentato dagli Accademici Augusto VIGNA TAGLIANTI, Valerio SBORDONI, Michele MAROLI, Marco A. BOLOGNA.
- Giuliano GASPERI, presentato dagli Accademici Luciano SÜSS, Francesco PENNACCHIO, Carla MALVA.
- Massimo OLMI, presentato dagli Accademici Luciano SANTINI, Salvatore RAGUSA DI CHIARA, Roberto POGGI, Achille CASALE.

Cinque proposte per Accademico Straordinario per i Signori:

- Prof. Maurizio BIONDI, Università di L'Aquila, presentato dagli Accademici Marco A. BOLOGNA, Alessandro MINELLI, Roberto POGGI, Augusto VIGNA TAGLIANTI.
- Prof. Rita CERVO, Università di Firenze, presentata dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Santi LONGO, Franco FRILLI.
- Prof. Francesco FRATI, Università di Siena, presentato dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Alessandro MINELLI, Marco A. BOLOGNA.

- Dott. Francesco NAZZI, Università di Udine, presentato dagli Accademici Franco FRILLI, Francesco PENNACCHIO, Mario SOLINAS.
- Prof. Marzio ZAPPAROLI, Università della Tuscia presentato dagli Accademici Augusto VIGNA TAGLIANTI, Marco A. BOLOGNA, Achille CASALE, Alessandro MINELLI, Luciano SANTINI.

- b) in seguito alle difficoltà incontrate e più volte rese note al Consiglio di Presidenza e a questa Assemblea dagli Accademici Piero BARONIO e Stefano MAINI circa i loro ripetuti tentativi di avviare l'organizzazione a Bologna del XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, il Consiglio di Presidenza dell'Accademia, pur apprezzando l'impegno degli Accademici menzionati e dopo ampie e ripetute discussioni, è giunto alla conclusione che è necessario ripensare e rivedere i criteri informativi dei prossimi Congressi Nazionali di Entomologia. Occorre innanzi tutto valutare l'opportunità di una frequenza biennale, considerare che i costi di partecipazione sono sempre più elevati a fronte di sempre più scarse risorse a disposizione dei ricercatori e tenere conto della diminuita considerazione come pubblicazione dei poster e delle comunicazioni a Congressi.

Per queste ed altre motivazioni, il Consiglio di Presidenza propone di sospendere l'organizzazione del XXIV Congresso previsto per il 2013 in attesa di affrontare serenamente lo studio, insieme alla Società Entomologica Italiana, di una nuova e più realistica impostazione dei nostri futuri Congressi Nazionali, soprattutto al fine di privilegiare la partecipazione dei giovani entomologi, unitamente alla ricerca di soluzioni logistiche che favoriscano socializzazione, cointeresse e concreta collaborazione tra tutti i partecipanti.

L'Assemblea accoglie favorevolmente e fa proprie le considerazioni e le proposte del Presidente.

- c) è arrivata al Presidente una lettera, indirizzata anche al Presidente della Società Entomologica Italiana, Accademico Francesco PENNACCHIO (presente in Assemblea), da parte dell'Associazione Precari della Ricerca Italiani (APRI), in merito all'esito di un recente Concorso per un posto di Ricercatore del settore scientifico disciplinare AGR 11. Viene data lettura della lettera, alla quale i Presidenti dell'Accademia e della Società Entomologica Italiana invieranno congiuntamente una risposta il cui testo (All. 1) viene formulato su una bozza preparata dai medesimi e tenendo conto anche di commenti e suggerimenti in merito espressi in Assemblea da alcuni Accademici tra i quali Sebastiano BARBAGALLO, Marco A. BOLOGNA e Gavino DELRIO.

La seduta dell'Assemblea ordinaria è tolta alle ore 10,40

Il Segretario
Piero CRAVEDI

Il Presidente
Romano DALLAI

SEDUTA PUBBLICA

Alle ore 10,45 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 Onorario Miguel Angel ALTIERI per la lettura:

Managing insect pests in the agroecosystems of the future

Il testo della lettura verrà pubblicato sugli Atti-Rendiconti 2012.

La Seduta pubblica si conclude alle ore 11:50

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 9 giugno 2012 alle ore 11,50 il Presidente apre la seduta alla presenza degli Accademici:

Ordinari: S. BARBAGALLO, M. BOLOGNA, P. CRAVEDI, R. DALLAI, G. DELRIO, B. GIORDANA, S. LONGO, F. PENNACCHIO, R. POGGI, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI.

Onorari: M.A. ALTIERI.

Straordinari: P.A. AUDISIO, P. BARONIO, A. BATTISTI, E. DE LILLO, A.M. FAUSTO, I. FLORIS, G. GASPERI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, M. OLMI, C. RAPISARDA.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, F. FRILLI, A. GALVAGNI, M.M. PRINCIPI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Ordinari:* C. MALVA, M. MAROLI, A. MINELLI, S. RAGUSA DI CHIARA, L. SÜSS; *Onorari:* J.C. VAN LERTEREN; *Straordinari:* A. BINAZZI, M. DACCORDI, G. PELLIZZARI, A. RUSSO, O. TRIGGIANI.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

- 1) Approvazione dei verbali delle sedute precedenti (17 e 18 febbraio 2012).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Fauna d'Italia.
- 4) Varie ed eventuali.

1) APPROVAZIONE DEI VERBALI DELLE SEDUTE PRECEDENTI (17 E 18 FEBBRAIO 2012)

Vengono esaminati i verbali della Seduta pubblica del 17 febbraio e dell'Assemblea plenaria del 18 febbraio 2012, già inviati a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici, che vengono approvati all'unanimità.

2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente informa che:

- a) in seguito alle difficoltà incontrate e più volte rese note al Consiglio di Presidenza e anche a questa Assemblea dagli Accademici Piero BARONIO e Stefano MAINI circa i loro ripetuti tentativi di avviare l'organizzazione a Bologna del XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, il Consiglio di Presidenza dell'Accademia, pur apprezzando l'impegno degli Accademici menzionati, si è persuaso che tante cose nel tempo sono cambiate e che sembra necessario ripensare e rivedere i criteri informativi dei prossimi Congressi Nazionali di Entomologia. Occorre innanzi tutto valutare l'opportunità di una frequenza biennale, considerare che i costi di partecipazione sono sempre più elevati a fronte di sempre più scarse risorse a disposizione dei ricercatori e tenere conto della diminuita considerazione come pubblicazione dei poster e delle comunicazioni a Congressi.

Per queste ed altre motivazioni, il Consiglio di Presidenza propone di sospendere l'organizzazione del XXIV Congresso previsto per il 2013 in attesa di affrontare serenamente lo studio, insieme alla Società Entomologica Italiana, di una nuova e più realistica impostazione dei nostri futuri Congressi Nazionali, soprattutto al fine di privilegiare la partecipazione dei giovani entomologi, unitamente alla ricerca di soluzioni logistiche che favoriscano socializzazione, cointeresse e concreta collaborazione tra tutti i partecipanti.

La problematica sarà affrontata in collaborazione con la Società Entomologica Italiana con cui è prevista, tra l'altro, la costituzione di un Comitato Organizzatore Permanente dei Congressi Nazionali di Entomologia.

b) Nel giugno 2013, in sostituzione del Congresso Nazionale Italiano di Entomologia è prevista una Tavola Rotonda dedicata ai Coccoidei che sarà coordinata dalla Accademica Giuseppina PELLIZZARI.

c) Su invito del Presidente l'Accademico Stefano TURILLAZZI illustra brevemente lo stato di avanzamento del "5th Congress – European Sections of the I.U.S.S.I" che si terrà a Montecatini Terme dal 26 al 30 agosto 2012. Il numero degli iscritti è elevato, così come quelli delle comunicazioni orali e dei poster per cui ci sono ottime premesse per la buona riuscita dell'importante evento internazionale.

L'Accademico TURILLAZZI informa inoltre che nei giorni 17 e 18 maggio scorsi si è tenuto a Como il VI Corso di Allergologia e Dermatologia Entomologiche. Il Corso è stato molto apprezzato dai partecipanti per cui si sta valutando la possibilità di ripeterlo in altre sedi.

d) Il Presidente Romano DALLAI invita l'Accademico Francesco PENNACCHIO a riferire in merito alle iniziative programmate nell'ambito dell'European PhD Network in "Insect Science e alla proposta di Istituzione di una nuova rivista italiana di entomologia L'Accademico F. PENNACCHIO riferisce che il meeting annuale nel 2012 si terrà in Italia ad Ivrea (Torino) dal 6 al 9 novembre. Al meeting verrà abbinato uno "Short Course on Insect Molecular Taxonomy", coordinato dal prof. Domenico BOSCO dell'Università di Torino, che si terrà nei giorni 5 e 6 novembre 2012.

In merito alla proposta di istituzione di una nuova rivista italiana di entomologia l'Accademico PENNACCHIO informa che l'iniziativa dovrebbe essere promossa congiuntamente dalla Società Entomologica Italiana e dall'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia. Obiettivo della rivista sarà quello di rappresentare l'intera comunità scientifica entomologica italiana e la sua dimensione scientifica internazionale. La Costituzione di un comitato editoriale di valore e rilievo internazionale sarà il primo importante passo da compiere. La pubblicazione è prevista online e potrebbe iniziare già dal 2013.

3) FAUNA D'ITALIA

Su invito del Presidente, l'Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI, Presidente uscente del Comitato Scientifico per la Fauna d'Italia, prende la parola e riferisce sulla situazione.

Anzitutto ricorda come sia stata rinnovata in febbraio la composizione del Comitato per il quadriennio 2012-2015: i cinque rappresentanti dell'Accademia, votati nell'Assemblea del 28 febbraio, sono Marco A. BOLOGNA, Achille CASALE, Bruno MASSA, Augusto VIGNA TAGLIANTI e Marzio ZAPPAROLI. I cinque rappresentanti dell'Unione Zoologica Italiana, votati nell'Assemblea del 3 marzo, sono Ferdinando BOERO, Lucio BONATO, Marco CURINI GALLETTI, Alessandro MINELLI e Marco OLIVERIO.

Il prossimo 15 giugno si riunirà a Roma il nuovo Comitato per le nomine del Presidente e del Segretario-Tesoriere e per la organizzazione del piano editoriale del quadriennio 2012-2015.

Nel frattempo è stato stampato (dicembre 2011) e le relative 1000 copie consegnate al Ministero per l'Ambiente (febbraio 2012) il volume 46, Porifera I, a cura di M. PANSINI, R. MANCONI e R. PRONZATO, di XI + 554 pp., di cui 16 tavole a colori, il primo della collana completamente in inglese, come si era deciso di fare, almeno per le faune marine.

I volumi previsti per il 2012 sono già in seconde bozze: il volume 47, Mammalia I - Chiroptera, di B. LANZA, di 912 pp. (con 183 gruppi di figure nel testo e 64 tavole a colori); 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, di 448 pp. (con 48 tavv. b/n e 48 tavole a colori e DVD allegato) e saranno pubblicati entro l'estate.

4) VARIE ED EVENTUALI.

Nessuna

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

Il Segretario
Piero CRAVEDI

Il Presidente
Romano DALLAI

25 giugno 2012

Al Presidente
APRI – Associazione Precari della Ricerca Italiani
SEDE

Egregio Presidente,

in qualità di Presidenti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia e della Società Entomologica Italiana (SEI), abbiamo comunicato agli organi di governo dei nostri enti di aver ricevuto un messaggio dall'Associazione Precari della Ricerca Italiani, contenente una petizione per la trasparenza e meritocrazia nei concorsi universitari in Italia, con particolare riferimento all'esito della procedura di valutazione comparativa per un posto di ricercatore universitario per il settore scientifico-disciplinare AGR/11- Entomologia generale e applicata.

Questo documento, e il delicato problema in esso sollevato, ha offerto l'occasione per una riflessione generale sui principi di valutazione del merito scientifico, ampiamente condivisa, che viene qui di seguito sintetizzata.

Compito dell'Accademia e della SEI è quello di promuovere la conoscenza dell'Entomologia in tutti i suoi diversi aspetti, favorendone la diffusione nella società e fra i giovani in particolare, stimolandoli ad avvicinarsi alla Scienza con entusiasmo e serietà. Le nostre Comunità scientifiche devono rappresentare un punto di riferimento sicuro, capace di fornire serenità e stabilità, attraverso operazioni di chiarezza che partano dal loro interno.

L'Accademia e la SEI fanno voti che il merito scientifico, nella sua globalità, sia riconosciuto come elemento discriminante per la valutazione di un ricercatore. Non sembra inutile ribadire con forza questa affermazione, apparentemente ovvia, affinché vengano sempre adottati comportamenti non solo formalmente ma, soprattutto, sostanzialmente ispirati da questo principio, per una condivisione leale di valori di fondo non negoziabili o interpretabili in modo soggettivo.

L'Accademia e la SEI ritengono che una valida crescita sociale sia possibile solo attraverso la selezione e promozione dei giovani più meritevoli. Ciò deve essere perseguito non solo senza discrezionalità, ma adottando anche tutte le azioni possibili per rendere trasparente il proprio operato.

La petizione ricevuta e il risultato dalla discussione collegiale sono stati acquisiti agli atti ufficiali dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia e della Società Entomologica Italiana.

Accademia Nazionale Italiana di Entomologia
Il Presidente
Romano DALLAI

Società Entomologica Italiana
Il Presidente
Francesco PENNACCHIO

VERBALI DELLE ADUNANZE DEL 16 - 17 NOVEMBRE 2012

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

SEDUTA PUBBLICA

Il giorno 16 novembre 2012 alle ore 15:00, presso l'aula S1 del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica "Leo Pardi" dell'Università di Firenze, via Romana 17, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori della Seduta Pubblica.

Sono presenti gli Accademici:

Emeriti: F. FRILLI, G. OSELLA;

Ordinari: S. BARBAGALLO, P. BARONIO, A. BINAZZI, A. CASALE, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, B. GIORDANA, S. LONGO, C. MALVA, M. MAROLI, A. MINELLI, R. NANNELLI, G. NUZZACI, F. PENNACCHIO, S. RAGUSA DI CHIARA, C. RAPISARDA, G. ROTUNDO, L. SANTINI, L. SÜSS, O. TRIGGIANI, S. TURILLAZZI;

Straordinari: A. ALMA, A. BATTISTI, E. DE LILLO, A.M. FAUSTO, G. GASPERI, P. LUCIANO, S. MAINI, B. MASSA, G. PELLIZZARI, A. RUSSO.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* A. ARZONE, G. BOLCHI SERINI, A. GALVAGNI, L. MASUTTI, M.M. PRINCIPI, M. SOLINAS, S. ZANGHERI; *Ordinari:* M.A. BOLOGNA, M. MAZZINI, R. POGGI, P. F. ROVERSI, V. SBORDONI, A. VIGNA TAGLIANTI; *Onorari:* H.L.G. STROYAN; *Straordinari:* M. COBOLLI, M. DACCORDI, L. DE MARZO.

Tema della Tavola Rotonda:

La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi

Il Presidente Romano DALLAI apre la seduta Pubblica e invita l'Accademico Piero CRAVEDI a introdurre e coordinare i lavori.

Dopo l'introduzione dell'Accademico CRAVEDI si susseguono gli interventi:

- Dott. Ian DENHOLM (Rothamsted Research U.K.): *Recent advances in understanding and combating insecticide resistance.*
- Prof. Vincenzo TALESA (Università di Perugia): *Ruolo delle colinesterasi nella resistenza agli insetticidi.*
- Dott. Emanuele MAZZONI, Accademico Piero CRAVEDI (Università Cattolica del Sacro Cuore-Piacenza): *La resistenza agli insetticidi nei Rincoti Omotteri.*
- Prof. Giancarlo MANICARDI (Università di Modena e Reggio Emilia): *La resistenza in Cydia pomonella e in altri Lepidotteri.*
- Prof. Carlo DUSO (Università di Padova): *La resistenza agli acaricidi.*
- Dott. Kevin GORMAN (Oxitec Ltd, Abingdon, Oxford U.K.): *Next generation insecticides, resistance management-transgenic contributions.*

Segue un' interessante discussione, al termine della quale la seduta si conclude alle ore 18:15. I testi delle relazioni verranno pubblicati sugli Atti-Rendiconti 2012 dell'Accademia.

Il Segretario
Piero CRAVEDI

Il Presidente
Romano DALLAI

ASSEMBLEA PLENARIA
SABATO 17 NOVEMBRE 2012

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

Alle ore 09:30, presso l'aula S 1 del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica "Leo Pardi" dell'Università di Firenze, via Romana 17, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea Plenaria, alla presenza degli Accademici:

Emeriti: A. Arzone, F. FRILLI; L. MASUTTI, G. Osella, M. SOLINAS;

Ordinari: P. BARONIO, A. BINAZZI, M. A. BOLOGNA, A. CASALE, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, B. GIORDANA, S. LONGO, C. MALVA, M. MAROLI, A. MINELLI, R. NANNELLI, G. NUZZACI, F. PENNACCHIO, S. RAGUSA DI CHIARA, C. RAPISARDA, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, L. SÜSS, O. TRIGGIANI, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI;

Straordinari: A. ALMA, P. A. AUDISIO, E. DE LILLO, A.M. FAUSTO, G. GASPERI, B. MASSA, G. PELLIZZARI, A. RUSSO.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* G. BOLCHI SERINI, A. GALVAGNI; *Ordinari:* M. MAZZINI, R. POGGI, V. SBORDONI; *Onorari:* H.L.G. STROYAN; *Straordinari:* A. BATTISTI, M. COBOLLI, M. DACCORDI, L. DE MARZO, P. LUCIANO.

Viene discusso il seguente Ordine del Giorno:

- 1) Approvazione del verbale della seduta precedente (8 e 9 giugno 2012).
- 2) Comunicazioni del Presidente.
- 3) Proclamazione e consegna Diplomi nuovi Accademici Ordinari: Piero BARONIO, Andrea BINAZZI, Carmelo RAPISARDA, Oreste TRIGGIANI.
- 4) Fauna d'Italia.
- 5) Programma definitivo Attività sedute pubbliche per A.A. 2013.
- 6) Varie ed eventuali.

1) APPROVAZIONE DEL VERBALE SEDUTA PRECEDENTE (9 GIUGNO 2012)

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea Plenaria del 9 giugno 2012, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici, che viene approvato all'unanimità.

2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente comunica la recente scomparsa dell'Accademico Straordinario Mario COLUZZI e invita l'Assemblea ad osservare un minuto di raccoglimento.

L'Accademico Mario COLUZZI, da tempo gravemente ammalato, era stato proposto per l'elezione ad Accademico Ordinario in considerazione della sua riconosciuta autorevolezza scientifica. La notizia della sua scomparsa suscita partecipazione e commozione.

Il Presidente prosegue comunicando che: dal 26 al 30 agosto si è tenuto a Montecatini il "5th Congress of the European Sections of the IUSSI" e invita gli Accademici Stefano TURILLAZZI e Roberto NANNELLI a riferire in merito. L'Accademico Stefano TURILLAZZI riferisce circa il buon risultato scientifico dell'evento che ha avuto un elevato numero di partecipanti e comunicazioni di rilevato interesse. L'Accademico Roberto NANNELLI membro del Comitato Organizzatore e Tesoriere dell'Accademia interviene informando che come già comunicato nell'Assemblea dello scorso giugno l'Accademia ha gestito in collaborazione con l'agenzia MDB Enterprise di Taranto la parte amministrativa del "5th Congress of the European Sections of the IUSSI" (Montecatini, 26-30 agosto 2012). Con tale Agenzia erano già stati organizzati in precedenza con buoni risulta-

ti i corsi della Scuola di Alta Formazione “Marcello La Greca”. Sono state incassate le quote d’iscrizione versate sia tramite bonifico bancario a favore dell’Accademia, sia attraverso carta di credito mediante POS (e-commerce) appositamente attivato nei mesi precedenti presso la banca tesoriere dell’Accademia (MPS di Siena). L’Accademia ha poi provveduto a pagare le spese organizzative (gravate da IVA 21%) e di soggiorno dei numerosi iscritti e degli “Invited speakers” (gravate da IVA 10%). Non è stato ancora possibile definire il bilancio economico dell’evento in quanto il Commercialista dell’Accademia incaricato di gestire la fatturazione e i relativi versamenti IVA completerà l’operazione on-line entro la metà di dicembre e il risultato verrà inserito nel bilancio consuntivo 2012 dell’Accademia. Si prevede un margine positivo di 3000 - 4000 Euro.

Il Presidente sottolinea l’importanza di incrementare l’attività culturale dell’Accademia e sollecita la presentazione di nuove proposte.

L’Accademico Pio Federico ROVERSI, chiesta e ottenuta la parola, propone di considerare la possibilità di organizzare corsi intensivi di formazione di Entomologia estesi anche al settore della Nematologia Agraria e Forestale da predisporre congiuntamente con la Società Italiana di Nematologia.

Il Presidente comunica che per il prossimo anno è previsto l’avvio di una nuova rivista di Entomologia e invita l’Accademico Francesco Pennacchio, Presidente della società Entomologica Italiana, a illustrare l’iniziativa editoriale.

L’Accademico Francesco PENNACCHIO ottenuta la parola comunica che l’Accademia Nazionale Italiana di Entomologia e la Società Entomologica Italiana, con diverse riunioni nel 2012 fra membri dei rispettivi consigli direttivi, hanno programmato per il 2013 il lancio di una nuova rivista internazionale, che vuole essere rappresentativa dell’intera comunità scientifica entomologica italiana. Il titolo di questa rivista è “Entomologia”, un termine latino che nella sua semplicità e ampiezza vuole riflettere la multidisciplinarietà dei contenuti e denotare l’origine Italiana di questa iniziativa. La rivista è organizzata in 10 sezioni, con comitato editoriale molto ampio, per metà costituito da studiosi italiani e per il resto da stranieri di tutto il mondo. Si prevede di poter sostenere i costi della sola pubblicazione on-line (orientativamente 4500 euro/anno), mediante un contributo volontario da parte degli autori titolari di fondi di ricerca (orientativamente 300 euro ad articolo). In fase di avvio sembrerebbe opportuno prevedere il pagamento solo per gli autori italiani, ma qualora ci fossero dei residui passivi da coprire, l’Accademia e la SEI s’impegnano a provvedere a tale spesa. L’editore di questa nuova rivista sarebbe la Pagepress di Pavia, con cui verrà attivato a breve relativo contratto.

3) PROCLAMAZIONE E CONSEGNA DIPLOMI NUOVI ACCADEMICI ORDINARI: PIERO BARONIO, ANDREA BINAZZI, CARMELO RAPISARDA, ORESTE TRIGGIANI

Il Presidente consegna i Diplomi di Accademico Ordinario ai neoletti Piero BARONIO, Andrea BINAZZI, Carmelo RAPISARDA e Oreste TRIGGIANI.

L’assemblea si congratula con i neoletti Ordinari, accogliendoli con un caloroso applauso.

4) FAUNA D’ITALIA

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

Ricorda in primo luogo come il Comitato per il quadriennio 2012-2015 sia costituito da cinque rappresentanti dell’Accademia (Marco A. BOLOGNA, Achille CASALE, Bruno MASSA, Augusto VIGNA TAGLIANTI e Marzio ZAPPAROLI, votati nell’Assemblea del 28 febbraio) e da cinque rappresentanti dell’Unione Zoologica Italiana (Ferdinando BOERO, Lucio BONATO, Marco CURINI GALLETTI, Alessandro MINELLI e Marco OLIVERIO, votati nell’Assemblea del 3 marzo) e come nella riunione dello scorso 15 giugno a Roma sia stato confermato Presidente Augusto VIGNA TAGLIANTI e nominato Segretario-Tesoriere Marzio ZAPPAROLI.

Nella stessa riunione del Comitato si è discussa la organizzazione del piano editoriale del quadriennio 2012-2015.

I due volumi previsti per il 2012 sono stati pubblicati entro l’estate, come da impegno con il

Ministero per l'Ambiente, e vengono presentati all'Assemblea. Si tratta del volume 47, Mammalia I - Chiroptera, di B. Lanza, di xiv + 786 pp. (con 183 gruppi di figure nel testo e 47 tavole a colori) (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, di cciv + 563 pp. (con 122 tavv. a colori e DVD allegato) (stampato a fine agosto).

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

Purtroppo però il futuro sviluppo del piano editoriale non è assolutamente chiaro: con l'avvenuto pensionamento del dott. Alessandro LA POSTA, dirigente della Direzione Protezione della Natura, che si è sempre prodigato per lo sviluppo della editoria scientifica e naturalistica a livello ministeriale, con grande passione e capacità, ed ha sempre appoggiato la attività del Comitato, si è aperto un periodo nuovo, ed ancora oscuro, nei rapporti del CSFI con il Ministero.

Per ora pertanto si devono attendere le nuove nomine dirigenziali, per poter proporre l'eventuale rinnovo dell'Accordo di programma e la eventuale prosecuzione e sopravvivenza della stessa collana "Fauna d'Italia".

5) PROGRAMMA DEFINITIVO SEDUTE PUBBLICHE PER L'A.A. 2013

Il Presidente conferma che nel 2013 le Adunanze dell'Accademia si terranno il 15 e 16 febbraio, il 7 e 8 giugno e il 15 e 16 novembre.

- Nella Seduta Pubblica di venerdì 15 febbraio è prevista una Tavola Rotonda su "Salute degli Apoidei: dai geni alla colonia". Il coordinamento della Tavola Rotonda è stato affidato agli Accademici Franco FRILLI e Francesco PENNACCHIO.
- In occasione delle Adunanze di sabato 16 febbraio è prevista una Seduta Pubblica in cui l'Accademico Bruno MASSA presenterà la lettura su "Importanza della bioacustica nella sistematica degli Ortoteri".
- Nella Seduta Pubblica di venerdì 7 giugno è prevista una Tavola Rotonda su "Cocciniglie dei fruttiferi, agrumi e vite: problematiche emergenti" affidata agli Accademici Giuseppina PELLIZZARI e Agatino RUSSO.
- In occasione delle Adunanze di sabato 8 giugno è prevista una Seduta Pubblica in cui l'Accademico Andrea BATTISTI terrà una lettura su "Insetti e cambiamento climatico". In tale occasione è prevista anche la commemorazione dell'Accademico Mario COLUZZI da parte prof. Gilberto CORBELLINI dell'Università di Roma "Sapienza". Nella seconda metà di ottobre è prevista l'organizzazione, a Firenze, di una giornata di studio, a cura degli Accademici Romano DALLAI e Stefano TURILLAZZI su "Zoratteri e altri Ordini minori".
- 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.
- In occasione delle Adunanze di sabato 16 novembre è prevista una Seduta Pubblica in cui l'Accademica Anna Maria FAUSTO presenterà una lettura sulla riproduzione degli insetti dal titolo: "Le strutture annesse all'apparato riproduttore di insetti di interesse agrario e sanitario: morfologia e funzione".

Il Presidente evidenzia l'opportunità di iniziare a programmare l'attività culturale dell'Accademia anche per il 2014 e rivolge pertanto a tutti gli Accademici l'invito a proporre tematiche da sviluppare.

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

- *Controllo integrato e biologico (mediante artropodi fitofagi) delle piante infestanti.* L'Accademico Enrico DE LILLO assicura la disponibilità a organizzare una Tavola Rotonda nel febbraio 2014.
- *Insetti vettori di malattie dell'uomo e degli animali domestici.* Gli Accademici Anna Maria FAUSTO e Michele MAROLI si impegnano a coordinare nel mese di giugno una Tavola Rotonda da dedicare all'Accademico Mario COLUZZI Studioso di chiara fama internazionale su tale argomento.

- *Insetti vettori di malattie delle piante*. L'Accademico Alberto ALMA assicura la disponibilità a organizzare una Tavola Rotonda in occasione delle Adunanze di novembre.

L'attività culturale del 2014 verrà arricchita inoltre da sedute Pubbliche con letture di cui verranno successivamente individuati temi e relatori.

6) VARIE ED EVENTUALI

Nessuna

La seduta dell'Assemblea Plenaria è tolta alle ore 11:10

Il Segretario
Piero CRAVEDI

Il Presidente
Romano DALLAI

ASSEMBLEA ORDINARIA
SABATO 17 NOVEMBRE 2012
Presiede il Presidente prof. Romano DALLAI
Segretario verbalizzante: il Segretario prof. Piero CRAVEDI.

Il giorno 17 novembre 2012 alle ore 11.15, presso l'aula S 1 del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica "Leo Pardi" dell'Università di Firenze, via Romana 17, come da convocazione del Presidente, iniziano i lavori dell'Assemblea Ordinaria, alla presenza degli Accademici:

Emeriti: A. Arzone, F. FRILLI; L. MASUTTI, G. Osella, M. SOLINAS.

Ordinari: P. BARONIO, A. BINAZZI, M. A. BOLOGNA, A. CASALE, M.V. COVASSI, P. CRAVEDI, R. DALLAI, B. GIORDANA, S. LONGO, C. MALVA, M. MAROLI, A. MINELLI, R. NANNELLI, G. NUZZACI, F. PENNACCHIO, S. RAGUSA DI CHIARA, C. RAPISARDA, G. ROTUNDO, P.F. ROVERSI, L. SANTINI, L. SÜSS, O. TRIGGIANI, S. TURILLAZZI, A. VIGNA TAGLIANTI.

Hanno giustificato la propria assenza gli Accademici: *Emeriti:* G. BOLCHI SERINI, A. GALVAGNI; *Ordinari:* M. MAZZINI, R. POGGI, V. SBORDONI.

Viene discusso il seguente Ordine del giorno:

- Approvazione verbale seduta precedente (9 giugno 2012).
- Comunicazioni del Presidente.
- Esame e approvazione Bilancio preventivo 2013.
- Votazioni per l'elezione nuovi Accademici Ordinari.
- Votazione per l'elezione nuovi Accademici Straordinari.
- Votazione per la conferma Accademici Straordinari in scadenza (quinquennio 2007-2012).
- Varie ed eventuali.

1) APPROVAZIONE VERBALE DELLA SEDUTA PRECEDENTE (9 GIUGNO 2012)

Viene esaminato il verbale dell'Assemblea Plenaria del 9 giugno 2012, già inviato a suo tempo per posta elettronica a domicilio degli Accademici, che viene approvato all'unanimità.

2) COMUNICAZIONI DEL PRESIDENTE

Il Presidente dichiara che non vi sono comunicazioni.

3) ESAME E APPROVAZIONE BILANCIO PREVENTIVO A.F. 2013

Su invito del Presidente, il Tesoriere Roberto NANNELLI informa 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 rilevi 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 2013, in cui dovrà essere ratificato anche il Bilancio consuntivo 2012.

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 2013.

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

4) VOTAZIONI PER ELEZIONE NUOVI ACCADEMICI ORDINARI

Il Presidente ricorda che, a norma dell'art. 7 del regolamento, alla data del 30 aprile 2012 erano liberi 6 posti per Accademico Ordinario e che entro tale data sono pervenute a norma di Statuto (art. 12) le proposte di nomina ad Accademico Ordinario degli Accademici Straordinari:

- Alberto ALMA, presentato dagli Accademici Alessandra ARZONE, Sebastiano BARBAGALLO, Achille CASALE, Luciano SÜSS;
- Mario COLUZZI presentato dagli Accademici Augusto VIGNA TAGLIANTI, Valerio SBORDONI, Michele MAROLI, Marco A. BOLOGNA;
- Giuliano GASPERI presentato dagli Accademici Francesco PENNACCHIO, Barbara GIORDANA, Luciano SÜSS, Carla MALVA;
- Massimo OLMI presentato dagli Accademici Luciano SANTINI, Achille CASALE, Roberto POGGI, Salvatore RAGUSA DI CHIARA.

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

Il Presidente ricorda che, come già comunicato nella precedente Assemblea Plenaria, l'Accademico Mario COLUZZI è recentemente scomparso e pertanto non può essere messo in votazione.

- a) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura dell'Accademico Straordinario Alberto ALMA. Come previsto dall'art. 12 dello Statuto l'Accademico Alessandra ARZONE illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Alberto ALMA 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 Giuliano GASPERI. Come previsto dall'art. 12 dello Statuto l'Accademico Luciano SÜSS illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Giuliano GASPERI 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 Massimo OLMI. Come previsto dall'art. 12 dello Statuto l'Accademico Luciano SANTINI illustra all'Accademia i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Massimo OLMI 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.

5) Votazioni per elezione nuovi Accademici Straordinari

Il Presidente ricorda che il 30 aprile 2012 risultavano disponibili 7 posti per Accademico Straordinario e che entro tale data sono pervenute a norma di Statuto (art. 12), le proposte di nomina ad Accademico Straordinario per:

- Prof. Maurizio BIONDI, Università di L'Aquila, presentato dagli Accademici Marco A. BOLOGNA, Alessandro MINELLI, Roberto POGGI, Augusto VIGNA TAGLIANTI.
- Prof. Rita CERVO, Università di Firenze, presentata dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Santi LONGO, Franco FRILLI.
- PROF. Francesco FRATI, Università di Siena, presentato dagli Accademici Stefano TURILLAZZI, Alessandro MINELLI, Marco A. BOLOGNA.
- Dott. Francesco NAZZI, Università di Udine, presentato dagli Accademici Franco FRILLI, Francesco PENNACCHIO, Mario SOLINAS.
- Prof. Marzio ZAPPAROLI, Università della Toscana presentato dagli Accademici Augusto VIGNA TAGLIANTI, Marco A. BOLOGNA, Achille CASALE, Alessandro MINELLI, Luciano SANTINI.

Il Presidente verificato, come da 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. Maurizio BIONDI. Come previsto dall'art. 12 c.2 l'Accademico Marco A. BOLOGNA illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Maurizio BIONDI Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2012-2017.

- b) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del Prof. Rita CERVO. Come previsto dall'art. 12 c.2 l'Accademico Stefano TURILLAZZI illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici della candidata.

La candidata raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Rita CERVO Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2012-2017.

- c) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del PROF. Francesco FRATI. Come previsto dall'art. 12 c.2 l'Accademico Alessandro MINELLI illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Francesco FRATI Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2012-2017.

- d) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del Dott. Francesco NAZZI. Come previsto dall'art. 12 c.2 l'Accademico Franco FRILLI illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Francesco NAZZI Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2012-2017.

- e) Viene portata in votazione a scrutinio segreto la candidatura del Prof. Marzio ZAPPAROLI. Come previsto dall'art. 12 c.2 l'Accademico Augusto VIGNA TAGLIANTI illustra all'Assemblea i meriti scientifici e accademici del candidato.

Il candidato raggiunge il quorum richiesto e il Presidente proclama Marzio ZAPPAROLI Accademico Straordinario dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia per il quinquennio 2012-2017.

6) VOTAZIONI PER CONFERMA ACCADEMICI STRAORDINARI IN SCADENZA QUINQUENNALE 2007-2012

Il Presidente informa che per l'Accademico Straordinario Luigi DE MARZO è scaduto il quinquennio di appartenenza.

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

- a) Viene posta in votazione a scrutinio segreto la conferma dell'Accademico Straordinario Luigi DE MARZO. Come previsto dall'art. 10 del Regolamento, il Presidente ricorda all'Assemblea l'impegno scientifico, l'interesse e la partecipazione attiva dimostrata dal confermando e del desiderio espresso dal medesimo di poter continuare in futuro.

Il candidato raggiunge il quorum previsto e il Presidente lo proclama confermato per il quinquennio 2012-2017.

7) VARIE ED EVENTUALI

Nessuna.

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

Il Segretario
Piero CRAVEDI

Il Presidente
Romano DALLAI

COMMEMORAZIONE

BACCIO BACCETTI E LA SPERMATOLOGIA COMPARATA DEGLI INSETTI

ROMANO DALLAI (*)

(*) *Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università degli Studi di Siena*
Commemorazione tenuta nell'ambito della Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 febbraio 2012.

Ricostruire la storia di una vita scientifica è impresa ardua sempre, perché vi è il rischio di tacere di avvenimenti e realizzazioni che a noi possono sembrare di minore importanza e che, invece, per la persona di cui si parla sono stati di grande impegno e dedizione. Parlando di Baccio Baccetti, tuttavia, non si corre questo rischio se si afferma che uno dei suoi maggiori contributi alla Scienza è stato nel campo della spermatologia comparata, tema che lo ha imposto all'attenzione del mondo scientifico internazionale, gratificandolo di onori e gloria.

Durante la sua attività di sperimentatore presso la Stazione di Entomologia agraria di Firenze, all'inizio degli anni '60, che già godeva dell'attenzione e della benevolenza di Antonio Melis, direttore della Stazione di ricerca, ebbe modo di approfittare dell'enorme potenzialità risolutiva della microscopia elettronica a trasmissione nel campo della ricerca entomologica. Melis, con non comune lungimiranza, aveva compreso l'apporto innovativo della nuova metodica e, stimando le capacità e l'ingegno di Baccetti, decise di acquistare un piccolo microscopio elettronico, intuendo che la nuova tecnologia avrebbe certamente portato all'avanzamento delle conoscenze anche nel campo dell'entomologia agraria. Nel 1959-1960 a Firenze esistevano due microscopi elettronici: il piccolo Hitachi HS-6, alla Stazione di Entomologia agraria in via Romana e un Siemens Elmiskop, presso l'Istituto di Istologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università, a Careggi, diretto dal Prof. Allara.

Baccetti, per apprendere i necessari fondamenti della nuova tecnica, si recò a Milano, presso l'Istituto di Anatomia umana, diretto dal Prof. Aurelio Bairati, famoso professore di quell'Ateneo. Lì apprese le basi per la preparazione del materiale e per l'interpretazione dei risultati otte-

nuti; lì conobbe colleghi con i quali condivise le prime esperienze e i primi successi in un campo che avrebbe in breve permesso di ottenere importanti risultati nel campo della Biologia. La microscopia elettronica, infatti, offriva la possibilità di indagare e descrivere l'organizzazione interna delle cellule e degli organi, e da queste acquisizioni, comprenderne il funzionamento. A Milano, Baccetti conobbe anche il figlio di Bairati, Nanni, con il quale iniziò a collaborare scientificamente sulla struttura delle cellule germinali e sulla spermatogenesi di *Drosophila* e del dittero di interesse agrario *Dacus (Bactrocera) oleae*. Io ero tornato dal servizio militare da poco e mi fu chiesto di raffigurare il complesso flagellare di questo dittero, descritto dai due Autori (1964), disegno che fu poi pubblicato su Redia (Fig. 1 A).

Sfortunatamente per il sottoscritto, non era abitudine a quel tempo citare l'autore del disegno. Erano le prime ricostruzioni della struttura di uno spermatozoo, base importante per l'interpretazione funzionale del movimento flagellare, ipotizzato per primo da B.A. Afzelius nel 1959 e poi confermato da P. Satir e J. Gibbons (1963-1965). Il movimento dello spermatozoo si realizza, come è noto, attraverso l'interazione delle braccia dineiniche presenti sul subtubulo A di ogni doppietto assonemale e il subtubulo B del doppietto adiacente, con conseguente scorrimento reciproco dei microtubuli interessati.

Questo primo approccio alla spermatologia non ebbe, tuttavia, un immediato seguito perché Baccetti preferì spaziare su temi diversi, sfruttando così appieno le capacità risolutive della nuova metodica. In quegli anni '60 Baccetti lavorò instancabilmente e pubblicò importanti contributi sulla fine struttura del filamento miosinico, sull'ultrastruttura dell'intestino degli insetti, sul sistema nervoso, sullo stroma di sostegno di alcuni organi,

sulla fibra di collagene, sui Tubuli Malpighiani, sulla struttura degli occhi di un ragno. Tutti questi lavori contribuirono a farlo conoscere a livello internazionale. I primi risultati sulla struttura degli spermatozoi gli offrirono, altresì, l'opportunità di descrivere gli effetti della sterilizzazione dei maschi di insetti nocivi all'agricoltura, a seguito dell'impiego delle radiazioni ionizzanti. Ottenne un contratto Inatom con il quale ampliò il piccolo laboratorio di microscopia elettronica che aveva organizzato nel retro dell'aula didattica dell'Istituto di Via Romana, e di avere un tecnico addetto alla preparazione del materiale (Paolo Salvatici).

Nel 1964 Baccetti risultò primo vincitore di una cattedra di Zoologia. Avrebbe dovuto spostarsi a Padova, ma per un accordo con l'Università di quella sede, e il consenso del Prof. Pietro Omodeo, docente di Zoologia presso l'Università di Siena, si realizzò uno spostamento di Omodeo a Padova e di Baccetti a Siena, a coprire la cattedra di Biologia e Zoologia. Baccetti si trasferì nella nuova sede nel 1966. Con lui si spostò anche il piccolo microscopio elettronico Hitachi, il primo microscopio elettronico della città del Palio. La nuova metodologia, unitamente al fervore che animò Baccetti di formare una scuola di giovani ricercatori, fecero numerosi proseliti, alcuni dei quali formarono il primo nucleo di addetti ai lavori del rinnovato Istituto di Zoologia della Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali. Io ero arrivato a Siena l'anno precedente, in qualità di assistente incaricato, insieme a Paolo Salvatici; a noi era stato affidato il compito della organizzazione dei laboratori, compreso quello di microscopia elettronica. Il piccolo microscopio Hitachi era costantemente occupato per le diverse linee di ricerca attivate, ma lo strumento consentiva solo basse risoluzioni. Baccetti si rese conto di questa limitazione e si prodigò per l'acquisizione di un nuovo e più adeguato microscopio elettronico. Cercò di risolvere il problema portando a Siena un vecchio Siemens del laboratorio di Milano, ma la scelta non produsse un miglioramento della situazione. Acquistò allora un nuovo microscopio elettronico Siemens Elmiskop IA. Con un'inaspettata decisione, Baccetti stabilì che il nuovo strumento poteva essere utilizzato solamente da lui e dalla sua collaboratrice Floriana Rosati. La cosa produsse un certo malumore e qualche disaffezione alla ricerca da parte di alcuni ricercatori. Per me furono mesi molto pesanti perché, volendo continuare le mie ricerche di ultrastruttura, e dovendo utilizzare il nuovo microscopio per l'analisi del flagello di alcuni spermatozoi, mi ero imposto di utilizzarlo solo dopo che l'Istituto fosse rimasto deserto, a tarda sera. Al mattino seguente, tutto nel laboratorio

doveva ritornare nelle stesse condizioni nelle quali era stato lasciato il giorno precedente. Lavorai moltissimo in quei mesi, e andavo accumulando le numerose micrografie elettroniche che mi ero stampato, sopra un mobile del mio studio, posto al piano superiore dell'Istituto. Un giorno Baccio entrò nella stanza senza preavviso, vide il materiale fotografico e volle sapere di cosa si trattasse. Quando gli spiegai che quello era il frutto di mesi di lavoro clandestino, si rese conto della privazione a cui mi aveva costretto e ricorrendo a una battuta fiorentina, si schernì, come soleva fare quando si trovava in difficoltà. Baccio era così: capace di severità inaudita, ma anche di gesti riparatori, anche se tardivi.

A Siena, Baccetti conobbe gli scritti di Gustaf Retzius (1906-1909) monumentali opere corredate di splendide tavole di spermatozoi di oltre 400 specie animali, metà delle quali di Vertebrati, conservate presso il Museo dei Fisiocritici. I locali del Museo erano allora posti in continuità con l'Istituto di Zoologia ed era quindi agevole accedere alla biblioteca. Sono sicuro che la lettura dei lavori di spermatologia comparata di questo Autore, insieme a quella del più recente e fondamentale lavoro di Ake Franzén (1956) sulla spermatogenesi, gli spermatozoi e la fecondazione negli Invertebrati, abbiano molto influito sulla decisione di Baccetti di dedicarsi allo studio ultrastrutturale dello spermatozoo dei diversi phyla animali, ed in particolare a quelli degli insetti, per ricostruire la filogenesi del gruppo. Ricordo che nell'Agosto del 1967, durante un soggiorno al Terminillo (Rieti), presso il Centro Appenninico di Genetica Carlo Jucci, ove ci recavamo annualmente per le raccolte faunistiche dei vari ricercatori che lo accompagnavano (Giusti, Baroni-Urbani, Lazzeroni, Lovari ed io, insieme alla famiglia Baccetti, con i piccoli Nicola e Cosimo) (Baccetti era convinto che per poter diventare dei bravi ricercatori nel campo dell'Entomologia, ogni ricercatore dovesse padroneggiare un gruppo sistematico), in un tardo pomeriggio, Baccetti ci convocò nella bella biblioteca annessa al Centro e volle leggerci, per avere un nostro commento, quanto aveva scritto sulla struttura dello spermatozoo degli insetti come indice della filogenesi del gruppo. Quanto ci descrisse fu poi l'oggetto della relazione che tenne al 7° Congresso Nazionale di Entomologia di Verona (Fig. 1 B). Ho perfettamente presente quella data, perché coincise con la nascita di mia figlia Luisa. Baccio desiderava che fossi presente a Verona, nonostante il momento particolare, e fece pressioni sul ginecologo che seguiva mia moglie affinché la bimba nascesse prima della data del Congresso.

Il 1967 rappresenta l'inizio di una bella ed importante storia di collaborazione scientifica fra Baccio ed il gruppo di giovani che aveva scelto per il grande progetto di formare una scuola specializzata sulla riproduzione animale. Furono affrontate interminabili discussioni, dopo la lettura di lavori specifici di Autori del passato, sulla struttura degli spermatozoi di vari gruppi di Invertebrati. Ogni componente del gruppo aveva l'obbligo di dedicarsi al reperimento e allo studio ultrastrutturale di rappresentanti dei vari gruppi di Artropodi. Il lavoro procedeva con ritmo frenetico e condusse ai primi importanti risultati, che furono presentati al 4° Congresso europeo di microscopia elettronica tenutosi a Roma nel 1968 e al 13° Congresso Internazionale di Entomologia di Mosca dello stesso anno. Quest'ultimo lavoro su "Phylogenetic considerations on Arthropoda on the basis of the ultrastructure of the spermatozoon" che Baccetti presentò, ricevette grande attenzione dalla Comunità scientifica internazionale. Negli stessi anni (1969-1970) furono pubblicati, sulle riviste più qualificate, diversi lavori di ultrastruttura sugli spermi di vari ordini di Insetti (Efemerotteri, Mallofagi, Psocotteri, Tisanotteri, Embiotteri, Mecotteri, Neurotteri, Plecotteri, Tricotteri). Questi lavori e la frequentazione di Baccetti degli specialisti europei e d'oltre oceano, furono la premessa per la formazione di un comitato di esperti nel campo della spermatologia e della riproduzione in generale. Facevano parte di questo Comitato: J. André (Francia), Don W. Fawcett (USA), B.A. Afzelius (Svezia), e Baccio; più tardi si unì al gruppo anche J.M. Bedford (UK). Merito di questi insigni scienziati fu quello di dar vita a una serie di incontri internazionali di spermatologia che nell'arco di un quarantennio (dal 1969 al 2006) ha dato luogo a ben 10 congressi.

Baccetti fu l'organizzatore del 1° Congresso. L'inaugurazione si tenne nell'estate del 1969 presso la sede dell'Accademia dei Lincei a Roma, ed i lavori scientifici proseguirono a Siena, presso l'Istituto di Zoologia. Fu un evento importante, i cui contributi scientifici furono raccolti in un volume di circa 600 pagine, edito dall'Accademia dei Lincei e dall'Academic Press di New York (Fig. 1 C). Durante quell'occasione, diversi ricercatori del gruppo senese presentarono i loro risultati relativi alla struttura dello spermatozoo dei Collemboli, dei Pauropodi, dei Sinfili e degli Araneidi. Baccio si esibì su "The sperm cell as index of Arthropod phylogenesis". Con questo lavoro egli gettò le basi per una interpretazione, in chiave evolutiva, dei componenti dello spermatozoo.

L'anno seguente, al 7° Congresso Internazionale di Microscopia Elettronica, tenutosi a Greno-

ble (1970) parteciparono in massa ricercatori e tecnici dell'Istituto, con diversi contributi: sulla presenza di ribonucleoproteine nel materiale costituente il centriolo aggiunto, sulla struttura della parete cellulare degli spermatozoi e sulla localizzazione enzimatica nell'assonema flagellare. Nel 1971-72 al gruppo originario di ricercatori dell'Istituto di Zoologia senese, si aggiunse il biochimico Vitaliano Pallini. L'arrivo del collega portò all'acquisizione di una nuova competenza scientifica che fornì nuovo impulso alle ricerche di spermatologia comparata; essa consentì, infatti, di risolvere, oltre che la fine struttura anche la composizione chimica ed il significato funzionale delle diverse componenti dello spermatozoo. È di quegli anni la pubblicazione di due lavori complessi, di grande rilevanza: il primo riguardante la struttura e funzione dello spermatozoo di *Bacillus ros-sius* e il secondo quello di *Tenebrio molitor*.

Nel 1972 Baccetti pubblicò un cospicuo lavoro per *Advances of Insect Physiology* nel quale riportò le acquisizioni recenti relative allo spermatozoo di molti insetti (Fig. 2 A). Quel ponderoso lavoro fu il frutto di lunghe sedute passate insieme a discutere sui vari modelli di spermatozoo. A pubblicazione avvenuta, Baccio, in considerazione dell'aiuto ricevuto, mi dedicò uno dei pochi estratti disponibili. Negli anni 1973-1974 furono dati alle stampe i risultati degli studi sulla ultrastruttura degli spermi dei Proturi, dei Dipluri, dei Ditteri Simulidi, del cecidomide *Monarthropalpus buxi*, del Diplopode *Polyxenus* (Fig. 3). Alcune micrografie di questo complesso lavoro, accettato su *Journal of Morphology* e dedicato alla straordinaria metamorfosi dello spermatozoo, che ha la forma di un piccolo barilotto nelle vie genitali maschili, e diviene nastriforme nella spermateca della femmina, ricevettero la gratificazione dell'esposizione pubblica nella sede della rivista, a New York.

Il 1973 fu anche l'anno del 2° Congresso di Spermatologia Comparata tenutosi a Stoccolma. Fu organizzato da Afzelius presso il Wenner-Gren Institute. Baccetti ed io fummo invitati entrambi a tenere una relazione: Baccetti presentò "Motility pattern in sperm with different tail structure" (Fig. 2 B) ed io "New models of aflagellate arthropod spermatozoa". Le due relazioni furono accolte molto favorevolmente dai numerosi partecipanti e ricevettero anche i complimenti di Afzelius, Fawcett e Anderson, alcuni fra i più stimati specialisti del settore. La sera, sia io che Baccio, decidemmo di rimanere nella hall dell'albergo a riposare dopo la tensione accumulata nei giorni precedenti. Mentre brindavamo al successo ottenuto, Baccio mi disse "sai, Romano, quest'oggi abbiamo

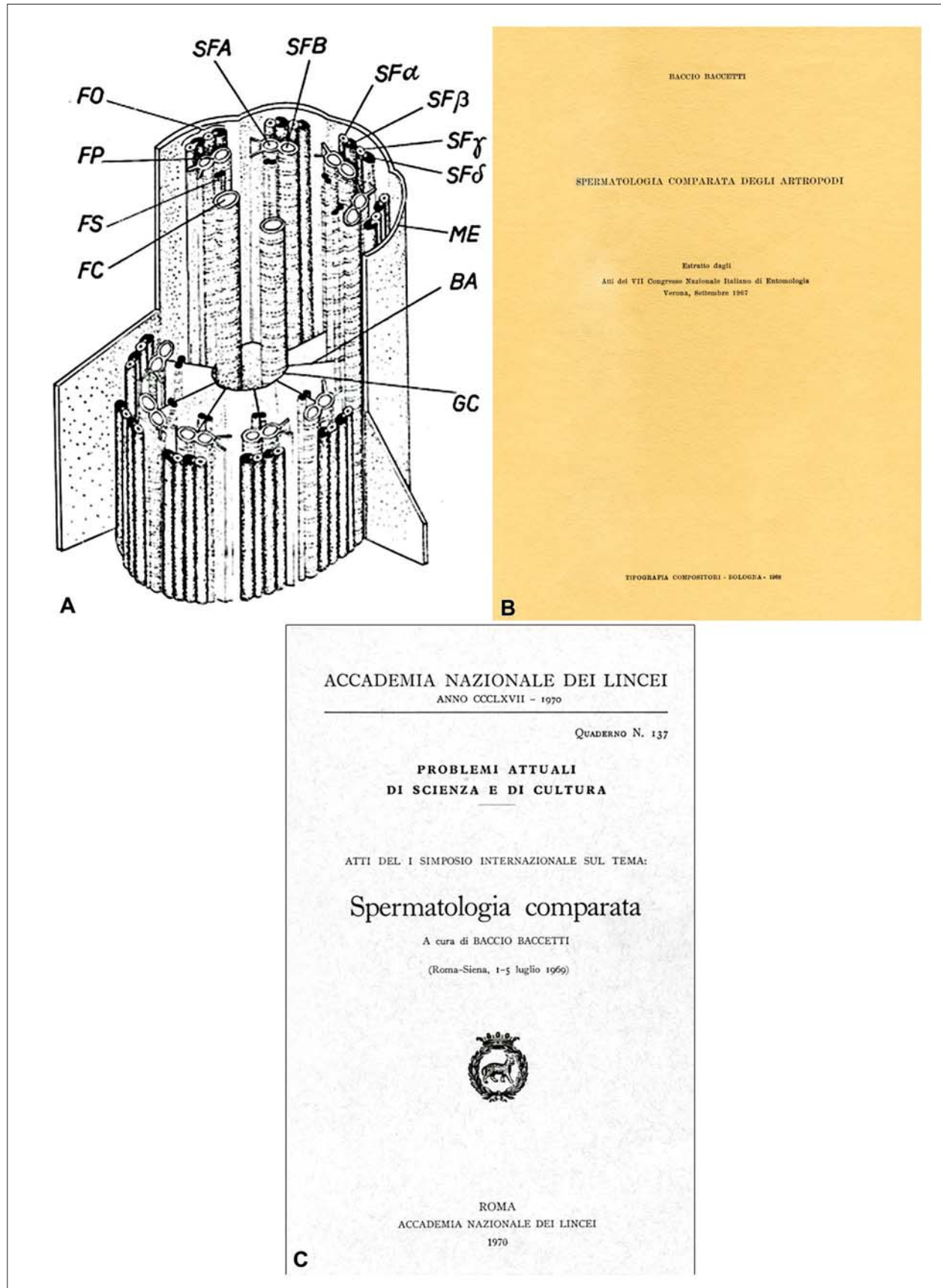


Fig. 1

A – Ricostruzione schematica dell'assonema flagellare di *Bactrocera* (= *Dacus*) *oleae*. Il disegno realizzato da R. Dallai, illustra i differenti componenti microtubulari. B – Copertina del lavoro di Baccetti su "Spermatologia comparata degli Artropodi" che fu oggetto della sua lettura al VII Congresso Nazionale italiano di Entomologia di Verona (1967). C – Copertina dei "Proceedings of the 1st International meeting on Comparative Spermatology", organizzato da Baccetti nel 1969, Roma e Siena. Il libro fu poi pubblicato dall'Accademia Nazionale dei Lincei nel 1970.

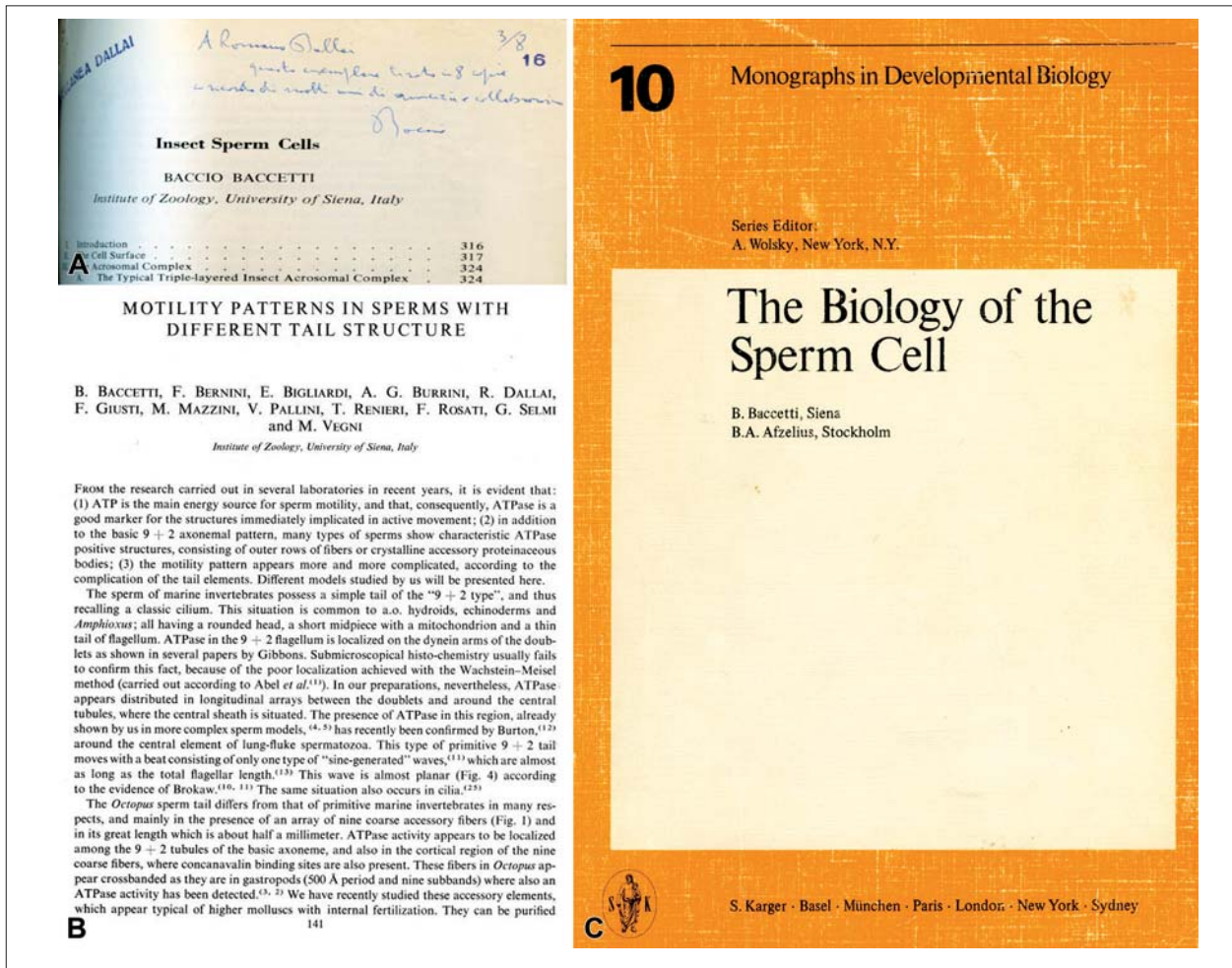


Fig. 2

A – La prima pagina del lavoro di Baccetti “Insect Sperm Cell” pubblicato nel 1977 sulla rivista “Advances of Insect Physiology”. B – Testo della lettura di Baccetti al “2nd International meeting of Comparative Spermatology” tenuto a Stoccolma nel 1973. C – Copertina dell’importante libro di Baccetti e Afzelius su “The Biology of Sperm Cell” pubblicato nel 1976 da Karger Press.

sfondato nella ricerca internazionale. Ora possiamo davvero competere con le migliori scuole”. L’affermazione mi commosse perché avevamo impegnato tante energie nei mesi precedenti, lui nel suo studio al piano inferiore, ed io nel mio, al piano superiore dell’Istituto, continuamente a telefonarci per commentare all’altro quello che avevamo scritto. Poi, dopo il Congresso, decidemmo di porre i nomi di tutti i ricercatori del gruppo in ciascuna delle due relazioni. I due lavori furono pubblicati a più nomi, come si fosse trattato di una squadra di calcio. Baccio aveva, come me, una passione per questo sport che di tanto in tanto praticavamo, senza grande successo, tuttavia, in amichevoli incontri universitari.

Quegli anni sono stati i più belli della nostra collaborazione; di grande impegno nella ricerca, di tante soddisfazioni per l’attenzione internazionale che i lavori prodotti ricevevano, per l’amicizia che era maturata fra noi.

Nel 1975 Baccio pubblicò un lavoro sul con-

tributo dell’apparato di Golgi durante la spermiogenesi. A questo organulo dedicò una particolare attenzione anche più tardi quando lo utilizzò come carattere guida per la filogenesi animale (1979) in un lavoro sui Curr. Topics Dev. Biol.

Nel 1976, l’assidua presenza a Siena di Bjorn Afzelius, offrì l’occasione a Baccetti di pianificare la fondamentale opera “The Biology of the sperm cell” per la Karger Press di Basilea, scritta dai due specialisti (Fig. 2 C). Si tratta di un testo che è stato ed è tuttora punto di riferimento per tutti coloro che intendono dedicarsi allo studio degli spermatozoi.

Sempre nel 1976, con Bjorn Afzelius, divenuto un nostro gradito ospite, Baccio ed io iniziammo una fruttuosa collaborazione che condusse prima all’identificazione di mitocondri giganti nello spermatozoo di *Notonecta glauca* (1976) e in seguito, grazie anche alla collaborazione di Pallini e Rosati, alla caratterizzazione di una nuova proteina contenuta in tali mitocondri e denominata

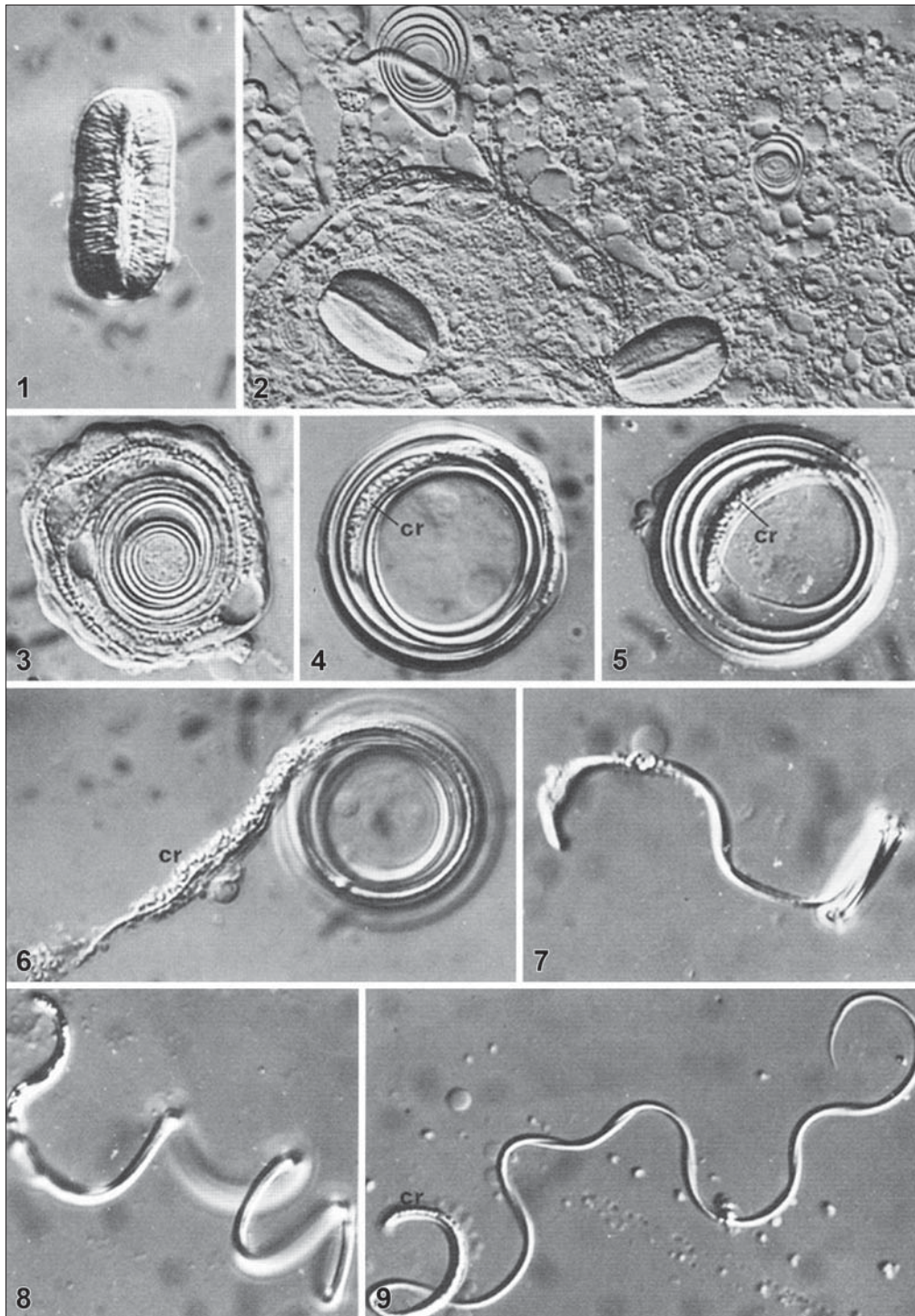


Fig. 3

Spermatozoi raccolti da testicoli di *Polyxenus lagurus*; (1) dove la cellula spermatica è a forma di barilotto e progressiva trasformazione in cellula germinale nella spermateca della femmina (2-8). Nella fase finale lo sperma diviene una cellula allungata (9). Il processo fu identificato da Baccetti come metamorfosi spermatica (Baccetti et al., 1974).

cristallomitina. Il lavoro fu accolto su *Journal of Cell Biology* (1977) (Fig. 4).

La competenza biochimica di Pallini e l'instancabile impegno di Anna Burrini, divenuta praticamente la sua tecnica, permisero di descrivere la composizione chimica delle fibre accessorie dei mammiferi e dei cefalopodi stabilendo altresì che le

strutture erano ricche di zolfo e zinco. Contemporaneamente e parallelamente furono attivate tre linee di ricerca: una sulla struttura aberrante degli spermi dei Cecidomidi (1976), una seconda sugli spermi degli Onicofori (1976, 1977), e una terza sugli spermi dei Miriapodi (1977). Questi lavori furono pubblicati sulle riviste più accreditate,

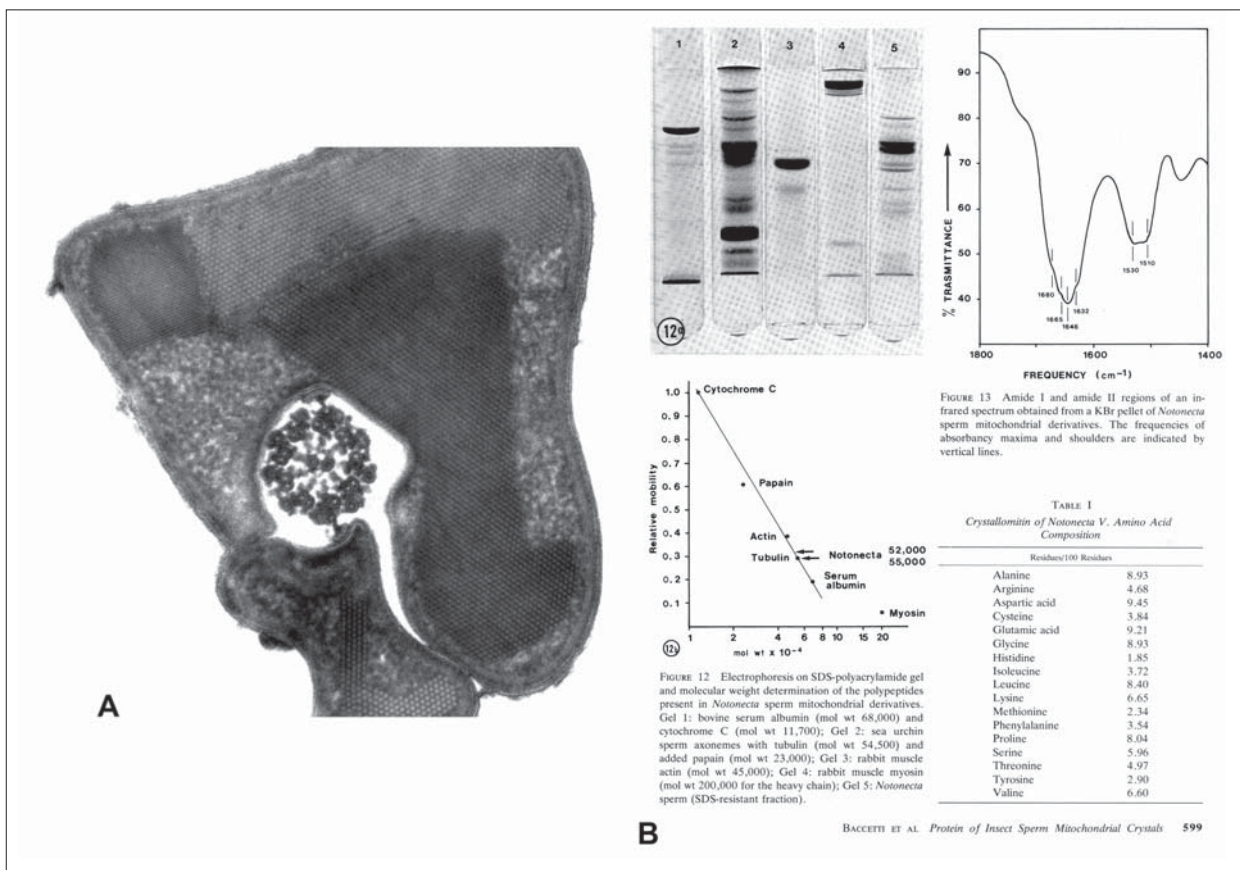


Fig. 4

A, B – Nel 1976 Baccetti, in collaborazione con Afzelius, Dallai, Pallini e Rosati, pubblicarono l'importante lavoro su *Journal of Cell Biology* sulla nuova proteina "crystallomitin" che costituisce il componente dei mitocondri dello sperma di *Notonecta glauca* (A). Le caratteristiche biochimiche di questa proteina e la composizione dei suoi aminoacidi sono rappresentati in (B).

ricevettero un ampio consenso che fruttò inviti ad entrambi a tenere relazioni in vari congressi.

Nel 1977 l'amico Michael White ci inviò dall'Australia alcuni esemplari di *Mastotermes darwiniensis*. Cominciammo a studiare l'ultrastruttura degli spermatozoi di questa termite, ma il lavoro procedeva lentamente per la difficoltà dell'isolamento dell'apparato riproduttore, senza comprometterne l'integrità. La specie, come del resto tutti gli Isotteri, ospitava vari protozoi Ipemastigidi, e questo frenò all'inizio i nostri entusiasmi. Avevamo, infatti, individuato, nelle vie genitali maschili cellule multiflagellate. Per essere certi che questa evidenza fosse dovuta a spermatozoi peculiari, dovevamo escludere la possibilità di una contaminazione. Per questo motivo decidemmo di condurre uno studio sulla spermatogenesi della specie. Il risultato fu la conferma della presenza di spermatozoi funzionali con un centinaio di flagelli, caso unico nel regno animale (Fig. 5; Fig. 6 A). Un lavoro recente, che ho condotto con il collega G. Callaini su questa specie, ha confermato che l'insolito numero di flagelli ha la sua origine in un'incontrollata moltiplicazione dei centrioli nel giovane spermatotio (2009) (Fig. 6 B, C).

Il dato fu pubblicato come breve nota sui *Compte Rendu de l'Académie des Sciences* di Parigi, sponsorizzato da P.P. Grassé (1977), e poi come lavoro in estenso su *Journal of Cell Biology* (1978). Con Baccetti prendemmo anche in esame lo spermatozoo immobile degli Aleirodidi e, attraverso lo studio della spermiogenesi di questi insetti, descrivemmo la progressiva degenerazione dell'assonema flagellare (1977). Sempre nel 1977, Baccetti pubblicò sulla rivista dell'Accademia Nazionale dei Lincei un lavoro sugli spermatozoi dei Sipunculidi, e una nota su *International Cell Biology* "Unusual feature of insect spermatogenesis". Nello stesso anno, insieme a Burrini e Pallini, iniziammo lo studio per la caratterizzazione molecolare delle braccia dineiniche dell'assonema flagellare degli insetti. Attraverso un lavoro massacrante di dissezioni del Cecidomide *Diplolaboncus tumorificus*, proveniente dalla pianura modenese, specie provvista di un assone gigante con un migliaio di doppietti microtubulari provvisti del solo braccio esterno, fummo in grado di reperire un pellet di spermatozoi sufficiente per le indagini biochimiche (Fig. 7).

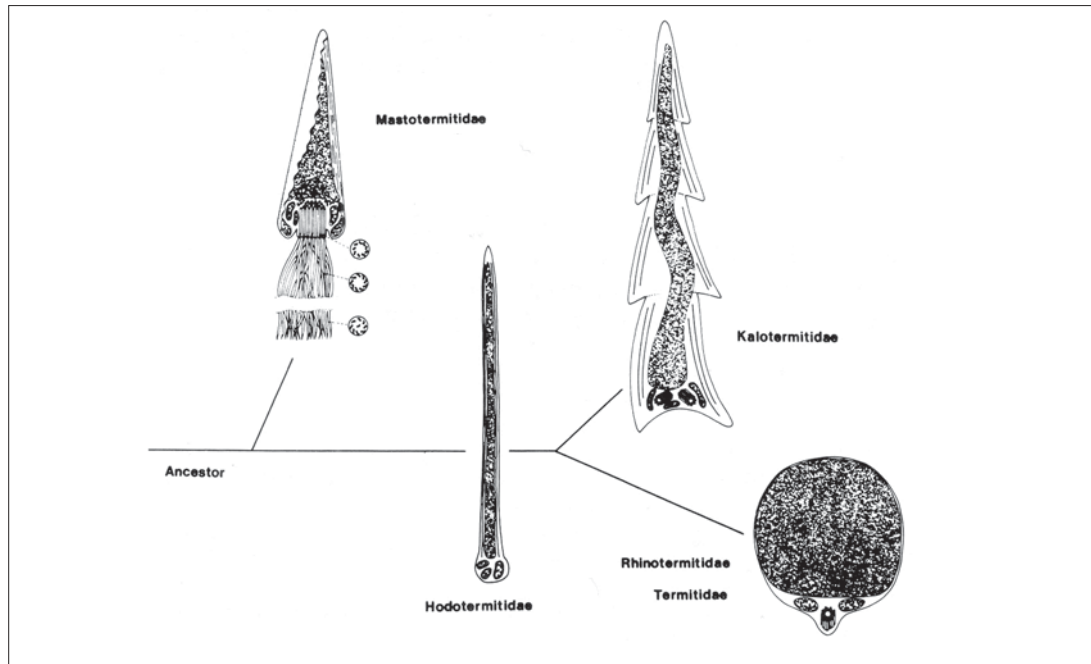


Fig. 5

Disegno schematico che illustra la filogenesi degli Isotteri sulla base delle strutture spermatiche (Baccetti et al., 1981).

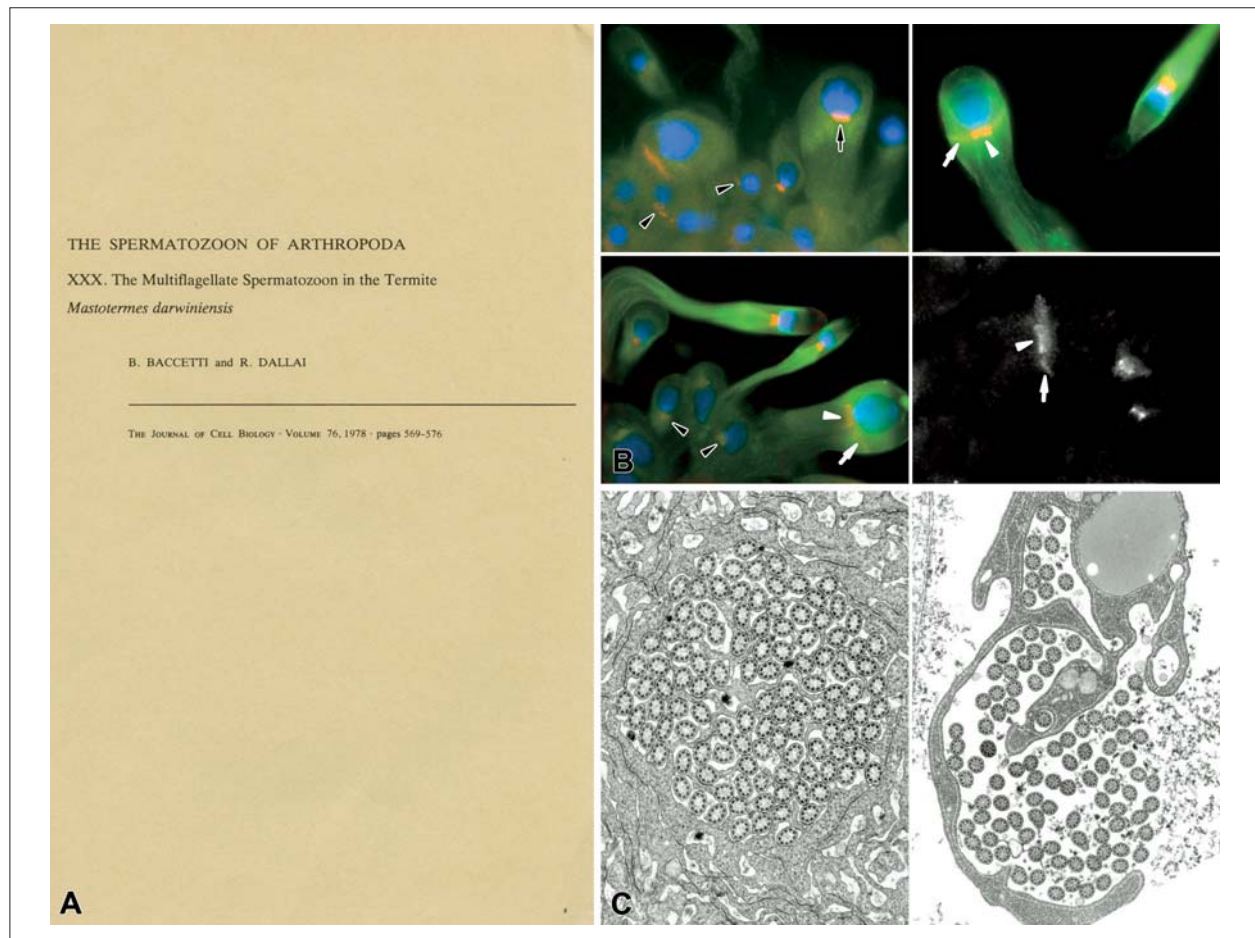


Fig. 6

A – Copertina del lavoro di Baccetti e Dallai (1978) sullo spermatozoo multiflagellato di *Mastotermes darwiniensis*. B – Localizzazione della γ -tubulina (parte superiore della figura) e del centrosoma (figure in basso). I microtubuli appaiono in verde, gli antigeni centrosomali appaiono in giallo e il DNA in blu. La fotografia in basso a destra mostra il centrosoma isolato. Le proteine centrosomali appaiono con la stessa distribuzione. Nei precoci spermatidi la proteina centrosomale è meno evidente (Riparbelli et al., 2009). C – Due sezioni trasversali consecutive dello spermatozoo di *Mastotermes* per mostrare i numerosi flagelli (Riparbelli et al., 2009).

Queste portarono all'identificazione di un pattern elettroforetico peculiare, illustrato in un lavoro pubblicato su *Journal of Cell Biology* (1979). Nello stesso periodo, venne anche avviata la ricerca sugli spermatozoi dei Miriapodi (1978), con particolare attenzione a quelli dei Diplopodi. I risultati di queste indagini furono pubblicati su "Myriapod Biology" edito da Marina Camatini (1979). I numerosi dati spermatologici furono pubblicati sulla rivista dell'Accademia Nazionale dei Lincei (1978) e poi riuniti in un grosso lavoro che Baccetti pubblicò nel volume edito da A.P. Gupta "Arthropod Phylogeny" (1979).

Il 1978 fu l'anno del 3° Congresso di Spermatologia Comparata organizzato da Don W. Fawcett a Boston-Wood Hole. Vi parteciparono diversi componenti del gruppo senese. Io ero stato invitato a tenere una delle letture plenarie e il fatto, inespugnabilmente, non fu molto gradito a Baccetti. Il tema che mi era stato richiesto era: "L'evoluzio-

ne dello spermatozoo degli insetti" (1979). Baccetti, invece, presentò una bella relazione sull'evoluzione del complesso acrosomale ed un'altra, insieme a Pallini e Burrini, sui primi risultati di una ricerca su un polipeptide ricco di cisteina presente nei mitocondri degli spermi dei mammiferi (1979).

Nel 1982, si tenne il 4° Congresso di Spermatologia Comparata a Seillac (Francia), organizzato da J. André. Baccetti presentò "The sperm structure and function in 70 year old humans". Baccio aveva iniziato in quegli anni il filone di ricerca sulla spermatologia umana con attenzione anche alle problematiche sanitarie, avvalendosi di alcuni suoi collaboratori.

Al 5° Congresso di Spermatologia Comparata, tenutosi a Fujiyoshida, vicino al monte Fuji in Giappone, nel 1986 organizzato da H. Mohri, Baccio presentò una comunicazione su "News on Phylogenetical and Taxonomical Spermatology"

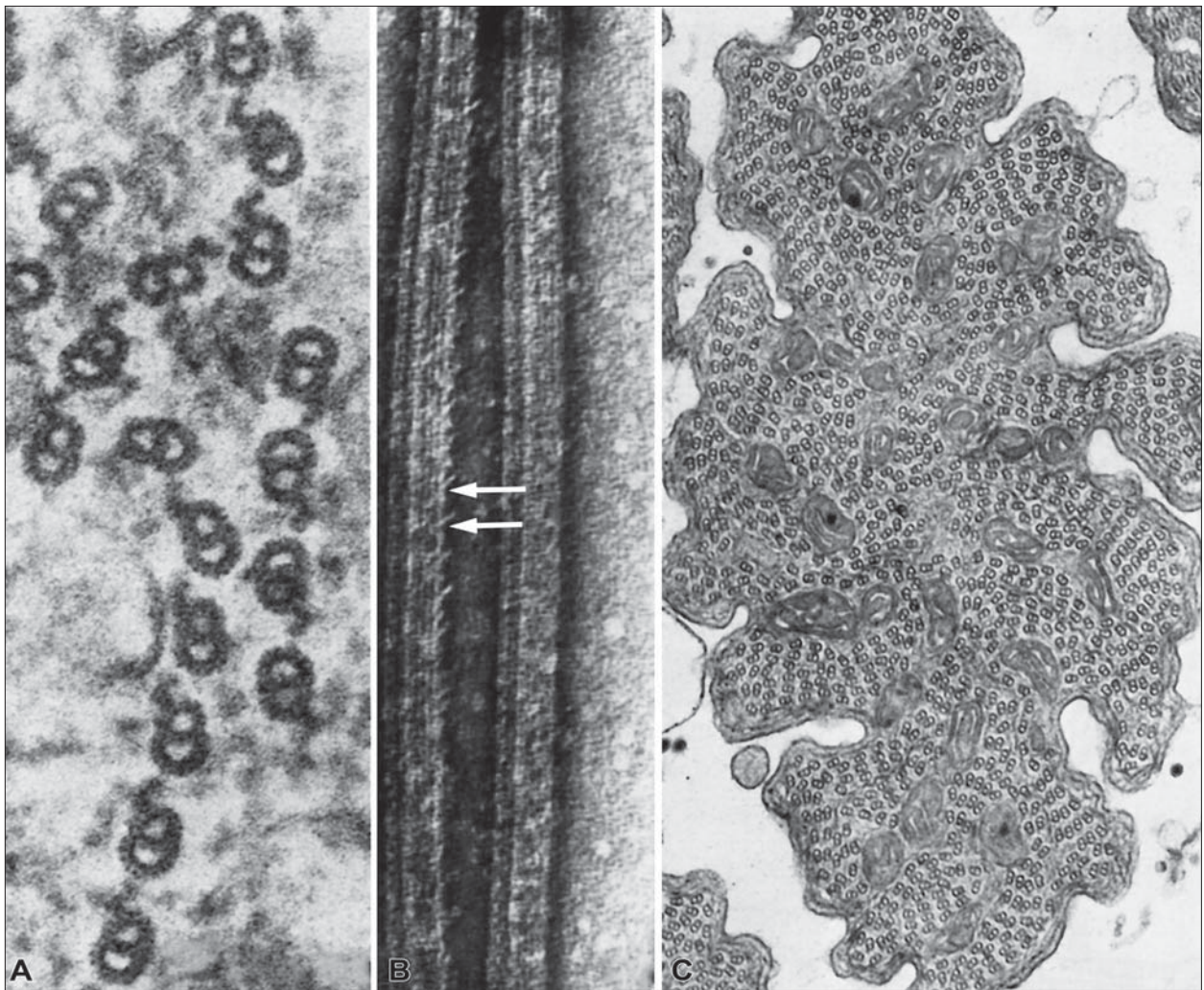


Fig. 7

A, B, C – Spermatozoi di *Diplolaboncus tumorificus*. In A un dettaglio dei numerosi doppietti assonemali provvisti del solo braccio dineinico esterno; in B, colorazione negativa di un doppietto microtubulare per mostrare la disposizione delle braccia dineiniche; in C, sezione trasversale di uno spermatozoo per mostrare il flagello provvisto di numerosi doppietti microtubulari (Baccetti e Dallai, 1979).

ed una su “The action of Gossypol on Mammalian Spermatozoa”

Non disdegnava, comunque, di ritornare di tanto in tanto alla Spermatologia Comparata degli Insetti”. Pubblicò, infatti, un lavoro sulla struttura degli spermi di varie specie di termiti che gli spedì dalla Somalia, dove mi ero recato per il corso di Zoologia agraria presso la Facoltà di Agraria di Mogadiscio (1981), sugli spermi di *Galloisiana* (Grylloblattodea) e, sempre in collaborazione, un lavoro sulla motilità degli spermi dei Coccidi (1982), sugli spermi di alcune specie di Flebotomi (1984), sugli spermi dei Curculionidi (1985), su quelli dei Fasmidi (1986), sugli spermi degli Ortotteroidei (1987), su quelli dei Crisomelidi (1988), degli Strepsitteri (1989) e sugli spermi afflagellati ed immobili dei Coleotteri Ptilidae (1989).

Nel 1985, Baccetti pubblicò un grosso lavoro sulla evoluzione dello spermatozoo per il volume di Ch. Metz e A. Monroy, “Biology of Fertilization” edito dalla Academic Press di N.Y.

Approfittando della presenza dei coniugi Gibbons, ospiti dell’Istituto di Zoologia, Baccio si interessò al movimento degli spermatozoi dell’anguilla, dotati di un assonema flagellare di tipo 9+0 (1983-1985) e più tardi di quello degli spermi dei Tefritidi, mettendo in evidenza la capacità di questi ultimi di procedere anche a ritroso (1989). Pubblicò anche alcune note sugli spermi di gruppi diversi dagli insetti: nel 1983 e nel 1985 sui Nematodi, e nel 1987, sui Tardigradi.

Nel 1988, al 18° Congresso Internazionale di Entomologia di Vancouver, Baccio presentò ancora una plenary lecture su “The value of sperm and egg structure in insect systematics”.

Nel 1992, al 19° Congresso Internazionale di Entomologia di Pechino, Baccetti parlò sui “Modern trends in Insect spermatology” e sugli spermatozoi dei Blattaria e sull’evoluzione dello spermatozoo dei Coleotteri.

Al 20° Congresso Internazionale di Entomologia di Firenze, (1996) (Fig. 8), da lui organizzato con grande successo, Baccio presentò una plenary lecture su “Comparative spermatology in Insect taxonomy and Phylogeny”, tema ripreso anche per il volume 11C “Insecta” edito da F.W. Harrison e M. Locke, per la serie Microscopic Anatomy of Invertebrates (1998).

La sua maggiore attenzione era rivolta, tuttavia, agli aspetti sanitari della spermatologia umana, e alle patologie spermatiche che sono alla base della infertilità umana. Pubblicò moltissimo in questo ambito, collaborando con medici e clinici. Alcuni suoi lavori hanno avuto grande risonanza internazionale, come quello pubblicato su

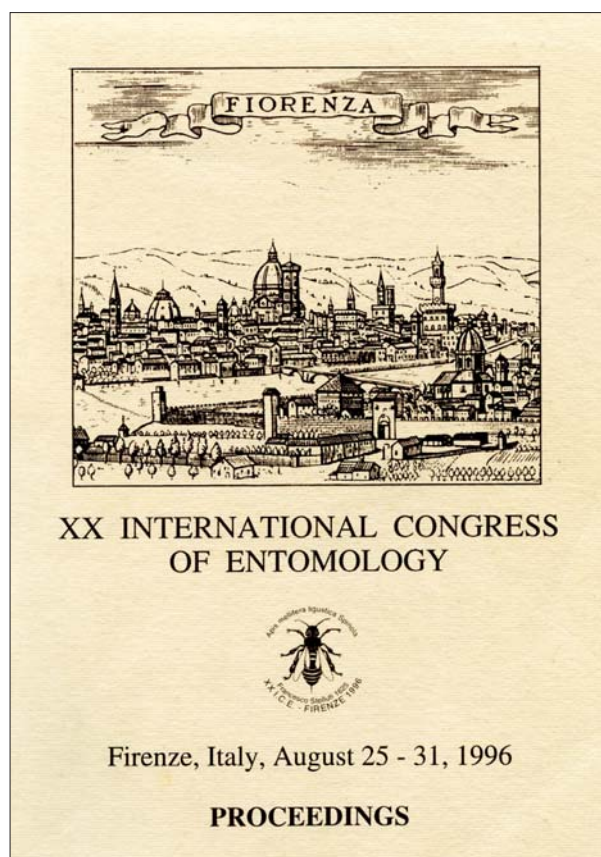


Fig. 8

Copertina del volume dei Proceedings del “20th International Congress of Entomology” tenutosi a Firenze nel 1996, organizzato da Baccetti.

Journal of Cell Biology sulla presenza del virus HIV-I negli spermi di soggetti affetti da AIDS; o quello sul metodo per una valutazione matematica delle malformazioni spermatiche, o, infine, quello sui difetti spermatologici nei consanguinei.

Quando nel 1990 Baccio organizzò a Siena il simposio “Comparative Spermatology 20 years after” per celebrare il 6° Congresso di Spermatologia Comparata (Fig. 9), nel suo intervento inaugurale, poi riportato nella prefazione al voluminoso libro delle pubblicazioni, traspariva chiaramente, insieme alla consapevolezza degli enormi progressi fatti dalla comunità scientifica nello studio delle cellule germinali, anche l’orgoglio di aver contribuito in modo determinante al processo di affermazione di questa branca della Biologia.

Il cambiamento delle tematiche oggetto delle sue ricerche era anche giustificato dal suo trasferimento alla Facoltà di Medicina e Chirurgia dell’Università di Siena (1988-1989), e dalla sua separazione dal gruppo originario di ricercatori dell’Istituto di Zoologia, per dar vita al nuovo Istituto di Biologia generale.

Al termine di questa ricostruzione storica della nascita della Spermatologia Comparata degli

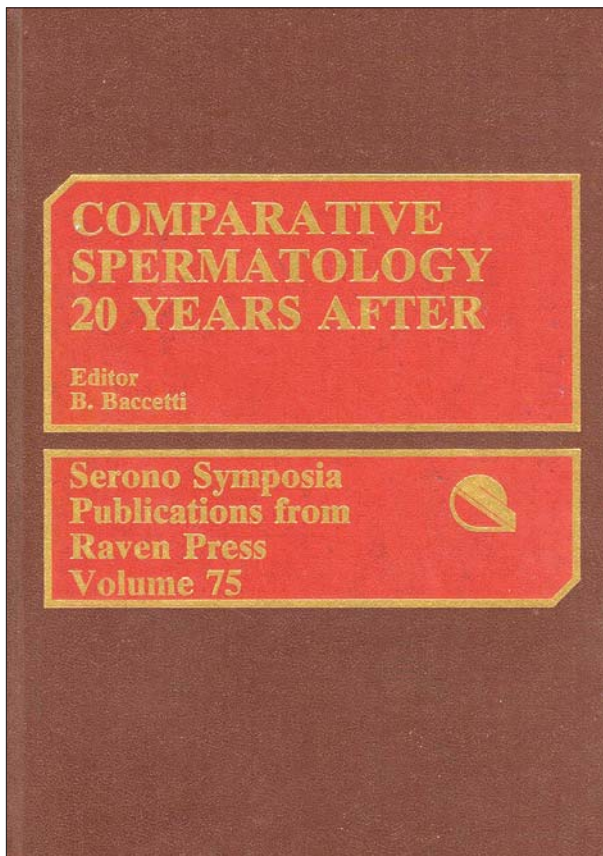


Fig. 9-

Copertina del libro "Comparative Spermatology 20 years after" organizzato da Baccetti in 1990, edito da Raven Press.

insetti, è forse opportuna qualche considerazione sui risultati ottenuti da Baccetti e dalla sua scuola in questo settore della Biologia.

Indubbiamente le acquisizioni sulla struttura degli spermatozoi dei vari gruppi animali ed in particolare degli insetti sono state numerose ed hanno messo in luce affinità filogenetiche inattese e spesso contrastanti con quelle desunte dalla morfologia esterna; molte di queste acquisizioni hanno avuto anche il sostegno dei risultati delle indagini molecolari. Per fare solo qualche esempio: i Proturi sono un gruppo con spermi aberranti, provvisti di un assonema a più doppietti e privi di complesso centrale, che verosimilmente non è sulla linea filetica degli insetti; i Fasmatoidei che hanno perduto i derivati mitocondriali, sono un gruppo molto apomorfico, a sé stante fra i Polineotteri; gli Strepsiptera presentano corpi accessori, come hanno i Coleoptera e non sono affini ai Ditteri; i Ditteri Cecidomyiini e Asphondyliini condividono la presenza del solo braccio dineinico esterno nell'assonema aberrante, mentre *Contarinia* e generi affini, con spermi immobili, dovrebbero collocarsi su un ramo evolutivo a sé stante, differente da quello dei Cecidomyiidi e dei

Lasiopteridi (Fig. 10). Lo spermatozoo, insomma, più della morfologia generale del corpo, maggiormente soggetta alle pressioni selettive esterne, può rivelare le reali parentele fra gruppi anche apparentemente lontani. Questa era la convinzione di Baccetti ed i lavori più recenti di spermatologia comparata degli insetti, sembrano confermare questa ipotesi.

Baccetti, intorno agli anni '70, di ritorno da Copenhagen, dove aveva incontrato Karl George Wingstrand, mi raccontò del lavoro che questo grande Zoologo stava svolgendo e della sua intuizione circa la posizione filogenetica di alcuni difficili gruppi zoologici, ed in particolare della importanza che la struttura dello spermatozoo aveva avuto nello stabilire che il phylum Pentastomida (o Linguatulidi) era affine ai Crostacei Branchiuri più che ai Protoarthropoda (Onicofori e Tardigradi).

Credo che anche da quella visita in Danimarca, Baccio abbia ricevuto conferma dell'importanza dello studio ultrastrutturale degli spermatozoi per scopi filogenetici.

Forse le conclusioni a cui Baccio arrivava nei suoi lavori erano basate semplicemente sulla condivisione delle strutture evidenziate nei gruppi considerati, e non si basavano su una valutazione cladistica classica dei caratteri dello spermatozoo: quali sono plesiomorfici e quali apomorfici. Così come non tenevano nella dovuta considerazione il tipo di riproduzione adottato dalla specie in esame (monandria e poliandria) e l'esistenza di una competizione spermatica. Resta il fatto che molte delle sue conclusioni sono ancora valide.

Non è facile tentare un giudizio sintetico della figura di Baccio Baccetti; non è facile soprattutto a chi, come me, è cresciuto scientificamente accanto a lui ed ha quindi goduto e sofferto della forte personalità del personaggio.

Forse non è stato il Maestro che avrei voluto, ma di certo è stato per tutti un manager formidabile, che ha saputo trovare le risorse e gli uomini per la realizzazione di un grande progetto di ricerca. Di lui si potrà dire che era un uomo non comune, ma come tanti aveva le sue debolezze e le sue passioni, le sue paure e i suoi entusiasmi, l'insofferenza per qualunque cosa gli facesse perdere tempo, la sua generosità inaspettata. Di sicuro era un uomo molto determinato nel raggiungimento degli obiettivi che si era prefissato e per i quali si era impegnato, e non si poneva troppi scrupoli pur di ottenere ciò che gli stava a cuore. Ne è stato un chiaro esempio, la tenacia con cui ha affrontato e portato a buon esito la richiesta di istituire un Centro CNR a Siena.

Lavoratore instancabile, dotato di un'incredi-

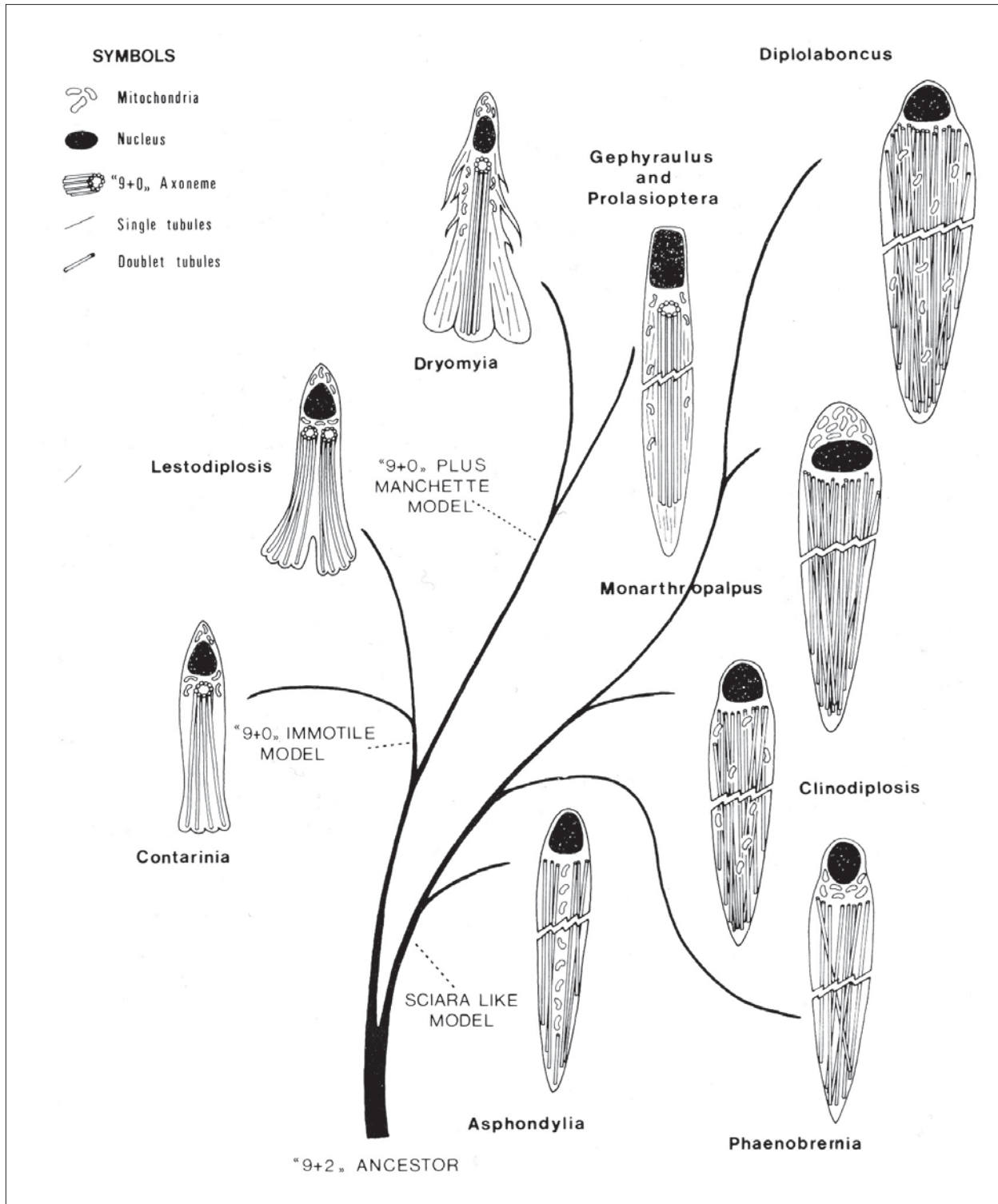


Fig. 10

Disegno schematico della evoluzione dello spermatozoo dei Cecidomidi. Due trends evolutivi possono essere riconosciuti: uno comprendente quelle specie caratterizzate da spermi con assone gigante, dotato di motilità, sostenuta dalle braccia di dineiniche dei numerosi doppietti assoneali (a destra) ed un secondo trend, comprendente le specie con spermi immobili, provvisti di un normale assone flagellare e di numerosi microtubuli, entrambi privi di braccia dineiniche (a sinistra) (Baccetti e Dallai, 1976).

bile facilità di scrittura, scriveva di tutto e su tutti. La lettura della lista delle sue pubblicazioni lascia stupefatti di come fosse capace di passare dal dato scientifico, fosse esso naturalistico, tassonomico o di ultrastruttura, al necrologio, alla ricostruzione

storica dell'entomologia, alla trattazione di argomenti di politica universitaria, fino alla citazione umoristica.

Io, che ho condiviso con lui molti anni di lavoro (ho pubblicato con Baccetti più di 40 lavo-

ri) mi piace ricordare come eravamo nei lontani anni '70, quando animati entrambi dalla stessa passione e dal piacere per la ricerca, passavamo intere ore a discutere nel corridoio dell'Istituto di Zoologia le novità che avevamo osservato al microscopio elettronico; e uscivamo insieme dall'Istituto, a tarda sera, felici e orgogliosi dei risultati ottenuti.

Poi le nostre strade si sono separate e ognuno

di noi ha scelto di percorrere itinerari diversi, con altri compagni di viaggio, per mete che riteneva più coerenti con il proprio modo di essere.

Con l'età che, per dirla con Erri De Luca, "arrugginisce il giorno a prima sera", e una leggera nebbia scende a coprire tutte le cose e ogni storia, è rimasto il rammarico di non aver saputo portare a termine, insieme, una lunga esperienza scientifica ed umana.

COMMEMORAZIONE

RICORDO DI BACCIO BACCETTI

PIO FEDERICO ROVERSI (*)

(*) *Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia - Firenze*
Commemorazione tenuta nell'ambito della seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 febbraio 2012.

Chiarissimi Accademici, Signore e Signori

Siamo oggi qui riuniti per ricordare e rendere omaggio ad un uomo che ha segnato campi diversi del sapere scientifico per oltre un cinquantennio, ponendosi sempre sul confine di ciò che era noto o supposto tale, con lo sguardo e la voglia di andare oltre, che si trattasse di sterilità umana, biogeografia dei popolamenti animali, tassonomia o morfologia funzionale e fisiologia non vi era differenza.

Nel 1941, all'età di 10 anni, come lui stesso scrisse nel suo curriculum, Baccio Baccetti iniziò a frequentare regolarmente la Regia Stazione di Entomologia Agraria ospitata nel cuore di Firenze.

Un ragazzino in un istituto dedicato fin dalla sua nascita, nel 1875, allo studio degli insetti, collocato con i suoi libri, le sue collezioni e i suoi microscopi, in locali non distanti dai luoghi dove avevano operato gli scienziati pionieri a lungo ospitati e protetti dalla dinastia dei Medici, in tempi non certo facili per chi osava interrogarsi sui meccanismi della vita.

A soli 21 anni, 2 anni prima di laurearsi, aveva già pubblicato su 'Redia' i suoi primi studi sugli ortotteri delle isole della Toscana. A 23 anni si laureava con il massimo dei voti e la pubblicazione della tesi. A 25 aveva già dato alle stampe 16 contributi, quasi tutti su riviste internazionali. A 28 anni Sperimentatore presso la Stazione di Entomologia Agraria di Firenze, a 33 professore incaricato di Genetica Umana presso la facoltà di Medicina e di Genetica della Facoltà di Scienze nell'Università di Siena. A 34 anni professore ordinario di Biologia e Zoologia generale per la Facoltà di Medicina ed incaricato di Zoologia per la Facoltà di Scienze di Siena.

Tra il 1972 e il 1988 delegato italiano, Vicepresidente e poi Presidente dell'International Organizing Committee for Entomology Congress.

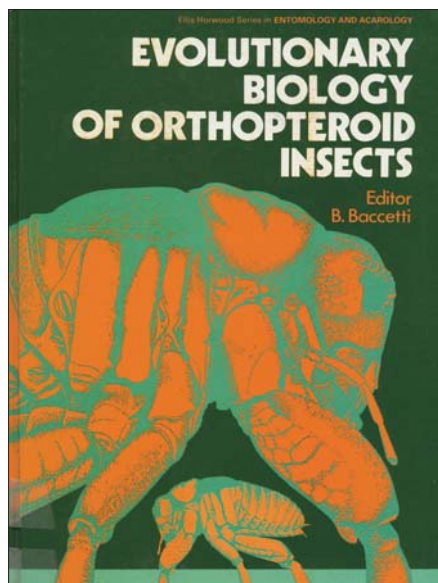


Baccio Baccetti alla "Tribuna di Galileo" presso il Museo della "Specola" di Firenze in occasione del Centenario della rivista 'Redia', gennaio 2003.

Dal 1988 Direttore del Centro per lo Studio delle Cellule germinali del CNR.

Dal 1995 al 2011 Presidente dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia.

Una lunga carriera scientifica con oltre 600 lavori e punteggi incredibilmente elevati in tutte le tipologie di calcolo bibliometrico, oggi tanto amate dai ragionieri della ricerca. Non può inoltre essere sottaciuta la partecipazione agli editorial board di riviste come Journal of Ultrastructural Molecular Research, International Journal of Insect Morphology and Embryology, Molecular



Copertina del libro “Evolutionary biology of Orthopteroid insects” curato da Baccetti nel 1987.

Reproduction and Development, International Journal Developmental Biology, Tropical Zoology, Animalia, Asian Journal of Zoological Science, Acta Entomologica Bohemoslovacca, Zygote. Era inoltre corrispondente per la pagina scientifica di La Stampa di Torino e de Il Giornale di Milano.

Rilevante è anche l’elenco dei testi pubblicati come Autore o editor: basti pensare ai trattati di Biologia Generale e Zoologia, ai volumi “Biology of sperm cells” del 1976, “Comparative spermatology” del 1970, “Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects” del 1987, “Comparative Spermatology 20 years after” del 1991. A questi bisogna aggiungere i Proceedings di Atti di Congressi Internazionali inerenti ricerche sull’HIV, campo lontanissimo da quello di cui siamo abituati a dibattere in questa sede, ma che contribuisce a rivelare con quali capacità Baccetti abbia attraversato il panorama scientifico italiano.

Nel 2003 Baccetti accettò di partecipare alla scommessa lanciata per rilanciare la rivista ‘Redia’ in occasione del centenario della sua pubblicazione a partire dal lontano 1903 ad opera di Antonio Berlese, divenendo il nuovo “Editor” della rivista. Scrisse Baccetti in quella occasione, chiudendo l’articolo di apertura del volume della nuova serie: *Ciò che piace, nonostante tutto, è respirare di nuovo l’atmosfera di una ulteriore avventura, che nella ricerca è sempre apportatrice di entusiasmi e di attrattive.*

I campi toccati da Baccetti sono innumerevoli e i contributi di istochimica non sono certo una parte trascurabile. Proprio in questa nostra Accademia abbiamo di recente dedicato una giornata a recenti ricerche sui Tubi Malpighiani. Si pensi, al

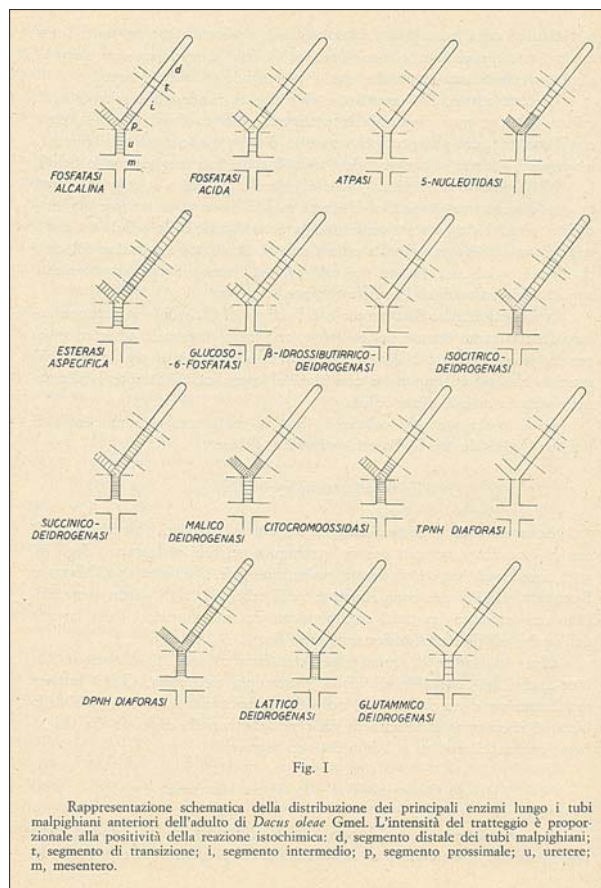


Fig. I

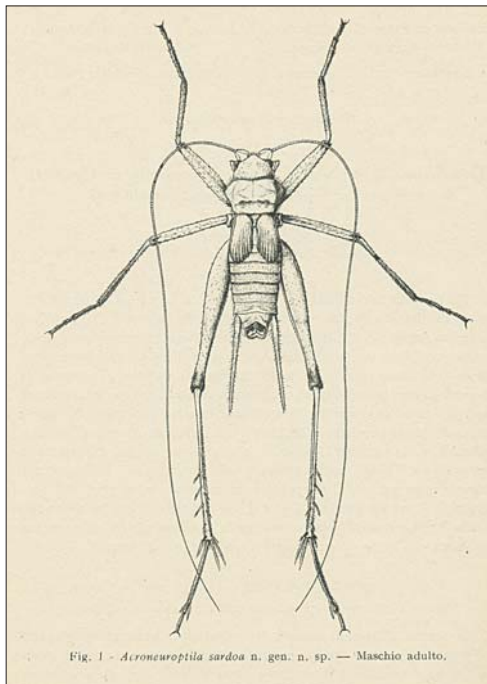
Rappresentazione schematica della distribuzione dei principali enzimi lungo i tubi malpighiani anteriori dell'adulto di *Dacus oleae* Gmel. L'intensità del tratteggio è proporzionale alla positività della reazione istochimica: d, segmento distale dei tubi malpighiani; i, segmento di transizione; p, segmento prossimale; u, uretere; m, mesentero.

Distribuzione dei principali sistemi enzimatici nei Tubuli Malpighiani di *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Baccetti, 1962).

riguardo, ai risultati ottenuti ormai mezzo secolo fa da Baccetti con fini indagini ultrastrutturali e istochimiche proprio su questi organi iniziati con lo studio dei Diaspini (BACCETTI, 1961) e culminati con la definizione dell’organizzazione istochimica dei tubi malpighiani di larve e adulti di *Dacus oleae* (MAZZI, BACCETTI, MASSIMELLO, 1962).

Sarebbe veramente lunga la lista dei filoni di ricerca percorsi, a volte molto distanti tra loro, ma tutti attraversati ottenendo risultati innovativi: basti pensare alle ricerche sul collagene negli artropodi, alla morfologia degli occhi negli aracnidi o all’ultrastruttura del tegumento dei Tardigradi (...).

Tutto questo prende avvio dallo studio degli Ortotteri, gruppo mai abbandonato da Baccetti al quale dedicò ogni tipo di studio descrivendo inoltre Generi e Specie nuove, senza mai abbandonarlo, anche quando la notorietà di studi di rilevanza mondiale sulla riproduzione animale e umana avrebbero potuto distoglierlo completamente da qualcosa cui dedicava tempo sicuramente per passione di “entomologo”. Alle pubblicazioni di Baccetti sugli Ortotteri, andrebbe sicuramente dedicato tempo e attenzione



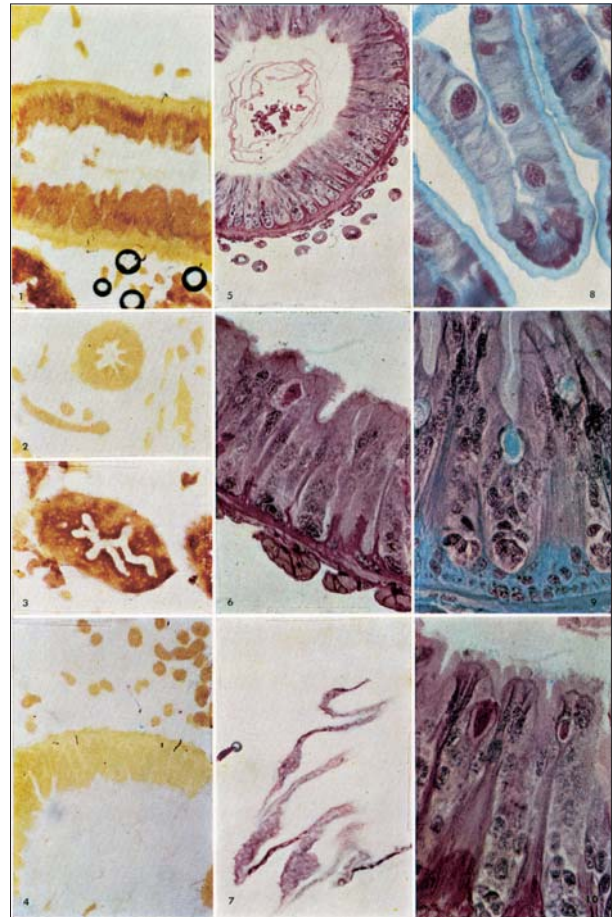
Acroneuroptila sardoa n. gen. n. sp. (Baccetti, 1959).

in modo esclusivo, cosa oggi non concessa ma sulla quale volevo almeno lasciare una traccia i lavori dedicati agli ortotteri cavernicoli.

Ricerca di frontiera ma anche capacità di dire senza giri di parole che ogni nuovo campo di studio, tecnica o strumentazione, fosse anche la più avanzata, utilizzabile per lo studio dell'entomologia e non solo di questa, non può esistere senza solide basi nei settori tradizionali. Scrisse infatti Baccetti negli atti dell'XI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia di Portici nel suo lavoro "Attualità della faunistica entomologia": ...è sentita soprattutto l'esigenza di un ritorno alla sistematica dei cervelli migliori. Ciò è dovuto alla precisa constatazione che se muore la sistematica muore tutta la biologia... (BACCETTI, 1978).

Lo sguardo fin dagli inizi della sua lunga carriera rivolto agli orizzonti da svelare nella ricerca di base ma non per questo indifferente alle problematiche della difesa fitosanitaria delle colture agrarie. Si può ricordare al riguardo i lavori sui Coleotteri Curculionidi dannosi alle leguminose da foraggio del 1960 e dello stesso anno il lavoro pubblicato insieme a Melis su "Metodi di lotta vecchi e nuovi sperimentati contro i principali fitofagi dell'olivo in Toscana".

Cui si aggiungono le ricerche dei primi anni '60 sull'uso delle radiazioni ionizzanti in relazione alla tecnica di utilizzo degli insetti sterili (BACCETTI, 1961; BACCETTI e ZOCCHI, 1962), cui si sono accompagnate indagini sulle alterazioni dell'epitelio intestinale (...).



Epitelio intestinale della cavalletta *Aiolopus strepens* Latr. dopo il trattamento con 1-metil N-metilcarbammate (Baccetti, 1962).

Nel settore del controllo delle specie dannose si inserisce anche un lavoro relativo alle strategie di lotta utilizzabili contro il Ragno giallo della vite "Prove di lotta condotte in Toscana contro... *Eutetranychus carpini vitis* Dossé (BACCETTI e PEGAZZANO, 1961).

Entomologo forestale anche, capace descrivere specie nuove per gli ecosistemi boschivi, come nel caso del *Coeliodes solarii* (BACCETTI, 1959), o di stilare trattazioni complete di interi gruppi, come per il lavoro "Le cocciniglie italiane delle Cupressacee", pubblicato sul volume di 'Redia' del 1960, opera di riferimento ancora oggi (BACCETTI, 1960).

Come da non tralasciare, nell'ultimo periodo, il suo contributo alla giornata di studio organizzata nel 2003 dall'Accademia dei Georgofili dedicata all'evoluzione dei mezzi di difesa fitosanitaria (BACCETTI, 2003).

Non per questo fu però indifferente alle ricadute delle attività umane, tanto da dedicare nel Congresso Nazionale Italiano di Perugia del 2005 uno dei suoi ultimi pregevoli lavori alla tematica "Biodiversità degli insetti e sostenibilità ambientale", trattata con quella capacità tutta sua di dia-

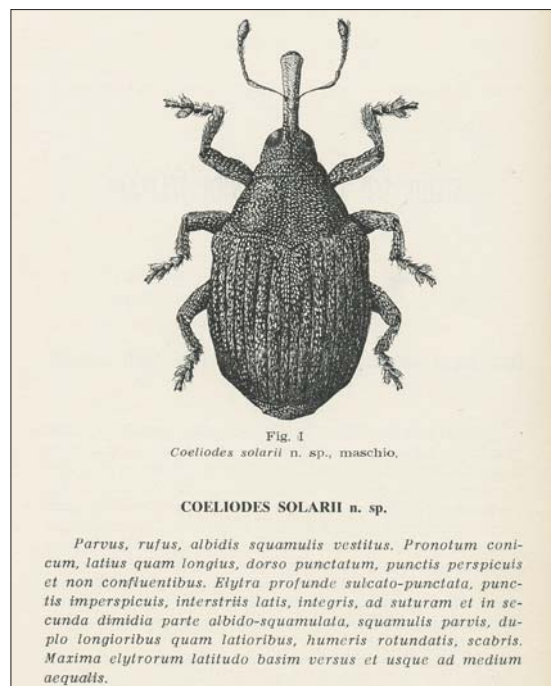
logare con amichevolmente con gli antichi per delineare le strade per il futuro. Non per nulla a conclusione di questo lavoro, venne sottolineata l'importanza della biodiversità culturale, chiamata libertà, puramente fenotipica, disperatamente difesa dall'uomo, di cui Baccetti ci chiese di non dimenticare le lezioni derivanti dai maldestri tentativi operati da tutte le peggiori dittature di mettere sopra le mani con tragici esperimenti pseudo scientifici (BACCETTI, 2005).

Scienziato e tecnico soprafino in quanto alcuni dei suoi lavori sono stati dedicati proprio al perfezionamento di tecniche di preparazione del materiale biologico (es. Il disseccamento al punto critico per la conservazione di larve e adulti di insetti a tegumento molle (BACCETTI, 1975) e alla messa a punto di innovative metodiche di osservazione nel campo della microscopia elettronica.

Poteva forse crescere in modo consueto partendo da tale inizio un ragazzo che aveva da aggiungere, al mondo che respirava, una curiosità sconfinata e un acume raro da incontrare, accompagnato ad una facilità incredibile di scrivere di cose di scienza, con eleganza rara e talvolta con naturale e garbata ironia, scrivendo allo stesso modo di anatomia, di fisiologia, di storie accademiche e di dispute quasi obbligate nei giochi di ruoli che Baccetti conobbe e attraversò direttamente come ricercatore, insegnante e membro di innumerevoli accademie e consessi scientifici di ogni tipo.

Vale la pena ricordare la descrizione da lui stesso data degli entomologi: *Essendo la classe degli Insetti tra le più specializzate ed evolute del regno animale, il suo studio ha sempre richiesto attitudini e forma mentis particolari... L'entomologo è stato... spesso pioniere e spesso sorpassato, in ambedue i casi individuo fuori moda, solitario, fantasioso, bastante a se stesso, facile alla presunzione e perciò al litigio.*

Nel momento di commemorare Baccio Baccetti io ho l'impressione di trovarmi di fronte ad uno dei lavori più difficili che mi sia mai capitato. Forse sarebbe stato agevole concentrarsi sulla sua geniale ed imponente produzione scientifica, anche con il solo riferimento agli invertebrati, ma così facendo non sarebbe stato possibile, per me, metterne in risalto appieno il personaggio. Non avrei neanche potuto, probabilmente a causa dei miei limiti, delineare la figura di un uomo così geniale e brillante, come raramente è dato di incontrare nel mondo scientifico. Anche per questo che aprendo questa mia lettura ho voluto usare per Baccetti le parole che egli stesso usò nel 1980 per ricordare Emmanuele Padoa, livornese di nascita, che proprio a Siena diede alle scienze biologiche lavori di altissimo livello. Quel Padoa di



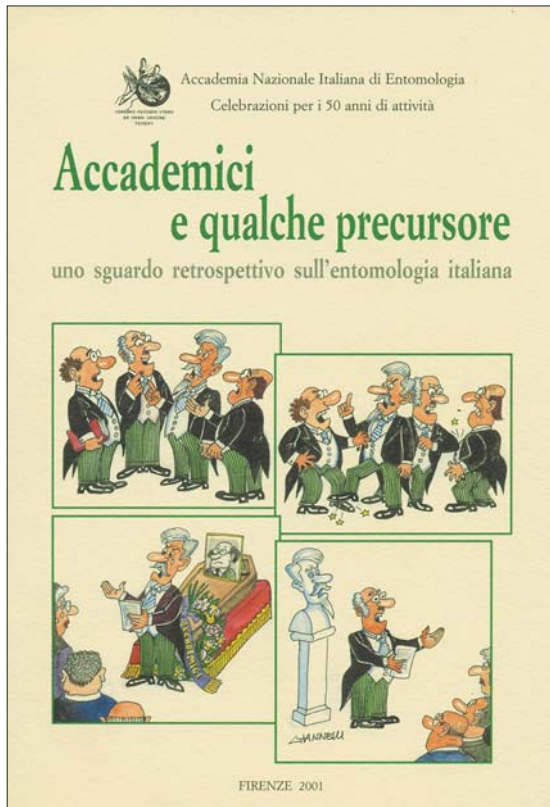
Coeliodes solaris n. sp. (Baccetti, 1959).

cui Baccetti ha ripetuto varie volte anche a me le seguenti parole “È questo il valore vero delle scienze, e il loro primo scopo: insegnare a ragionare, insegnare a un numero sempre più vasto di uomini a comportarsi come esseri razionali, liberandoli dagli antichi terrori e dagli antichi miti, pur mantenendo vivi in essi, per l'ammirazione dei progressi conseguiti, il senso dei valori, cioè il giudizio morale, e il desiderio di maggior conoscenza, che diventa poi l'esigenza di maggior libertà”.

Dal '400 fino all'epoca recente la ricerca entomologica e più in generale zoologica ha trovato in Toscana il suo motore nella spinta derivante dai problemi agrari e forestali, da cui discende il peso dell'entomologia applicata. Da quell'iniziale periodo si è dipanata l'affascinante storia della formazione di una “Scuola Entomologica”, di base e di stampo agrario-forestale, che si è fregiata di vari tra i più gloriosi nomi di scienziati, che hanno operato lungo sei secoli di studi, ricerche ed esperienze.

Degli uomini le cui storie disegnano i tratti iniziali e intermedi del sentiero dell'entomologia toscana Baccio Baccetti è stato il costante erudito ed attento archeologo, in grado di parlare e far parlare quanti la passione ha fatto divenire entomologi, prima ancora che medici, farmacisti, matematici e uomini di scienza e di chiesa.

Di quello che il pensiero e la penna di Baccetti hanno lasciato vorrei perciò evidenziare il suo paziente lavoro, strappato incredibilmente non solo in quali ritagli del suo tempo di ricercatore, a rico-



Copertina del libro "Accademici e qualche precursore, uno sguardo retrospettivo sull'entomologia italiana" curato da Baccetti nel 2001 in occasione del 50° anniversario della fondazione dell'Accademia.

struire la storia della nascita dell'entomologia, ridando vita ad uomini che posero il nostro Paese ai vertici del prestigio scientifico mondiale sfidando inquisitorie affanni della vita e dei quali ben pochi serbavano il ricordo o un qualche tipo di memoria.

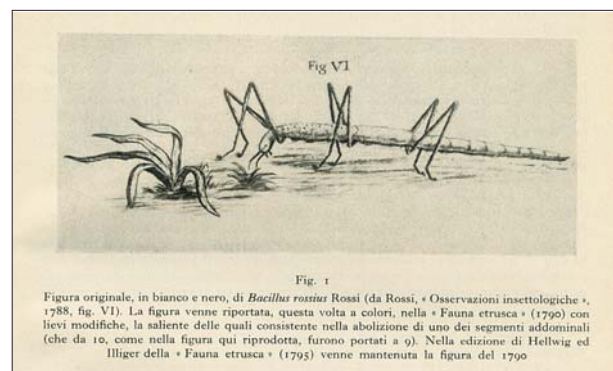
Baccio Baccetti iniziò nel 1957 a pubblicare un primo lavoro su un testo di Pietro Rossi stampato nel 1788 dal titolo "Osservazioni insettologiche del sig. Pietro Rossi, Entomologo di fama mondiale vissuto in pieno settecento, Regio Professore nell'Università di Pisa, indirizzate al Sig. Conte Hochenwart, Professore d'Istoria Politica per le AA. RR. Gli Arciduchi Principi di Toscana", per il quale con grande sorpresa lo stesso Baccetti evidenziò l'assenza di citazioni da parte dei principali tassonomi. Tale opera conteneva la prima citazione del *Bacillus rossius* (sub *Pseudomantis rossia*) (BACCETTI, 1957).

Di Rossi, narrò come, frequentando la Specola all'età di 8 anni (1939) e sfogliando l'unico libro che parlava dell'Entomologia toscana, adornato di splendide tavole a colori, la 'Fauna Etrusca', nacque in lui il desiderio di capire chi fosse stato quest'uomo che finì per considerare un amico immaginario. Proseguì poi negli anni liceali e universitari a

cercare di Rossi data di nascita, manoscritti, opere e diplomi seppelliti nelle limonaie di Boboli e nel 1962 pubblicò il lavoro dei primi anni '60 "Pietro Rossi naturalista toscano del '700" nel quale mise in risalto l'estrema importanza di quello che nato "...come un semplice catalogo della propria collezione entomologica" divenne un'opera fortemente innovativa per 3 aspetti principali che Baccetti con grande acume evidenziò: 1) nelle "...descrizioni il Rossi usa un accorgimento che nessuno aveva adottato prima. Per le specie già descritte riporta tutte le diagnosi, o una loro sintesi, dovute al descrittore originale ed agli altri autori consultati. Poi stampa la propria descrizione comparandola con le precedenti"; 2) "...mentre i più noti lavori di sistematica sembrano volutamente ignorare qualunque approfondimento corologico ed etologico ... il ...Rossi fornisce dettagli sulle date e le località di raccolta; 3) a quanto già detto si accompagnano particolari inediti sull'etologia delle specie come nel caso della *Acherontia atropos*. Nella lettura su Pietro Rossi, tenuta a Pisa insieme con R. Poggi nel 2001 durante la celebrazione del secondo centenario della prima cattedra di entomologia del mondo, così Baccetti scrisse dell'entomologo toscano "...il nostro dimostrò acume di etologo specializzato" (BACCETTI e POGGI, 2001).

Dopo la pubblicazione dei primi due lavori su Pietro Rossi, Baccetti mostrò con il tempo un interesse crescente non solo per la storia dell'entomologia ma soprattutto per gli entomologi e loro vicende, da lui così descritti nelle celebrazioni del 250° Anniversario dell'Accademia dei Georgofili, "Personaggi stravaganti, mossi da una passione sviscerata per queste bestioline multiformi e multicolori, che hanno spesso l'ostinato costume di divorare quelle derrate che l'uomo ha sempre cercato di coltivare e conservare" (BACCETTI, 2004).

Nel 1965 Baccetti recuperò e salvò il primo



Riproduzione della figura originale di *Bacillus rossius* Rossi nella pubblicazione di Baccetti, 1957 "Notulae orthopterologicae. IV. Su un'opera di Pietro Rossi dimenticata dai sistematici e sulla data di descrizione del *Bacillus rossius* Rossi".

vero testo di argomento entomologico scritto in lingua volgare il manoscritto inedito quattrocentesco “Trattatello di apicoltura del porre i mori e del porre i bigatti”, databile nell’ultimo quarto del secolo XV, conservato nella Biblioteca Nazionale di Firenze fra i codici palatini, alluvionato nel 1966 ma solo un anno prima interpretato, fotografato e pubblicato da Baccetti nelle Memorie dell’Accademia Nazionale Italiana di Entomologia (BACCETTI, 1965). Nella sua presentazione dell’anonimo “Trattatello” Baccetti evidenziò con una accurata disaminastorico-scientifica, dipanata con grande attenzione a partire dalla “Storia degli animali” di Aristotele, come quest’opera andasse a colmare un intervallo di quasi due secoli di silenzio della zoologia e rappresentasse il “...primo embrione di opera entomologica specializzata” nel quale venivano utilizzati risultati ed esperienze personali (BACCETTI, 1965).

Forse è proprio questo il punto di partenza del “sentiero dell’entomologia toscana” e Baccetti ne divenne lo scopritore.

Nella sua pubblicazione su “L’Entomologia applicata all’agricoltura nel quadro del movimento accademico in Toscana”, Baccetti evidenziò poi come al “Trattatello” non avessero fatto seguito in questa regione nel ’500 grandi ricerche in tale settore e come le varie Accademie che con i Medici rappresentarono la ricerca, coltivassero essenzialmente le scienze umane. Come ricorda Baccetti umanista è anche il più noto toscano che in tale epoca tratta di cose animali, Monsignor Giovanni Rucellai (nato a Firenze nel 1475) con il suo poemetto “Le Api” composto nel 1524 (BACCETTI, 2004). Ma Baccetti parlando di G. Rucellai ricorda anche come costui sia stato un antesignano della microscopia, che ingrandiva le api utilizzando sistemi di specchi.

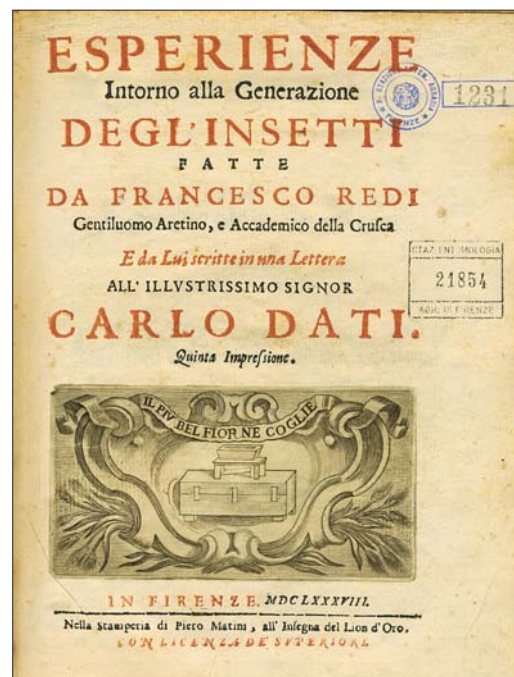
A parte altri brevi riferimenti, come quello al testo “La Coltivazione” di Luigi Alamanni pubblicato nel 1546 a Firenze, Baccetti sottolinea con forza come una vera svolta si verifici solo con il passaggio al secolo successivo, prendendo avvio da Cosimo III che nel 1610 richiama in Firenze Galileo Galilei, il quale l’anno prima aveva costruito un apparecchio per ingrandire cose ed animali molto piccoli, chiamandolo “Occhialino” e regalandone un esemplare all’Accademia dei Lincei, ove grazie allo strumento, come scrive Baccetti nelle Memorie della Società Italiana di Entomologia, diviene il primo studioso “...a mettere sotto il microscopio un animale, ed a descriverlo, quaranta anni prima che Robert Hooke intravedesse in una pianta i primi contorni cellulari (BACCETTI, 1992).

Baccetti sottolineò poi il merito dell’ultimoge-



Francesco Redi nel medaglione in gesso conservato presso il CRA - Centro di Ricerca per l’Agrobiologia e la Pedologia di Firenze.

nito di Cosimo II, Leopoldo dei Medici, di aver fondato nel 1657, pervaso dallo spirito galileiano, l’Accademia del Cimento che per 10 anni diverrà centro di ricerca sperimentale e di discussione “...continuando lo spirito e la tradizione dei Lincei, dopo la chiusura della loro Accademia, avvenuta nel 1630”. Scrive Baccetti nel 2004 “...il miglior frutto dell’Accademia del Cimento..., è il medico, letterato e naturalista Francesco Redi (1626-1698), Archiatra di Cosimo III, probabilmente una delle più grandi figure che abbia svolto



Copertina del volume di Francesco Redi “Esperienze intorno alla generazione degli insetti”. Prima Edizione stampata in Firenze, Stamperia Piero Matini, all’Insegna del Lion d’Oro, 1688.

la sua attività di scienziato nel campo della biologia animale. Baccetti nei suoi scritti su Redi mise in grandissimo rilievo come F. Redi, da lui definito “ingegno enciclopedico altissimo”, dovesse essere considerato a pieno titolo fondatore dell’Entomologia applicata e della Parassitologia.

Redi distrusse le superstizioni sulla “Generazione Spontanea” pubblicando nel 1668 le sue “Esperienze intorno alla generazione degli Insetti” e nel 1684 il testo “Animali viventi che si trovano negli animali viventi”. Così il Redi con il peso della sua logica sperimentale lanciò quell’indagine sulla riproduzione degli insetti nocivi in campo medico e agrario, che doveva aprire la strada alle indagini per il controllo di zanzare e mosche che hanno visto convergere le energie di moltissimi entomologi degli ultimi secoli del passato millennio (BACCETTI e NANNELLI, 2007).

A Baccetti anche il merito di averci inoltre ricordato che allievi di Redi furono Pietro Paolo da Sangallo, Antonio Vallisnieri e Giuseppe Del Papa (BACCETTI, 2003).

Redi aveva descritto come mosche, moscerini, zanzare, cavallette, farfalle, acari, scorpioni ed altri animali deponevano le loro uova in ambienti con caratteristiche ben definite, e come da queste fuoriuscissero “animaluzzi vermiformi”, che con trasformazioni successive finivano per dare adulti identici a quelli che avevano deposto le uova. Come scrivono BACCETTI e NANNELLI nel 2007 P.P. da Sangallo si dedicò con scrupolo allo studio dello sviluppo delle zanzare, allevandole dapprima in contenitori di vetro ben chiusi e descrivendo i momenti più importanti della metamorfosi anche con l’ausilio di disegni realizzati con particolare cura.

I risultati vennero dal da Sangallo raccolti in una relazione in forma di lettera, dedicata all’illustrissimo sig. Francesco Redi, stampata nel 1679. Lo studio venne ripreso e pubblicato integralmente da Baccetti e Nannelli con un ampio commento nelle pubblicazioni dell’Accademia Nazionale Italiana di Entomologia intitolate “Tavole rotonde sui maggiori problemi riguardanti l’entomologia agraria in Italia”. Vale la pena qui ricordare ciò che con enfasi riportarono Baccetti e Nannelli su come da Sangallo concludeva la sua opera parlando dei rimedi noti e possibili per difendersi dalle zanzare come l’olio di assenzio lodato da Plinio, o il bagnarsi con vino contenente olio di assenzio, o ancora l’idea di impiastarsi la faccia con “...scialiva dopo che s’è ben bene masticato il cumino, o ancora l’uso di bollitura di Ruta, Nigella o canizia, o sporcandosi tutti con carboni di ginepro, o riempirsi di olio aceto e salvia pesta”. Conclude il da Sangallo “Tutte queste... sono totalmente inutili e

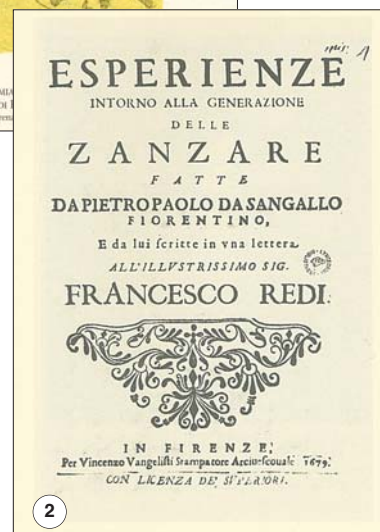
fastidiose, e moleste più delle Zanzare istesse, contra le quali un bel riparo mi sembra quello solo, edunico, che fu ritrovato anticamente da’ pescatori dell’Egitto, cioè a dire un buono zanzariere, che perfettamente circondi il letto, e a’ nostri tempi sia fatto di gentilissimo velo di Bologna...”.

Dei discepoli di Redi fece parte anche Antonio Vallisnieri, lucchese, che si dedicò allo studio di vari insetti, collegando con accuratezza, come evidenziato da BACCETTI (2003), la morfologia microscopica di vari insetti con i loro costumi.

Al terzo allievo di Francesco Redi, Monsignor Giuseppe Del Papa, Baccetti, insieme con Nannelli e Schettini Piazza, dedicò nel 2005 un ulteriore pregevole lavoro intitolato “La lotta alle cavallette iniziò ai tempi Medici”. La parola “Locuste” aveva da sempre evocato flagelli biblici e Baccetti e collaboratori nel loro volume misero in risalto la sensibilità dimostrata da Cosimo III dei Medici nell’incaricare nel 1711 il suo Archiatra e precettore di famiglia Del Papa a prendersi cura del fenomeno delle orde di cavallette studiandone la biologia riproduttiva con il fine ultimo di individuare possibili strategie di difesa (BACCETTI *et al.*, 2005).

Il testo di Del Papa venne stampato a Firenze nel 1716 senza che vi venisse riportato il nome dell’Autore con il titolo “Relazione delle diligenze usate con felice successo nell’anno MDCCXVI per distruggere le cavallette le quali avevano stranamente ingombrato gran parte delle Maremme di Pisa, di Siena, di Volterra e tutte le campagne di Piombino, Scarlino e Suvvereto”. La paternità dell’opera venne attribuita al Del Papa solo grazie all’elogio fatto da un suo amico romano Monsignor Giovanni Bottari. Come scrisse BACCETTI (2005) il Del Papa, coltissimo prelato, professore di medicina nell’Università di Pisa, si rivela finissimo entomologo agrario con ricerche tassonomiche di tipo morfologico-comparativo e con studi etologici che fanno compiere allo studio degli Ortotteri il primo vero balzo in avanti dai tempi delle osservazioni degli scolastici come Alberto Magno e da quel poco che era stato scritto successivamente alla fine del XVI secolo dall’Aldrovandi.

Baccetti evidenzia inoltre nel volume su Del Papa come lo studioso abbia posto in risalto con grande realismo l’influenza di fattori ambientali quali la siccità sullo sviluppo delle infestazioni di cavallette, basandosi anche su esperimenti da lui condotti in prima persona trasferendo le uova di questi voraci insetti dal pieno campo in una serra calda del Giardino dei Semplici a Pisa. Del Papa, ricorda Baccetti, con le sue esperienze e dissezioni trova ed espone con rigore spiegazioni scientifiche sulle modalità di riproduzione delle “locuste”,



1. Copertina del fascicolo X “La lotta alle cavallette iniziò al tempo dei Medici” curato da Baccetti, Nannelli e Schettini Piazza contenente una copia del manoscritto di Giuseppe Del Papa su “Relazione delle diligenze usate con felice successo nell’anno MDCCXVI. Per distruggere le cavallette le quali avevano stranamente ingombro una gran parte delle Maremme di Pisa, di Siena, di Volterra, e tutte le Campagne di Piombino, Scarlino, e Suvereto” (2).

1. Copertina del fascicolo XIV curato da Baccetti e Nannelli contenente la copia del manoscritto di Pietro Paolo da Sangallo “Esperienze intorno alla generazione delle zanzare fatte da Pietro Paolo da Sangallo Fiorentino, e da lui scritte in una lettera all’illustrissimo sig. Francesco Redi” (2).

ricusando anche lui, allievo del Redi, l’idea della “generazione spontanea”.

Dopo Del Papa compare Pietro Rossi, citato agli inizi di questa lettura, al quale così tante energie Baccetti dedicò ricavandone la spinta iniziale per le sue indagini sugli uomini di questa storia.

Ciò che accadde in seguito, come illustrato da Baccetti in varie pubblicazioni di carattere generale sugli studi di Zoologia in Toscana, si snoda attraverso figure come quella di Giorgio Santi, nato a Pienza nel 1746 che nel 1810 pubblica anch’esso un buon testo sulla lotta alle cavallette in Val d’Orcia (BACCETTI, 2004) e Carlo Passerini che nel 1829 scrisse sulla Mosca delle Olive e altri insetti nocivi.

Baccetti ricorda poi che arrivati a tal punto la storia dell’entomologia toscana proseguì senza par-

ticolari acuti fino ad incrociarsi con l’impegno nel settore zoologico di Bettino Ricasoli, che dopo la caduta dei Lorena nel 1859, da appassionato naturalista realizzò la costituzione dell’Istituto di Studi Superiori di Firenze, con una Sezione per le Scienze Naturali e l’istituzione di una cattedra di Zoologia. In un suo lavoro del 1989 Baccetti ricorda come “Istituita la cattedra, occorreva ricoprirla, e le cose furono, secondo il solito, fatte in casa. Ma la prassi, una volta tanto, dette un buon risultato”. Venne infatti nominato Adolfo Targioni Tozzetti (1823-1902), botanico, fisico, chimico, di cui Baccetti ha scritto “...fondò una scuola zoologica destinata a diventare, con varie ramificazioni, una delle più importanti del mondo” (BACCETTI, 1989).

Nei suoi scritti dedicati a quel periodo Baccet-

ti descrisse il grande fervore degli anni successivi culminati con la fondazione della Società Entomologica italiana, in cui al Targioni Tozzetti, sempre più coinvolto dall'allora Ministero dell'Agricoltura, si associarono Ferdinando Piccioli e Pietro Stefanelli oltre a vari altri come Enrico Hillyer Giglioli ed Enrico Benvenuti. Le parole utilizzate da Baccetti furono le seguenti "Sono anni stupendi per la Zoologia". Seguite da una ulteriore dichiarazione entusiastica inserita nella sua relazione ai Georgofili del 2003 su "Evoluzione dei mezzi di difesa fitosanitaria", nella quale Baccetti ricordò come Targioni avesse lanciato lo studio delle Cocciniglie in Italia e nel mondo, tutelato le vigne d'Europa guidando il movimento antifillosserico, inaugurando lo studio delle biocenosi come tali e non più degli organismi quali entità isolate, impersonando la figura dell'entomologo applicato moderno con basi di sistematica e di etologia da concretizzare nella capacità di elaborazione di nuove strategie di protezione delle colture (BACCETTI, 2003).

Un altro fatto di questo periodo ha entusiasmato grandemente Baccio Baccetti, la fondazione a Firenze nel 1875 da parte del Targioni, della Stazione di Entomologia Agraria, prima istituzione del genere in Europa e probabilmente nel mondo, nella quale a proseguire l'opera venne chiamato in seguito lo studioso che diverrà a giudizio di molti il più grande entomologo ed acarologo, Antonio Berlese.

Per Berlese, figura titanica nel nostro panorama scientifico ed eccelso disegnatore, Baccetti nutrì sempre una grandissima e incondizionata ammirazione, percepibile nelle sue note dedicate al grande entomologo, padovano di nascita ma a tutti gli effetti toscano di adozione nel periodo più fecondo per la sua immensa produzione scientifica, culminata dal alto degli studi di base nelle indagini sulla metamorfosi e dal lato delle scienze applicate nella realizzazione dei più importanti e riusciti interventi di lotta biologica.

Di molte altre cose successive Baccio Baccetti ha scritto, con la sua naturale eleganza di tratto, ma è a questo punto che la mia scarna trattazione odierna si conclude, perché credo che verso gli antichi Baccetti, dando il meglio di sé, abbia ricostruito la storia riunendo le "storie".

Rimane in questo, da parte mia, un rammarico, non essere ancora riuscito a terminare uno scritto delineato insieme nell'ultimo tratto della sua vita, che doveva rendere ancor più giustizia al Redi e il cui titolo era già scritto "Francesco Redi e la nascita dell'Entomologia Forestale".

A conclusione di questa mia permettetemi di ringraziare i presenti per la possibilità data all'inte-



ro ex Istituto di Zoologia Agraria di ricordare un suo grande ricercatore. Un ringraziamento particolare e personale da parte mia a voi tutti per avermi permesso di partecipare a questo momento, dandomi l'occasione di inviare un affettuoso saluto pubblico a Baccio Baccetti, della cui amicizia conserverò il ricordo, con cura e doveroso rispetto.

Addio Baccio.

BIBLIOGRAFIA

- BACCETTI B., 1957 – Notulae orthopterologicae. IV. *Su un'opera di Pietro Rossi dimenticata dai sistematici e sulla data di descrizione del Bacillus rossius Rossi*. - Mem. Soc. Ent. Ital., XXXVI: 61-64.
- BACCETTI B., 1959 – Notulae orthopterologicae. XIII. *Indagini sugli Ortotteroidei della Maiella per il Centro di Entomologia Alpina e Forestale del CNR*. - Redia, XLIV: 245-306.
- BACCETTI B., 1959 – *Studi sui Curculionidi Italiani*. III. *Una nuova specie di Coeliodes vivente sulla quercia*. - Frustula Entomologica, II, N. 4: 1-8.
- BACCETTI B., 1960 – *Le cocciniglie italiane delle Cupressacee*. - Redia, XLV: 23-111.
- BACCETTI B., 1961 – *Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli Insetti*. II. *La cellula epiteliale del mesentero in un Ortottero, un Coleottero ed un Dittero adulti*. - Redia, XLV: 157-165.
- BACCETTI B. 1961 – *I tubi malpighiani nella femmina adulta dei Diaspini (Hemiptera Omoptera Coccoidea)*. - Verh. XI Int. Kongr. Ent. Wien, I, pp. 752-758.
- BACCETTI B., PEGAZZANO F., 1961 – *Prove di lotta condotte in Toscana contro il Ragno giallo della vite (Eotetranychus carpini vitis Dosse)*. - Redia, XLVI: 177-181.
- BACCETTI B., 1962 – *L'azione di Sevin (1-naftil N-metilcarbammato) sull'epitelio intestinale degli Insetti*. - Redia, XLVII: 199-210.
- BACCETTI B., ZOCCHI R., 1962 – *Prove di lotta contro la*

- Processionaria del Pino mediante radiazioni jonizzanti.* - Redia, XLVII: 161-168.
- BACCETTI B., 1965 – “*Trattatello di apicoltura, del porre i mori e del porre i bigatti*” manoscritto inedito quattrocentesco. - Atti Acc. Naz. Ital. Entom., Memorie, Ser. I, n.1., 34 pp.
- BACCETTI B., 1975 – *Il disseccamento al punto critico per la conservazione di larve e adulti di insetti a tegumento molle.* - Boll. Soc. Entom. Ital., 107: 42-47.
- BACCETTI B., 1976 – *Attualità della faunistica entomologica.* - Atti XI Congr. Naz. It. Entomologia, 10-15 maggio 1976: 165-171.
- BACCETTI B., 1992 – *Francesco Stelluti (1577-1653) e la nascita della morfologia zoologica.* Mem. Soc. ent. Ital., 71(II): 391-408.
- BACCETTI B., POGGI R., 2001 – *Pietro Rossi, naturalista toscano del '700.* pp. 7-38. In: Accademici e qualche precursore - uno sguardo retrospettivo sull'entomologia italiana. - Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Firenze, 554 pp.
- BACCETTI B., 2003 – *Storia della difesa fitosanitaria fino alla metà del XIX secolo. Dalla metà del XIX a quella del XX secolo.* Entomologia Agraria. Giornata di Studio “Evoluzione dei mezzi di difesa Fitosanitaria”, Firenze 11 dicembre 2003, I Georgofili. Quaderni 2003-1. Società Editrice Fiorentina: 7-29.
- BACCETTI B., 2004 – *L'Entomologia applicata all'agricoltura nel quadro del movimento accademico in Toscana.* Accademia dei Georgofili “Celebrazioni del 250° Anniversario”. Firenze, Società Editrice Fiorentina: 123-159.
- BACCETTI B., 2005 – *Biodiversità degli insetti e sostenibilità ambientale.* - Atti XX Cong. Naz. Ital. di Entomologia, Perugia, 13-18 giugno 2005: 3-7.
- BACCETTI B., NANNELL R., SCHETTINI-PIAZZA E. (a cura di), 2005 – *La Lotta alle Cavallette iniziò ai tempi dei Medici.* Tavole Rotonde sui maggiori problemi riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia. Editore Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Tip. Coppini, Firenze, Dicembre 2005, X fascicolo, 175 pp.
- BACCETTI B., NANNELLI R. (a cura di), 2007 – *Pietro Paolo Da Sangallo e gli epigoni del Cimento.* In: Monog. XIV. Prime esperienze sulla generazione delle zanzare. Accademia Nazionale italiana di Entomologia (ISBN 13: 978-88-901589-7-1) pp. 9-15.
- MAZZI V., BACCETTI B., MASSIMELLO G., 1962 – *Localizzazioni enzimatiche nei tubi malpighiani della larva di Dacus oleae Gmel.* - Redia, XLVII: 99-103.

COMMEMORAZIONE

IN MEMORIA DI CESARE CONCI (1920-2011)

ROBERTO POGGI (*)

(*) *Conservatore Onorario, Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria", Via Brigata Liguria 9, 16121 Genova.*
Commemorazione tenuta nella seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 febbraio 2012.

Cesare Conci ha costituito per quasi un settantennio una figura di grande rilievo nell'ambito dell'Entomologia italiana, lasciando una produzione totale di quasi 250 contributi scientifici.

Era nato a Rovereto, in provincia di Trento, il 26 aprile 1920.

Attratto dalle Scienze Naturali, ancor ragazzino iniziò a frequentare il Museo di Rovereto e successivamente quello di Trento.

Dopo aver conseguito nel 1938 la maturità al Liceo Classico di Rovereto, si trasferì a Genova, dove aveva dei parenti, per frequentare l'Università. In tale periodo entrò dunque in contatto col mondo entomologico locale, e in particolare con il Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria" e con la Società Entomologica Italiana, ed allacciò una serie di amicizie genovesi che poi mantenne salde per tutta la vita.

Nel periodo estivo ritornava comunque a Rovereto, dove ad esempio nel 1940 collaborò al trasferimento in una nuova sede delle collezioni zoologiche e botaniche del museo cittadino così come al successivo sfollamento per cause belliche dei materiali museologici e della biblioteca dell'Accademia Roveretana degli Agiati.

A luglio del 1942 si laureò in Scienze Naturali, con massimo dei voti e lode, discutendo una tesi sui Mallofagi. Poco dopo fu chiamato sotto le armi; frequentato il Corso Ufficiali, fu nominato Sottotenente di Artiglieria e in tale posizione rimase fino all'8 settembre 1943.

Tra il 1943 e il 1946 fu insegnante supplente di Scienze Naturali, Chimica e Geografia presso il Liceo Classico e l'Istituto Tecnico di Rovereto.

Col 1946 iniziò l'attività di docenza presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Genova, allora diretto dal Prof. Giuseppe Scortecci, con un'interruzione dal novembre 1947 al maggio 1948 per ulteriori sei mesi di servizio militare. Prima Aiuto incari-



Conci (4° da sinistra) il giorno della laurea (luglio 1942), fotografato davanti al portone posteriore del Museo di Genova, con Remigio Cucini, Mario Enrico Franciscolo (seduto), Gualtiero Timossi e Carletta Borgioli.

cato e poi, dal 1948, dopo un concorso, Assistente Ordinario con qualifica di Aiuto, svolse tutte le mansioni connesse alla sua carica, in particolare tenendo esercitazioni e seguendo tesi di laurea.

Contemporaneamente per sette anni, dal 1948 al 1955, insegnò Scienze Naturali, Chimica e Geografia presso il Liceo parificato Calasanzio di Genova Cornigliano.

Dal punto di vista della ricerca scientifica, durante il periodo "roveretano-genovese" Conci si occupò soprattutto di Mallofagi, Odonati e Speleologia.

Sui Mallofagi pubblicò una ventina di contributi, descrivendo tra l'altro 3 sottofamiglie, 24 generi, 1 sottogenere ed alcune specie.

Sugli Odonati diede alle stampe 15 pubblicazioni, tra le quali spicca il volume della "Fauna d'Italia", il primo della serie, compilato nel 1956 assieme a Cesare Nielsen.



Alle pendici del Monte Mondolè (CN), con Maria Adelaide Cherchi, 28.VI.1953.

Alla Speleologia dedicò invece oltre trenta lavori, con descrizioni, rilievi e dati sulle esplorazioni di oltre 200 grotte personalmente visitate; il contributo di maggior mole è quello destinato nel 1951 all'illustrazione della speleofauna della Venezia Tridentina, con la citazione di 276 specie. Va inoltre ricordata la sua partecipazione nel 1955 alla importante Spedizione italiana al Marguareis, conclusasi purtroppo tragicamente con un incidente in cui perse la vita lo speleologo Lucio Mersi.

Nel 1954 Conci conseguì l'abilitazione alla Libera Docenza in Zoologia, poi confermata 6 anni dopo, e dal 1954 al 1959 fu incaricato di tenere il corso di Istologia ed Embriologia presso l'Università di Genova; dal 1959 al 1963 tenne infine un corso libero di Entomologia, ma solo nella giornata del sabato, perché intanto nel 1957 era accaduto l'evento forse più importante nella sua carriera scientifica e cioè la vincita del concorso per Conservatore del Museo Civico di Storia Naturale di Milano, all'epoca diretto dal Dr. Edgardo Moltoni.

Nel periodo di permanenza al Museo di Milano realizzò molti interventi di ammodernamento nelle sale espositive, riordinò varie raccolte, incrementò in maniera notevolissima le collezioni scientifiche, ristrutturò la grande biblioteca ed ampliò il numero dei Conservatori, impiantando anche una Sezione di Botanica ed una di Paleontologia.

Visitò a scopo di studio anche tutti i musei scientifici italiani e numerosi istituti stranieri, sia in Europa che negli Stati Uniti. Portò a termine ancora qualche ricerca e partecipò inoltre a molti congressi, sia entomologici che zoologici, sia biogeografici che museologici, pubblicando spesso relazioni su tali convegni.

Non è infine da sottacere il grande numero di recensioni redatte su svariate decine di volumi e di articoli scientifici di diverso argomento.

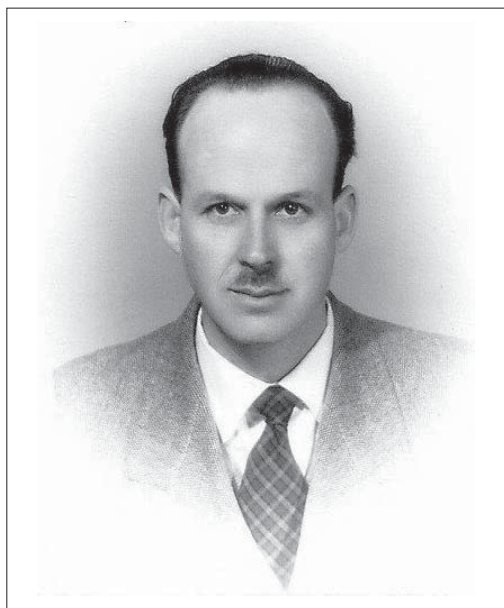
Nel 1968, alla morte di Fabio Invrea, fu nominato Presidente della Società Entomologica Italiana, alla quale si era iscritto nel 1939, e di cui era stato già Segretario (1952-1963) e poi Vice Presidente (1964-1967). Ebbe così l'onore di aprire i lavori dell'VIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, che si tenne a Firenze nel 1969 per celebrare il primo centenario della fondazione della Società, tenendo in particolare l'orazione inaugurale su "Cento anni di attività della Società Entomologica Italiana". Nello stesso 1969 fu chiamato a far parte dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia.

Tornando all'operoso periodo trascorso nel Museo di Milano, va ricordato che Conci si allontanò a poco a poco dai precedenti filoni di ricerca per iniziare una feconda attività editoriale di tipo didattico-divulgativo, legata anche ai suoi nuovi incarichi museologici.

Videro così la luce, nella serie "*I miracoli della Natura*" dell'editore Martello, i manuali sulla Zoologia (con Menico Torchio), i Coleotteri (con Eva Hülsmann), i Pesci (con Menico Torchio ed Eva Hülsmann), le Conchiglie (con Fernando Ghisotti) e le Pietre preziose e Pietre dure (con Vincenzo De Michele), in seguito ristampati più volte, oppure nella serie "*Il mondo della Natura*", pubblicata da Mondadori, la traduzione dall'inglese e l'adattamento (con Paola Manfredi) di quattro volumi, su Rettili, Uccelli, Insetti e Invertebrati, o ancora, per De Agostini, il volume sugli Insetti (con Italo Bucciarelli) nella collana "*Meraviglie della Natura*".



Conci (3° da sinistra), con Antonio Galvagni, Elvira Biancheri e Felice Capra (foto del maggio 1954, scattata nel Museo di Genova, studio del Dr. Capra).



Nel 1957.

Conci tenne poi la direzione scientifica di enciclopedie stampate a fascicoli settimanali da Vallardi (*“Natura Viva”*, *“La Flora”* e *“La Vita degli Animali”*), da Rizzoli (*“Il Mondo degli Animali”*) e da Piccoli (*“Natura che vive”*, con Luigi Cagnolaro), che in parte vennero poi tradotte anche in lingue straniere (francese, spagnolo, finlandese), fu redattore della *“Piccola fauna italiana”* pubblicata da Martello e partecipò alla revisione del testo del volume de *“La Fauna”*, edito dal Touring Club Italiano.

Fu attivo membro di varie società (es.: Società Italiana di Scienze Naturali, nell’ambito della quale ricoprì le cariche di Segretario e Vice Presidente) ed accademie (es.: Accademia Roveretana degli Agiati).

Tra l’altro fu poi Direttore Responsabile di moltissimi periodici: degli *“Atti”*, delle *“Memorie”* e di *“Natura”* editi dalla Società Italiana di Scienze Naturali, della *“Rivista di Ornitologia”* (fino al 2006), della *“Rivista Mineralogica Italiana”* e di *“Bollettino”* e *“Memorie”* della Società Entomologica Italiana (dal 1994 al 2008), mentre per molti anni fu inserito nei Comitati di Redazione della *“Rassegna Speleologica Italiana”* e della Società Malacologica Italiana e spesso curò personalmente anche la correzione dei manoscritti e delle bozze delle decine e decine di lavori che gli venivano proposti per la stampa.

A tutta questa intensa attività editoriale si accompagnarono i numerosi articoli di argomento museologico, come i contributi sulla storia del Museo di Milano, sul patrimonio scientifico ivi conservato, sugli incrementi delle collezioni e sul rinnovo dell’esposizione, che portarono tra l’altro alla pubbli-



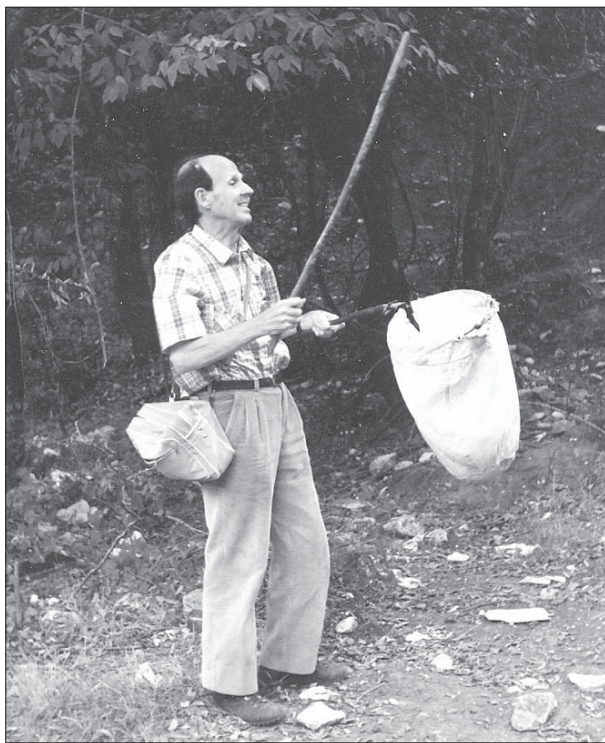
Con Athos Goidanich (a sinistra), all’inaugurazione dell’VIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (Firenze, 4.IX.1969).



A Segesta (TP) durante il 4° Congresso dell'Associazione Nazionale dei Musei Scientifici, con Sandro Ruffo (a sinistra) e Gino Tomasi (a destra) (22.X.1982, foto Poggi).

cazione di varie edizioni della Guida del Museo nonché di due edizioni della Guida del Museo di Rovereto (questa scritta con Livio Tamanini).

In seguito approfondì il filone di studi dedicati alla compilazione ed alla raccolta delle biografie degli entomologi italiani, che si concretizzò nel 1975



Nella Foresta Umbra, sul Promontorio del Gargano (FG), al rientro dal XVI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (28.IX.1991, foto Poggi)

con il fondamentale “Repertorio delle biografie e bibliografie degli scrittori e cultori italiani di Entomologia”, portato a termine nei ritagli di tempo che gli erano concessi dagli impegni gestionali del Museo, di cui frattanto era diventato Vice Direttore nel 1963 e Direttore l'anno dopo, nel 1964, al pensionamento di Moltoni.

Nell'istituzione scientifica milanese Conci rimase fino al 1981, quando anch'egli ottenne il collocamento a riposo, dopo 24 anni di intensa attività museologica, grazie alla quale fu anche incaricato di occuparsi degli aspetti della catalogazione dei beni nei musei scientifici italiani, nell'ambito dell'Associazione Nazionale dei Musei Scientifici.

Dopo la pensione, alla fine degli impegni amministrativi che tanto lo angustiavano, Conci ebbe un po' più di tempo per frequentare gli amici genovesi e roveretani, le sedute della nostra Accademia e i Congressi.

Ma soprattutto riprese con vigore la ricerca scientifica, dedicata in quest'ultima fase soprattutto alla raccolta e allo studio degli Emitteri Psilloidei, svolta sia sul campo che in laboratorio con la collaborazione dell'amico di sempre Livio Tamanini e in seguito di Carmelo Rapisarda. Dal 1982 al 1998 furono quasi 50 gli articoli dedicati alle Psille, con descrizione di numerose specie nuove e citazione di un centinaio di taxa non ancora segnalati per l'Italia, tanto che in una quindicina d'anni il numero di specie italiane venne praticamente raddoppiato.

Non tralasciò però il vecchio amore per la storia dell'entomologia, che si estrinsecò nel 1996 nella



Con Roberto Poggi (a sinistra) e Claudio Canepari (al centro), al rientro dall'ultimo viaggio in Corsica (Porto di Bastia, 29.V.2002).

stampa dell' "Iconography of Italian entomologists, with essential biographical data" e dell' "Elenco delle collezioni entomologiche conservate nelle strutture pubbliche italiane" (compilati entrambi con chi scrive), distribuiti agli oltre 3.000 iscritti al XX International Congress of Entomology organizzato a Firenze. Durante tale importante manifestazione Conci tenne tra l'altro uno degli interventi ufficiali di apertura, concludendo così il suo impegno alla Presidenza della Società Entomologica Italiana, che era durato, con continue rielezioni, per ben 28 anni di seguito, dopo di che fu nominato Socio Onorario per i suoi meriti. Sempre nel 1996 fu nominato Socio Onorario anche dell'ARDE, l'Associazione Romana di Entomologia.

Continuando ad operare nell'ambito del Museo, proseguì nelle raccolte sia in zona alpina che insulare, in particolare in Sardegna e in Corsica, dove svolse ricerche dal 1999 al 2002 assieme a Claudio Canepari e a chi scrive.

Ma l'età iniziava a farsi sentire, con i malanni connessi.

Tra il 2000 e il 2003 Conci incominciò a decidere il destino delle sue raccolte personali, donando la collezione di Psille al Museo di Milano e quella di

Mallofagi al Museo di Genova. Il motivo di quest'ultima scelta è legato al fatto che tale collezione, una delle pochissime esistenti in Italia, composta da circa un migliaio di vetrini microscopici, era stata allestita da Conci negli anni '40 e '50 del secolo scorso, basandosi in buona parte su materiali raccolti proprio su esemplari di vertebrati del Museo di Genova.

A Genova ha donato pure le miscellanee di argomento museologico e quelle riguardanti i suoi studi sulla storia dell'entomologia, col connesso importantissimo archivio iconografico, mentre altri lotti di pubblicazioni e libri sono stati donati al Museo di Rovereto. A me personalmente consegnò anche i disegni originali che aveva fatto realizzare a sue spese per illustrare il volume della "*Fauna d'Italia*" degli Emitteri Psilloidei, che sfortunatamente non vide completato.

Gli ultimi anni di vita vennero purtroppo trascorsi da Conci in una forzata inattività; il lento declino si concluse infine a Milano il 10 maggio 2011, lasciando un profondo rimpianto in tutti coloro che avevano potuto apprezzare le sue doti di equilibrio, la sua onestà, la sua preparazione scientifica nonché, soprattutto, la sua umanità e la sua sincera amicizia.

ORIGINE, DIFFUSIONE E VALENZA FITOSANITARIA DELLA TIGNOLA DEL POMODORO, *Tuta absoluta* (MEYRICK)

CARMELO RAPISARDA (*) - GAETANO SISCARO (*) - GIOVANNA TROPEA GARZIA (*)
LUCIA ZAPPALÀ (*)

(*) Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali (DiGeSA), Sezione Entomologia applicata, Università degli Studi di Catania, Via Santa Sofia, 100 - 95123 Catania; e-mail: rapicar@unict.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 febbraio 2012.

Origin, diffusion and economic importance of the Tomato leafminer, Tuta absoluta (Meyrick)

In the context of alien species which are invading Europe and the Mediterranean basin with increasingly higher frequency, the Tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), takes on major importance for its harmfulness to the aerial organs of plants, resulting in substantial reductions of the product and leading to significant economic losses. The insect, of South American origin, appeared for the first time in the Mediterranean Region in 2006 and in a period of about five years it has spread very rapidly in all coastal areas of the basin as well as in Europe, in North Africa and the Middle East, probably facilitated by passive transports mainly caused by the trading of infested tomato fruits. Its invasiveness and the speed with which this insect is able to expand its presence in new territories leave now to predict its forthcoming spread to other major tomato-producing countries, with serious economic consequences.

KEY WORDS: South American tomato pinworm, diffusion, phytosanitary importance.

INTRODUZIONE

In un ambiente già ecologicamente stabile, l'introduzione di insetti fitofagi esotici che, inizialmente in assenza di fattori di contenimento, cercano di conquistare un proprio spazio vitale a scapito dell'equilibrio preesistente, produce quasi sempre interferenze di notevole rilievo. Nel tempo si sono verificati casi di simili invasioni e alcuni di essi hanno assunto rilevanza storico-economica. Basti pensare al dilagare in Europa della Fillossera della vite [*Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch)] sul finire dell'Ottocento o della Dorifora della patata (*Leptinotarsa decemlineata* Say) durante la seconda guerra mondiale. Tuttavia, negli ultimi decenni, nonostante la crescente organizzazione dei controlli fitosanitari alle frontiere, le introduzioni accidentali di insetti e vari altri artropodi sono divenute sempre più frequenti, a causa dell'intensificarsi degli scambi commerciali tra i vari paesi e, più in generale, della incrementata capacità di movimento di merci e persone in ogni parte del nostro pianeta. Il riscaldamento globale, inoltre, sta facilitando l'aumento di specie invasive di nuova introduzione, consentendo possibilità di adattamento e sviluppo a insetti fitofagi di origine tropicale o subtropicale per i quali condizioni climatiche più continentali sarebbero state un tempo proibitive.

Con specifico riferimento all'Italia, in una significativa anche se non completa rassegna delle specie di insetti segnalate dal 1970, EÖRDEGH *et al.* (2009) riportano ben 322 entità. Suddividendo tali rinvenimenti per classi di dieci anni, tenendo esclusivamente conto della prima individuazione in Italia e non dell'anno di effettiva pubblicazione della segnalazione, si nota come negli anni '70 siano state intercettate 25 specie, negli anni '80 tale numero è stato di 42 specie, quindi, durante i decenni successivi, sono state riscontrate 177 specie negli anni '90 e 78 specie nel primo decennio del 2000 (non ancora concluso alla data di pubblicazione della rassegna).

Chiaramente, il rilevante numero complessivo di tali segnalazioni è anche la conseguenza dell'intensificazione delle ricerche, strettamente correlato alla crescita numerica degli studiosi di entomologia cui nei decenni scorsi si è assistito in varie istituzioni di ricerca e università italiane, che ha determinato una migliore conoscenza faunistica del nostro territorio, con intercettazione di specie mai prima segnalate anche se probabilmente da tempo presenti. In ogni caso, esso rivela in buona misura anche il progressivo aumento delle nuove introduzioni di specie "aliene" di insetti.

Non a tutte le specie entomologiche introdotte nel nostro paese negli ultimi decenni può attribuirsi l'appellativo di "invasive" e non tutte costituiscono, for-

tunatamente, una seria minaccia per le piante di interesse agrario, forestale e ornamentale. Alcune di esse, tuttavia, assumono particolare rilievo fitosanitario ed economico e la loro diffusione in Italia ha determinato una modificazione spesso profonda nelle strategie applicate per la difesa delle piante e delle colture da esse infestate. Basti ricordare, tra quelli più recenti, i casi delle introduzioni di *Anoplophora* spp. [*chinensis* Förster e *glabripennis* (Motschulsky)] (COLOMBO & LIMONTA, 2001; MASPERO *et al.*, 2007), *Cacysus marshalli* Butler (TREMATERRA *et al.*, 1997), *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte (FURLAN *et al.*, 1998), *Drosophila suzukii* Matsumura (GRASSI *et al.*, 2009), *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (MELIKA *et al.*, 2002), *Paysandisia archon* (Burmeister) (ESPINOSA *et al.*, 2003), *Phyllocnistis citrella* Stainton (ORTU & DELRIO, 1994), *Rhyncophorus ferrugineus* Olivier (SACCHETTI *et al.*, 2005), che hanno generato una grande mole di studi e di ricerche e per molte delle quali l'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia si è interessata in varie occasioni culturali.

Relativamente recente è la comparsa di *Tuta absoluta* (Meyrick) nel panorama entomologico italiano, con sue prime segnalazioni che risalgono al 2008 (TROPEA GARZIA *et al.*, 2009; VIGGIANI *et al.*, 2009) e successiva rapida diffusione, a partire dal 2009, in pressoché tutte le aree di coltivazione del pomodoro, sia per consumo fresco che da industria. La rilevante dannosità di questa specie e la sua forte capacità di adattamento alle condizioni ambientali e colturali del nostro paese hanno determinato la tempestiva sensibilizzazione di numerosi studiosi e l'avvio d'indagini volte sia ad approfondire vari aspetti della sua biologia negli ambienti di nuova colonizzazione, sia a mettere a punto idonee strategie per il contenimento delle sue infestazioni.

ORIGINE E DIFFUSIONE

Tuta absoluta è specie di origine neotropica, e al Sud America la sua diffusione è rimasta limitata fino alla metà dello scorso decennio. Descritta sulla base di un singolo esemplare di sesso maschile rinvenuto sulle Ande peruviane (MEYRICK, 1917), essa è stata successivamente segnalata in numerosi altri paesi sudamericani (Argentina, Bolivia, Brasile, Cile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Uruguay, Venezuela) (DESNEUX *et al.*, 2010), in molti dei quali viene riportata quale fitofago di primario interesse a partire dagli anni '80 (BARRIENTOS *et al.*, 1998).

La prima indicazione della sua presenza al di fuori del continente di origine risale alla fine del 2006,

allorquando *T. absoluta* è stata segnalata in Spagna orientale, nella provincia di Castellón de la Plana (URBANEJA *et al.*, 2007). Da quel momento, la specie ha iniziato una rapida colonizzazione di tutto il bacino del Mediterraneo (Albania, Algeria, Bosnia, Bulgaria, Cipro, Croazia, Egitto, Erzegovina, Francia, Grecia, Israele, Italia, Kosovo, Libia, Malta, Marocco, Montenegro, Portogallo, Romania, Serbia, Spagna, Tunisia), altresì rivelando forte capacità di invasione di pressoché tutto il continente europeo (Danimarca, Germania, Gran Bretagna, Lituania, Paesi Bassi, Russia, Svizzera, Ungheria, con possibile presenza anche in Austria, Belgio, Estonia, Finlandia, Irlanda, Lettonia, Lussemburgo, Polonia, Repubblica Ceca, Slovacchia, Slovenia, Svezia), dell'Africa sub-mediterranea (Sudan) e del Medio Oriente (Arabia Saudita, Bahrain, Giordania, Iraq, Iran, Kuwait, Libano, Siria, Turchia), dove il lepidottero risulta oggi diffuso (BANIAMERI, 2011; BECH, 2011; DESNEUX *et al.*, 2011; TROPEA GARZIA *et al.*, 2012).

Diversi studi sono stati avviati al fine di individuare le possibili vie di colonizzazione seguite dall'insetto. In particolare, analisi comparative fra popolazioni mediterranee e sudamericane condotte da CIFUENTES *et al.* (2011), non soltanto hanno rivelato omogeneità genetica fra popolazioni presenti negli ambienti di nuova diffusione, ma hanno anche dimostrato analoga variabilità genetica nelle popolazioni mediterranee e in quelle del continente ritenuto d'origine, ipotizzando di conseguenza come il recente processo di invasione del bacino del Mediterraneo e delle regioni limitrofe sia verosimilmente avvenuto a partire da un'unica introduzione dal Sud America. Tale ipotesi, tuttavia, è il risultato di uno studio ancora non completo, basato esclusivamente sulla valutazione di pochi marcatori molecolari (ITS1, ITS2, COI); l'estensione di tali ricerche e l'applicazione di ulteriori marcatori genetici (quali soprattutto i microsatelliti) potranno verosimilmente aprire nuove prospettive alle conoscenze su tale aspetto.

Nelle aree di nuova colonizzazione, il gelechide ha rivelato grande capacità di adattamento a diverse condizioni agro-ecologiche, con elevato potenziale riproduttivo e rilevante dannosità economica, così manifestando, tanto quanto già fatto nel corso degli ultimi decenni in Sud America, il suo carattere di specie invasiva.

L'INVASIONE DEL BACINO MEDITERRANEO: CAUSE E DINAMICHE

Per l'interesse fitosanitario assunto in Sud America, le sue caratteristiche biologiche e l'elevato rischio

d'introduzione in Europa e nel bacino del Mediterraneo, da parte dell'European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) *T. absoluta* era stata già nel 2004 annoverata tra gli insetti da quarantena e inserita nella lista A1 (EPPO, 2005), cioè quella relativa agli organismi nocivi a rischio d'introduzione ma non ancora segnalati nei paesi membri dell'EPPO. A ciò, tuttavia, non è seguito l'inserimento ufficiale della specie negli aggiornamenti degli allegati alla Direttiva 2000/29/EC, concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nell'Unione Europea di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali; e questo ha, di conseguenza, impedito la messa in atto di tempestive misure di controllo alle frontiere da parte dei servizi fitosanitari dei diversi paesi, favorendo quindi l'ingresso e la diffusione dell'insetto nella regione mediterranea.

Tuttavia, la rapidità della sua diffusione in Europa e nel bacino del Mediterraneo soltanto in poco più di un quinquennio non può trovare spiegazione solo nella fragilità delle barriere fitosanitarie ma in una serie di cause biotiche e abiotiche che ne hanno consentito l'efficace insediamento. Il lepidottero, infatti, può compiere solo modesti spostamenti attivi, dovuti esclusivamente alla capacità di volo degli adulti, e deve, invece, la gran parte della sua diffusione a spostamenti passivi, operati sia da cause naturali, quali il vento, ma soprattutto antropiche, quali il commercio di frutti di pomodoro infestati. In ogni caso, tale prevalente componente passiva della diffusione di *T. absoluta* non può da sola spiegare lo stabile insediamento verificatosi in Europa anche in aree caratterizzate da valori degli indici eco-climatici di distribuzione lontani dai parametri tipici dell'insetto (DESNEUX *et al.*, 2010). Ciò può lasciare pensare a varie possibili cause del fenomeno, tra le quali, oltre al generico riferimento ai mutamenti climatici in corso, trovano spazio i possibili mutamenti evolutivi nelle caratteristiche biologiche intrinseche della specie, l'assenza negli ambienti di nuova introduzione di nemici naturali co-evoluti con la specie introdotta, o la presenza, negli stessi ambienti, di sistemi intensivi di coltivazione del pomodoro che incrementano le capacità trofiche e riproduttive del nuovo arrivato.

La mancanza di efficaci nemici naturali nelle aree di nuova colonizzazione, congiuntamente alle iniziali difficoltà di applicazione di adeguate misure fitosanitarie, rappresentano senza dubbio cause di primaria importanza nel conferire a *T. absoluta* un carattere di forte competizione alla sua prima comparsa in una determinata regione. Ne è esempio l'attuale dinamica di diffusione dell'insetto nella regione Mediterranea, che ha seguito una direttiva “ovest-

est”, con comparsa iniziale nella Penisola Iberica e successiva progressiva invasione, nell'arco di 2-4 anni, della rimanente parte del bacino, fino al Medio Oriente. Allo stato attuale, *T. absoluta* mostra elevata pressione demografica e ingenti livelli d'infestazione nei paesi del Mediterraneo orientale (di più recente colonizzazione), mentre manifesta già livelli di popolazione più contenuti nel Mediterraneo occidentale, dove vari nemici naturali indigeni hanno instaurato relazioni simbiotiche con il nuovo ospite (URBANEJA *et al.*, 2012; ZAPPALÀ *et al.*, 2012) e dove, soprattutto, sono state messe a punto iniziali idonee strategie di contenimento delle sue popolazioni.

INTERESSE FITOSANITARIO

L'attacco di *T. absoluta* agli organi epigei (foglie, steli, frutti) delle piante infestate si traduce in rilevanti riduzioni delle rese in prodotto commerciabile, in qualsiasi tipologia di coltivazione del pomodoro (sia in pieno campo che in serra) e per qualsiasi destinazione d'impiego (vivaistico, consumo diretto o trasformazione). A tale dannosità diretta deve essere aggiunta anche quella, non meno importante, derivante dall'incremento dei costi per la difesa fitosanitaria che si è prontamente registrato nelle aree mediterranee invase dal fitofago. Con riferimento a tale aspetto, è assai importante ricordare anche l'impatto negativo che l'infestazione del gelechide presenta sulla possibilità di applicare strategie produttive basate sull'adozione di consolidati metodi biologici e integrati di controllo dei fitofagi del pomodoro, che, in presenza del nuovo insetto, vengono spesso accantonati a vantaggio della lotta chimica, con gravi ripercussioni di ordine tecnico (comparsa di popolazioni resistenti agli insetticidi) e ambientale ma anche con sensibili riduzioni di pregio commerciale delle produzioni.

A livello globale, il problema deve essere, ovviamente, esaminato in maniera prospettica, considerando che le più elevate produzioni di pomodoro vengono proprio realizzate in aree geografiche (Cina, Stati Uniti d'America, India) non ancora interessate dalla presenza di *T. absoluta* ma che potrebbero essere invase in tempi relativamente brevi. Risulta, quindi, estremamente allarmante l'ipotesi formulata da DESNEUX *et al.* (2011) che, attraverso l'ulteriore diffusione del gelechide anche in tali paesi, la superficie mondiale coltivata a pomodoro e colpita dalla dannosa presenza del fitofago possa passare dagli attuali 0,95 milioni di ettari (21,5% della superficie mondiale coltivata a pomodoro e che include anche l'ampliamento geonemico di *T. absoluta* verificatosi nel quinquennio 2006-2011) a

3,73 milioni di ettari (84,9% della superficie mondiale coltivata a pomodoro, che conseguirebbe all'ulteriore invasione potenziale di 2,78 milioni di ettari). In termini economici, secondo gli stessi autori, ciò si tradurrebbe in un incremento globale di prodotto "infestato" dagli attuali 41 milioni di tonnellate (27,2% della produzione mondiale di pomodoro) a 133,7 milioni di tonnellate (87,4% della produzione mondiale).

Da quanto riportato, traspare chiaramente l'importanza fitosanitaria di questo fitofago e l'interesse che ad esso viene rivolto da parte della comunità scientifica internazionale, che si riflette, oltre che nel varo di specifici progetti di ricerca finanziati a vario livello sia nazionale che internazionale, anche nell'organizzazione di svariati incontri di studio; in tale contesto, oltre a consentire la raccolta e il raffronto reciproco dei risultati sperimentali che, su numerosi aspetti riguardanti il lepidottero, vengono ottenuti in diverse realtà geografiche e produttive, si persegue l'obiettivo di creare o consolidare le opportune e necessarie sinergie tra gruppi di ricerca che a vario livello operano sull'argomento, nell'intento di pervenire a una migliore conoscenza delle caratteristiche biologiche di *T. absoluta* e alla possibilità di un controllo sostenibile della sua diffusione e delle sue infestazioni.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato con il supporto finanziario del progetto PRIN "Biologia e controllo integrato di *Tuta absoluta* (Meyrick) in Italia".

RIASSUNTO

Nel contesto delle specie esotiche che, con frequenza sempre più elevata, stanno invadendo l'Europa e il bacino del Mediterraneo, la Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick), assume importanza di rilievo per la sua notevole dannosità a carico di tutti gli organi epigei delle piante, che determina ingenti decurtazioni di prodotto e conseguenti ingenti perdite economiche. L'insetto, di origine sud-americana, è apparso per la prima volta nella Regione Mediterranea nel 2006 e nell'arco di circa un quinquennio si è diffuso con estrema rapidità in tutte le aree costiere di tale bacino nonché in Europa, in Africa settentrionale e in Medio Oriente, in ciò probabilmente facilitato dagli involontari scambi commerciali di frutti di pomodoro infestati. La sua invasività e la rapidità con cui riesce in breve tempo a espandere la sua presenza in nuovi territori lasciano, adesso, prevedere una sua prossima diffusione verso altri importanti paesi produttori di pomodoro, con gravi ripercussioni per l'economia mondiale.

BIBLIOGRAFIA

- BANIAMERI V., 2011 – *First report of Tuta absoluta in Iran and initial control strategies*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta*, Agadir (Marocco), 16-18/11/2011: 21.
- BARRIENTOS Z.R., APABLAZA H.J., NORERO S.A., ESTAY P.P., 1998 – *Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate*, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). - Ciencia e Investigación Agraria, 25: 133-137.
- BECH R.A., 2011 – *Federal import quarantine order for host materials of tomato leafminer*, *Tuta absoluta* (Meyrick). - Plant Protection and Quarantine, USDA-APHIS.
- CIFUENTES D., CHYNOWETH R., BIELZA P., 2011 – *Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. - Pest Manag. Sci., 67: 1155-1166.
- COLOMBO M., LIMONTA L., 2001 – *Anoplophora malasiaca Thomson* (Coleoptera Cerambycidae Lamiinae Lamiini) in Europe. - Boll.Zool.agr.Bachic., 33 (1): 65-68.
- DESNEUX N., LUNA M.G., GUILLEMAUD T., URBANEJA A., 2011 – *The invasive South American tomato pinworm, Tuta absoluta, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production*. - J. Pest Sci., 84: 403-408.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUYS K.A.G., BURGIO G., ARPAIA S., NARVÁEZ-VÁSQUEZ C.A., GONZÁLEZ-CABRERA J., RUESCAS D.C., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control*. - J. Pest Sci., 83: 197-215.
- EÖRDEGH F.R., VALENTINI M., JUCKER C., 2009 – *Anagrafe delle specie segnalate dal 1970 [323-404]*. - In: Jucker C., Barbagallo S., Roversi P.F., Colombo M. (Eds.), *Insetti esotici e tutela ambientale – Morfologia, biologia, controllo e gestione*, Arti Grafiche Maspero Fontana, Cernentate (CO): 416 pp.
- EPPO, 2005 – *Data sheets on quarantine pests: Tuta absoluta*. - OEPP/EPPO Bull., 35: 434-435.
- ESPINOSA B., DI MUCCIO P., RUSSO G., 2003 – *Paysandisia archon, una minaccia per le nostre palme*. - L'Informatore Agrario, 59 (7): 61.
- FURLAN L., VETTORAZZO M., ORTEZ A., FRAUSIN C., 1998 – *Diabrotica virgifera virgifera è già arrivata in Italia*. - Inf.tore fitopatol., 48 (12): 43-44.
- GRASSI A., PALMIERI L., GIONGO L., 2009 – *Nuovo fitofago per i piccoli frutti in Trentino*. - Terra Trentina, 55 (10): 19-23.
- MASPERO M., JUCKER C., COLOMBO M., 2007 – *First record of Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Coleoptera Cerambycidae Lamiinae Lamiini) in Italy. - Boll.Zool.agr.Bachic., 39 (2): 161-164.
- MELIKA G., BRUSSINO G., BOSIO G., CSOKA G., 2002 – *Chestnut gall wasp* (Dryocosmus kuriphilus Yasumatzu), *a new pest of chestnut in Europe*. - Novenyvedelem, 39 (2): 59-63.
- MEYRICK E., 1917 – *Descriptions of South American Micro-Lepidoptera*. - Trans. R. entom. Soc. London, 65 (1): 1-52.
- ORTU S., DELRIO G., 1994 – *La minatrice serpentina degli agrumi in Italia: Phyllocnistis citrella Stainton* (Lep.: Gracillariidae: Phyllocnistinae). - Inf.tore fitopatol., 45 (3): 38-41.

- SACCHETTI P., CAMERA A., GRANCHIETTI A., ROSI M.C., MARZIALETTI P., 2005 – *Prima segnalazione in Italia del curculionide delle palme, Rhynchophorus ferrugineus*. - <http://www.cespevi.it/art/rhynco.htm>.
- TREMATERRA P., ZILLI A., VALENTINI V., MAZZEI P., 1997 – *Cacyreus marshalli, un lepidottero sudafricano dannoso ai gerani in Italia*. - *Inf.tore fitopatol.*, 47 (7-8): 2-6.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., COLOMBO A., CAMPO G., 2009 - *Rinvenuta in Sicilia Tuta absoluta*. - *L'Informatore Agrario*, 65 (4): 71.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., BIONDI A., ZAPPALÀ L., 2012 – *Tuta absoluta, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage*. - *EPPO Bulletin*, 42 (2): 205-210.
- URBANEJA A., GONZÁLEZ-CABRERA J., ARNÓ J., GABARRA R., 2012 – *Prospects for the biological control of Tuta absoluta in tomatoes of the Mediterranean basin*. - *Pest Manag. Sci.*, 68: 1215-1222.
- URBANEJA A., VERCHER R., NAVARRO V., GARCÍA MARÍ F., PORCUNA J.L., 2007 – *La polilla del tomate, Tuta absoluta*. - *Phytoma España*, 194: 16-23.
- VIGGIANI G., FILELLA F., DELRIO G., RAMASSINI W., FOXI C., 2009 – *Tuta absoluta, nuovo lepidottero segnalato anche in Italia*. - *L'Informatore Agrario*, 65 (2): 66-68.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P.A., RAPISARDA C., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012 – *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta (Meyrick) in Southern Italy*. - *Bull. Insectol.*, 65: 51-61.

INQUADRAMENTO SISTEMATICO E ASPETTI MORFO-BIOLOGICI DI *TUTA ABSOLUTA* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA, GELECHIIDAE)

LUIGI SANNINO (*)

(*) *Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - CAT, Unità di ricerca per le colture alternative al tabacco, via P. Vitiello 108, 84018 Scafati (SA), luigi.sannino@entecra.it*
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 febbraio 2012.

Notes on taxonomy, morphology and biology of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae)

Tuta absoluta was described for the first time in 1917 as *Phthorimaea*; afterwards, in 1962, it was included in *Gnorimoschema* and then in *Scrobipalpula* and, since 1993, in *Tuta*. The adult is 5-6 mm long with wingspan from 10-13 mm. Grey with beige shades, it has fringed wings with a series of dark stripes arranged like rays in the apical half of the forewings. The egg, 0.35-0.38 mm long and 0.22-0.25 mm wide, is bright white or barely yellowish when laid, tending to brown as it matures. The larva is up to 7-8 mm long; its body ground color is yellowish or greenish and a variable intensity of pink is often present on the back; the head is yellowish, while the prothoracic shield is light with the only latero-posterior edge brown or blackish. The pupa is 3.8-4.5 mm long and 1.3-1.5 mm wide, with the cremaster consisting of a very short, stocky spine arranged in the apico-dorsal position and in a series of 10-11 pairs of rigid and hooked bristles located both on the dorsal and the ventral side. The number of eggs laid per female varies from a few tens to a few hundreds. The incubation period is completed in 5-6 days from April to October and in 8-10 days during the rest of the year. The duration of the larval stage, which normally includes four instars, ranges on average from 13 to 37 days. Pupation, which takes place in the soil or on the plant, varies between 8-12 days in the generations through the year and about 65 days in the hibernation period. In Scafati (province of Salerno, South Italy), where the insect showed a number of yearly generations ranging from 6 to 9, the total length of life cycle varied from 40 days, in the 1st and 8th generations, to 28 days, in the 6th generation, until 60 days in the latest one. Adult moth activity is almost continuous throughout the year, peaking from August to October and sharply decreasing in November-December. A nonlinear relationship was found between adult catches by trap and the temperature: catches increase when the average daily temperature rises to 23-26 °C, then they show a steady trend or decrease in the hottest period.

KEY WORDS: *Tuta absoluta*, morphology of various stages, life cycle, adult monitoring.

INTRODUZIONE

La tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera Gelechiidae), è stata causa di ingenti danni alle colture sin dalla sua prima comparsa in Europa (URBANEJA *et al.*, 2007; GUENAOUI, 2008; ARNÓ *et al.*, 2009; GERMAIN *et al.*, 2009; POTTING, 2009; SANNINO & ESPINOSA, 2009; TROPEA GARZIA *et al.*, 2009; VIGGIANI *et al.*, 2009). In Italia si è diffusa a partire dal 2008 in tutte le principali aree di coltivazione, ma è soprattutto nel Meridione, e in particolare lungo le fasce costiere, che ha trovato il suo habitat preferito, grazie al clima mite e all'abbondanza delle colture protette. Qui, anche a causa dell'iniziale scarsa conoscenza del fitofago, le infestazioni sono state particolarmente intense ed estese nel biennio 2008-2009, provocando perdite stimate fino al 60-70% del prodotto potenziale. Con i suoi attacchi in campo e in serra, dal trapianto fino alla raccolta, la nuova tignola ha ridotto significativamente la resa produttiva delle colture, sia compromettendo lo sviluppo vegetativo della pianta minando le foglie, sia danneggiando direttamente i frutti.

Nel triennio 2010-2012, nonostante una generale riduzione dei danni (grazie all'impiego di reti protettive per le colture in serra e alle applicazioni preventive di insetticidi) la presenza dell'insetto è stata comunque consistente nei periodi più caldi dell'anno e ha richiesto ripetuti interventi di lotta per contenere le popolazioni a bassi livelli.

In questi anni numerose ricerche sono state condotte in vari paesi per migliorare le conoscenze sul gelechide (MIRANDA *et al.*, 1998; GIUSTOLIN *et al.*, 2001; CABELLO, 2009; BELDA *et al.*, 2010; BIELZA, 2010; CALVO *et al.*, 2010; DESNEUX *et al.*, 2010; GABARRA & ARNÓ, 2010; GARCIA & VERCHER, 2010; GUENAOUI *et al.*, 2010; MARTÍ MARTÍ *et al.*, 2010). In Italia, oltre all'ampia sperimentazione per individuare metodi e mezzi di lotta efficaci (FINOCCHIARO & SBRISCA FIORETTI, 2010; BIONDI *et al.*, 2011; COCCO *et al.*, 2011; SANNINO *et al.*, 2012a, 2012b, 2012c), sono stati realizzati studi per definire il profilo bio-etologico dell'insetto nelle regioni meridionali (ESPINOSA & SANNINO, 2009a, 2009b; CAPONERO, 2010; SANNINO & ESPINOSA, 2010a; TROPEA GARZIA *et al.*, 2011) e in Sardegna (FOIS *et al.*, 2011). Di seguito, oltre a notizie generali sull'in-

setto, si riassumono i risultati di osservazioni biologiche svolte nell'area costiera salernitana.

INQUADRAMENTO SISTEMATICO

Con quasi 5.000 specie descritte i Gelechiidae sono indubbiamente una delle famiglie più numerose dell'ordine Lepidoptera e, al tempo stesso, una delle meno studiate, sia per le piccole dimensioni, sia per l'uniformità di aspetto dei suoi rappresentanti: si stima che gli esemplari tuttora giacenti presso gli specialisti e non ancora determinati ammonterebbero a svariate migliaia. La maggior parte dei Gelechidi è propria dell'Asia e delle Americhe mentre solo una minoranza (ca 700 specie) è presente in Europa. La fauna italiana, con ca 360 entità accertate, è comunque la più ricca del continente (BALDIZZONE *et al.*, 1995).

Tra le diverse sottofamiglie in cui vengono suddivisi i Gelechiidae (cfr. anche BLAND *et al.*, 2002), due spiccano per consistenza numerica e importanza economica, Gelechiinae e Chelariinae; in particolare all'interno della prima è compresa la tribù degli Gnorimoschemini, che raggruppa le specie dannose alle colture ortive. Una vasta e completa revisione degli Gnorimoschemini europei è stata recentemente pubblicata da HUEMER & KARSHOLT (2010).

Il regime dietetico delle larve di Gelechidi è molto vario: la maggioranza di esse vive su piante verdi, alimentandosi dei vari organi (foglie, steli, radici, frutti e semi), ma alcune sono tipiche dei vegetali secchi immagazzinati, come ad esempio la cosmopolita *Sitotroga cerealella* (Olivier), vera tignola del grano, che attacca i cereali più svariati e in particolare le cariossidi di grano, mais e orzo, svuotandole. Le specie nocive alle coltivazioni sono relativamente poche (30-35), ma molto pericolose (SANNINO & ESPINOSA, 2010b); tra queste *Phthorimaea operculella* (Zeller) (tignola della patata), *Anarsia lineatella* Zeller (tignola del pesco), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (bruco rosa del cotone) e *Scrobipalpa ocellatella* (Boyd) (tignola della bietola) rivestono grande interesse agrario nelle aree temperate e calde della terra. Alla lista delle specie europee ultimamente si è aggiunta anche *Tuta absoluta*, tignola originaria del Sud America, la cui presenza in Europa è stata rilevata inizialmente in Spagna nel 2006. Descritta per la prima volta nel 1917 dall'entomologo inglese E. Meyrick, questa specie fu inclusa prima nel genere *Phthorimaea* e poi, nel 1962, da Clarke, in *Gnorimoschema* (CLARKE, 1962); due anni dopo lo specialista cecoslovacco Povolný istituiva, nell'ambito della sottofamiglia Gelechiinae, la tribù degli Gnorimoschemini, ascrivendo la predetta specie al

genere *Scrobipalpa* e successivamente a *Scrobipalpoides*. È solo nel 1993 che lo stesso autore recupera il vecchio genere *Tuta* (istituito da Strand nel 1911) e vi include, tra le altre specie, anche *absoluta* (POVOLNÝ, 1967a, 1967b, 1975, 1993, 1994).

NOTIZIE MORFOLOGICHE

Adulto - Grigio con sfumature beige, è caratterizzato, come è abbastanza tipico nei Gelechidi, da ali lungamente frangiate: quelle anteriori sono strette e lanceolate, mentre le posteriori, vagamente subtrapezoidali, presentano l'angolo apicale prominente e digitiforme. Nell'area apicale dell'ala anteriore si osservano, negli individui freschi, una serie di strie scure disposte a raggiera su fondo giallo-ocraceo, strie dovute a squame grigie inserite lungo i rami terminali delle nervature alari; nella metà basale vi è un numero variabile di macule scure, più o meno sfumate e distinte. Come nella gran parte dei Gelechidi, i palpi labiali sono composti da tre articoli, col penultimo rivestito da squame grosse e spesso irte, e l'ultimo affusolato e ricurvo verso l'alto, giungente all'altezza del margine superiore degli occhi. I palpi mascellari, di quattro segmenti, sono ridottissimi. Le antenne sono semplici ed hanno anellature bianche e nere alternate, ben nette. Tibie e tarsi sono superiormente nerastri con sottili anellature bianche. Gli organi genitali maschili presentano valve di aspetto claviforme appena ricurve, setolose nella parte superiore, con un grosso dente sul lato interno a metà della loro lunghezza. I due sessi possono distinguersi esteriormente, oltre che per la diversa conformazione dei frenuli (composti da un'unica grossa setola nei maschi e da un fascetto di tre setole sottili nelle femmine), per il diverso rivestimento del lato inferiore dell'addome, che si presenta nei maschi bianco sporco con diffuse squamule grigie sui lati, nelle femmine bianco candido con quattro serie sublaterali ben nette di linee oblique nere (SANNINO & ESPINOSA, 2010b). L'adulto, che ad ali chiuse si presenta di aspetto bastoncellare, è lungo 5-6 mm e ha un'apertura alare di 10-13 mm.

Uovo - Ellittico-subcilindrico, con le estremità polari alquanto smussate. Lungo 0,35-0,38 mm e largo 0,22-0,25 mm è di colore bianco brillante o appena giallognolo alla deposizione per tendere al brunastro verso la maturità. Il corion evidenzia a forte ingrandimento una microscultura a maglie reticolari.

Larva - Di dimensioni non superiori ai 7-8 mm, la larva di *T. absoluta* presenta colore di fondo gialliccio o verdognolo per quasi tutto lo sviluppo,

evidenziando verso la maturità una sfumatura dorsale di tonalità rosata più o meno intensa (solitamente frammentata in macule o in bande trasversali). Il capo, almeno a partire dalla 3^a età, si presenta giallo, annerito sui lati e posteriormente. La placca protoracica, assai caratteristica, è chiara con il solo bordo latero-posteriore castano o nericcio. La placca sopranale è incospicua e pressoché concolore col fondo.

Sullo sclerite prespiracolare (ai lati del protorace), di forma subtriangolare, sono impiantate tre setole laterali (*L1*, *L2*, *L3*). Gli uncini delle pseudozampe ventrali (sul III, IV, V e VI urite) sono disposti in serie circolare, con elementi (15-20) di grandezza variabile; a partire dalla 2^a età, le corone di uncini tendono ad aprirsi sul lato esterno, tanto che nelle larve di sviluppo avanzato risultano aperte per almeno ¼ della circonferenza. Gli uncini delle pseudozampe anali (sul X e ultimo segmento), sono invece disposti in serie arcuata, in numero di 10-12.

Crisalide - Affusolata, lunga 3,8-4,5 mm e larga 1,3-1,5 mm; verdognola appena formata ma subito tendente al nocciola sempre più intenso, poi castana a maturità. Il cremaster, dispositivo atto a facilitare l'aggancio al substrato (soprattutto nella fase dello sfarfallamento), è osservabile sul X segmento addominale; è costituito da una brevissima e tozza spinetta disposta in posizione apico-dorsale e da una serie di 10-11 coppie di setole rigide e uncinatate situate sia sul lato dorsale, in prossimità della spinetta (4 coppie), che sul lato ventrale, ai lati dell'incisione anale (6-7 coppie).

COMPORTAMENTO BIO-ECOLOGICO

T. absoluta è specie essenzialmente legata alle solanacee, in primo luogo al pomodoro e solo saltuariamente a melanzana, patata, peperone e alchechengi (*Physalis peruviana*). Sono stati segnalati, comunque, occasionali attacchi anche a piante di altre famiglie botaniche, tra le quali fagiolo e cavolo (SPERANZA, 2009).

Come molti altri gelechidi, l'adulto di *T. absoluta* ha abitudini crepuscolari e notturne, restando di giorno nascosto tra la vegetazione o al suolo, con le ali disposte aderenti al corpo e le antenne poggiate sopra; se disturbato spicca brevi voli, zigzaganti e bassi. La temperatura e l'alimentazione influiscono notevolmente sulla longevità dell'adulto, che vive fino a sei settimane a 15 °C e solo pochi giorni (4-5) a 35 °C.

Gli adulti di *T. absoluta* sono in grado di riprodursi già dopo 24 ore dallo sfarfallamento. La

fecondità della femmina si aggira mediamente intorno a 100-150 uova, con un minimo di 40 e un massimo di 260 circa. Il periodo di ovideposizione può prolungarsi per una settimana, con un picco tra il terzo e il quinto giorno.

Le uova sono deposte sulle parti epigee della pianta, isolatamente o in gruppi disordinati di 2-5 elementi. Sulle piante piccole vengono preferiti i palchi apicali, mentre sui frutti le ovideposizioni hanno luogo preferibilmente su quelli ancora verdi e in particolare sul calice.

La durata dello sviluppo embrionale oscilla da un minimo di 4-5 giorni a 30 °C a un massimo di 10-11 giorni a 15 °C. Il limite termico inferiore è di 12 °C, quello superiore è di 35 °C, ma un tasso di mortalità elevato si verifica in corrispondenza dei valori estremi (BENTANCOURT *et al.*, 1996). IMENES *et al.* (1990) registrarono per il completamento dello stadio di uovo una durata di 5-6 giorni. A Scafati (prov. Salerno), dove abbiamo allevato l'insetto all'aperto su piante di pomodoro nel biennio 2009-2010, l'incubazione si è completata in 5-6 giorni nel periodo da aprile a ottobre e in 8-10 giorni nella rimanente parte dell'anno (Tabella 1).

La larva neonata, prima di iniziare lo scavo di una mina, esplora il substrato per diversi minuti (fino a ca 30) per trovare il punto idoneo alla penetrazione. Sulle foglie pratica un foro di 0,15-0,20 mm di diametro e, nutrendosi del solo parenchima, scava una mina lineare e sottilissima, che in seguito si slarga diventando di aspetto vescicoloso. Le gallerie prodotte sui frutti, di calibro non superiore a 1-1,5 mm, raramente penetrano oltre il centimetro e mezzo di profondità. I fori d'ingresso, se disposti intorno al calice, sono inizialmente poco evidenti, perché coperti dai sepal, ma diventano in pochi giorni manifesti in quanto l'area interessata invaia precocemente, evidenziando anche un accumulo di escrementi. Gli attacchi alle foglie risultano economicamente dannosi solo in presenza di un elevato numero di larve. Le rosure sulle bacche sono più gravi, perché portano quasi sempre allo scarto del prodotto. Il danno è quantificabile calcolando non solo la percentuale di frutti colpiti alla raccolta, ma anche quelli caduti a terra a causa dell'indebolimento dovuto alla presenza della tignola. In conseguenza dell'attacco foglie, frutti e apici vegetativi sono facilmente colpiti da muffe e marciumi.

Durante l'accrescimento le larve possono abbandonare la prima mina (per sovraffollamento o presenza di marciumi) e vagare per un certo tempo sulla pianta alla ricerca di nuovi siti ove completare lo sviluppo. La fase larvale, che comprende normalmente quattro età, ha una durata, variabile soprattutto in rapporto alla temperatura

Tabella 1 – Durata (giorni) degli stadi di *T. absoluta* osservati a Scafati (SA) nel 2009-2010, in pien'aria su pomodoro.

Stadio	I generazione		II generazione		III generazione		IV generazione	
	N	Media $\pm$ e.s.	N	Media $\pm$ e.s.	N	Media $\pm$ e.s.	N	Media $\pm$ e.s.
Uovo	22	8,3 $\pm$ 0,34	20	6,4 $\pm$ 0,24	18	5,3 $\pm$ 0,13	19	5,1 $\pm$ 0,13
Larva	21	18,5 $\pm$ 0,53	21	17,5 $\pm$ 0,46	19	16,4 $\pm$ 0,40	18	15,1 $\pm$ 0,24
Crisalide	21	12,3 $\pm$ 0,34	19	9,4 $\pm$ 0,26	18	8,9 $\pm$ 0,21	19	8,3 $\pm$ 0,17
	V generazione		VI generazione		VII generazione		VIII generazione	
	N	Media $\pm$ e.s.	N	Media $\pm$ e.s.	N	Media $\pm$ e.s.	N	Media $\pm$ e.s.
Uovo	20	5,0 $\pm$ 0,14	20	4,7 $\pm$ 0,10	18	5,4 $\pm$ 0,14	17	6,2 $\pm$ 0,15
Larva	19	14,3 $\pm$ 0,24	16	13,1 $\pm$ 0,17	18	16,1 $\pm$ 0,23	18	20,5 $\pm$ 0,34
Crisalide	17	8,0 $\pm$ 0,17	17	7,9 $\pm$ 0,14	18	11,1 $\pm$ 0,26	19	13,0 $\pm$ 0,19
	IX generazione. Individui sfarfallati nell'anno				IX generazione. Individui svernanti			
	N	Media $\pm$ e.s.			N	Media $\pm$ e.s.		
Uovo	20	8,4 $\pm$ 0,24			17	10,1 $\pm$ 0,29		
Larva	15	32,4 $\pm$ 0,75			15	36,9 $\pm$ 0,66		
Crisalide	13	17,9 $\pm$ 0,41			20	65,1 $\pm$ 1,16		
N = Numero osservazioni								

e alla qualità del cibo, oscillante in media da 13 a 37 giorni, con una soglia termica inferiore di sviluppo intorno a 6 °C (Tabella 1). L'elevata densità di popolazione, rallentando la crescita della larva, può allungare di alcuni giorni la durata di questo stadio.

L'incrisalidamento ha luogo al suolo, in un bozzolo sericeo ricoperto esternamente di particelle terrose; meno frequentemente la larva incrisalida sulla pianta stessa, nella zona del calice o all'interno di una mina. La durata della ninfa rilevata a Scafati è variata da un minimo di 8-12 giorni, nelle generazioni che si susseguono durante l'anno, a un massimo di due mesi, nella generazione svernante. IMENES *et al.* (1990), per il completamento di questo stadio, ottennero in laboratorio valori compresi tra 9 e 10 giorni.

Come altre specie della stessa famiglia, *T. absoluta* non presenta diapausa e le condizioni ambientali influiscono notevolmente sulla sua biologia. Le basse temperature allungano sensibilmente i tempi di sviluppo e riducono il numero di cicli annui. In Sud America sono segnalate fino a una dozzina di generazioni l'anno. Lungo il litorale salernitano ne sono state riscontrate da sei a nove che, a parte la prima, risultano ampiamente sovrapposte (SANNINO & ESPINOSA, 2010c). In questo ambiente è stata trovata una relazione inversa tra la lunghezza del ciclo e il termoperiodo nel corso dell'anno: la durata totale e quella delle tre fasi di uovo, larva e crisalide è diminuita con l'aumento della temperatura media del periodo corrispondente a un tasso

decescente all'innalzamento della temperatura, con riduzioni più marcate tra le generazioni estreme della stagione più fredda e più attenuate tra quelle intermedie della stagione calda (Figura 1). La durata totale del ciclo è variata dai circa 40 giorni della I e VIII generazione ai 28 giorni della VI generazione, fino a 60 gg per la generazione più tradiva (IX) e a 110 gg per quella svernante. GUENAOUI *et al.* (2010) riportano minimi e massimi di durata del ciclo di 29,5 giorni e 18 giorni per temperature medie di 22 e 31 °C, rispettivamente. BARRIENTOS *et al.* (1998) trovarono, invece, per il completamento del ciclo di sviluppo, una durata media di 76 giorni a 14 °C, 49 giorni a 20 °C e 24 giorni a 27 °C.

INDAGINI SULLA DINAMICA DI VOLO

La presenza degli adulti di *T. absoluta* è stata rilevata mediante catture con trappole a feromone installate in otto aziende produttrici di pomodoro ubicate in quattro comuni rappresentativi della piana del Sele (Battipaglia, Capaccio, Eboli, Pontecagnano), in provincia di Salerno, negli anni 2010-2012. L'insetto ha mostrato un'attività di volo pressoché continua nel corso dell'anno, con incrementi notevoli delle presenze nei mesi da agosto ad ottobre e con una drastica riduzione dei voli in novembre-dicembre (figure 2 e 3). In particolare, dalle osservazioni condotte nell'ultimo biennio è emerso quanto segue:

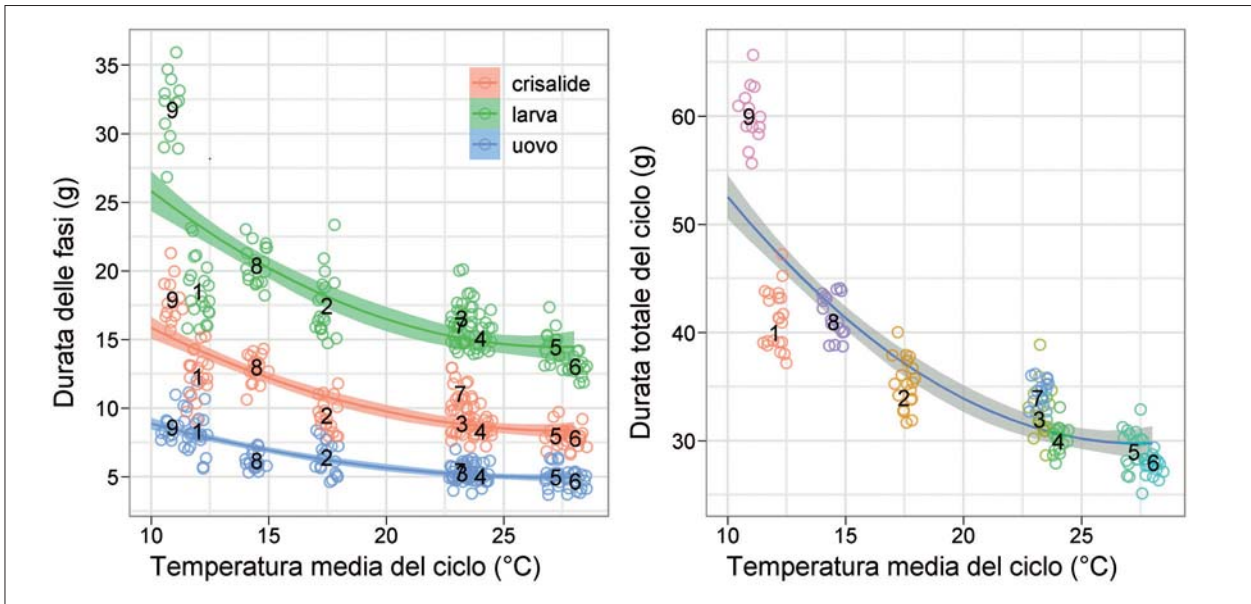


Figura 1

Durata delle fasi di sviluppo e del ciclo totale di *Tuta absoluta* in funzione della temperatura e della generazione. I numeri all'interno del grafico indicano le generazioni consecutive rilevate nel corso di un anno solare (2009). Valori osservati (simboli) e interpolazione media con banda di confidenza al 95%.

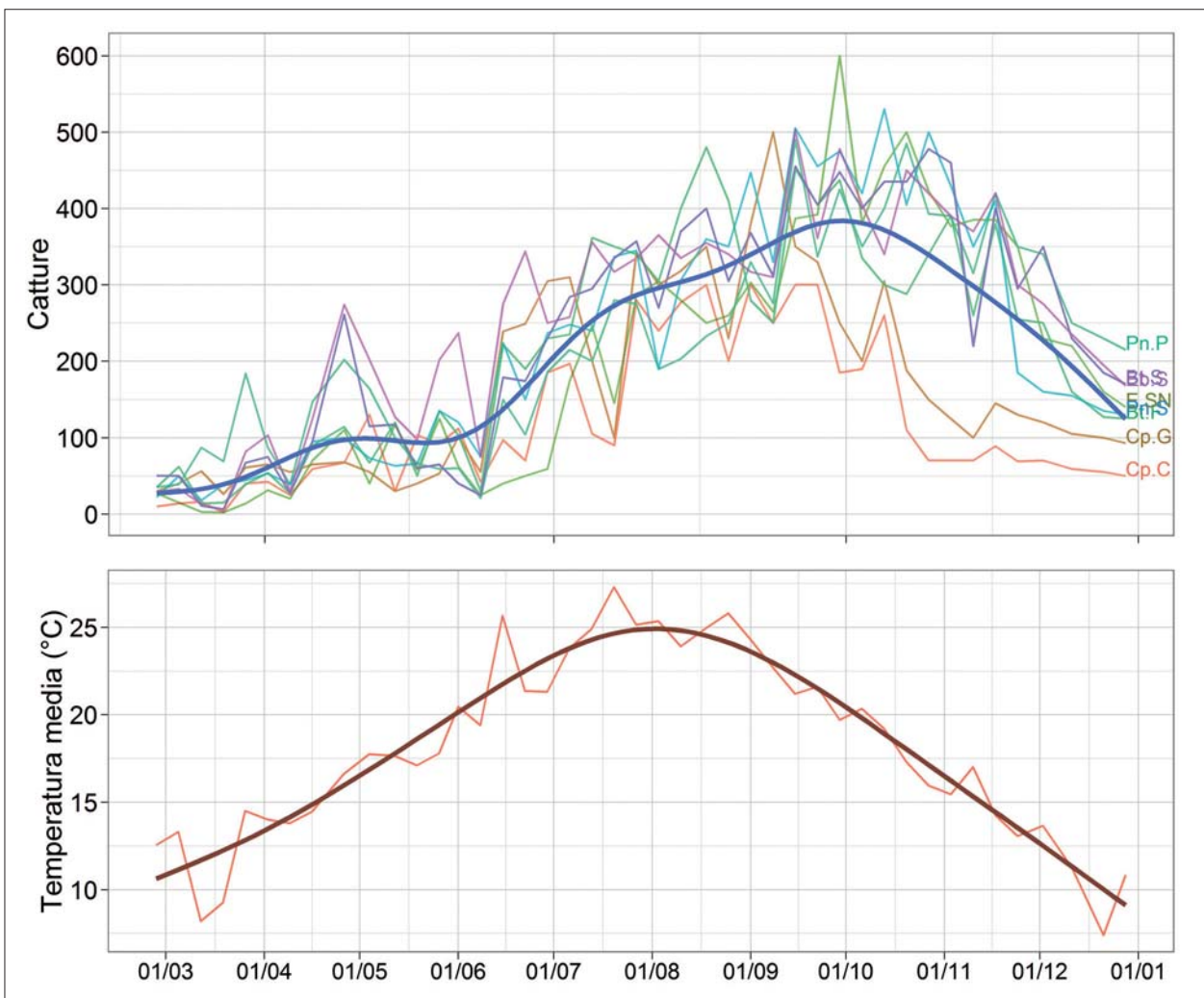


Figura 2

Profilo delle catture di adulti di *Tuta absoluta* in otto stazioni della piana del Sele (prov. Salerno) da fine febbraio a fine dicembre 2010, con interpolazione (linea blu) e profilo termico.

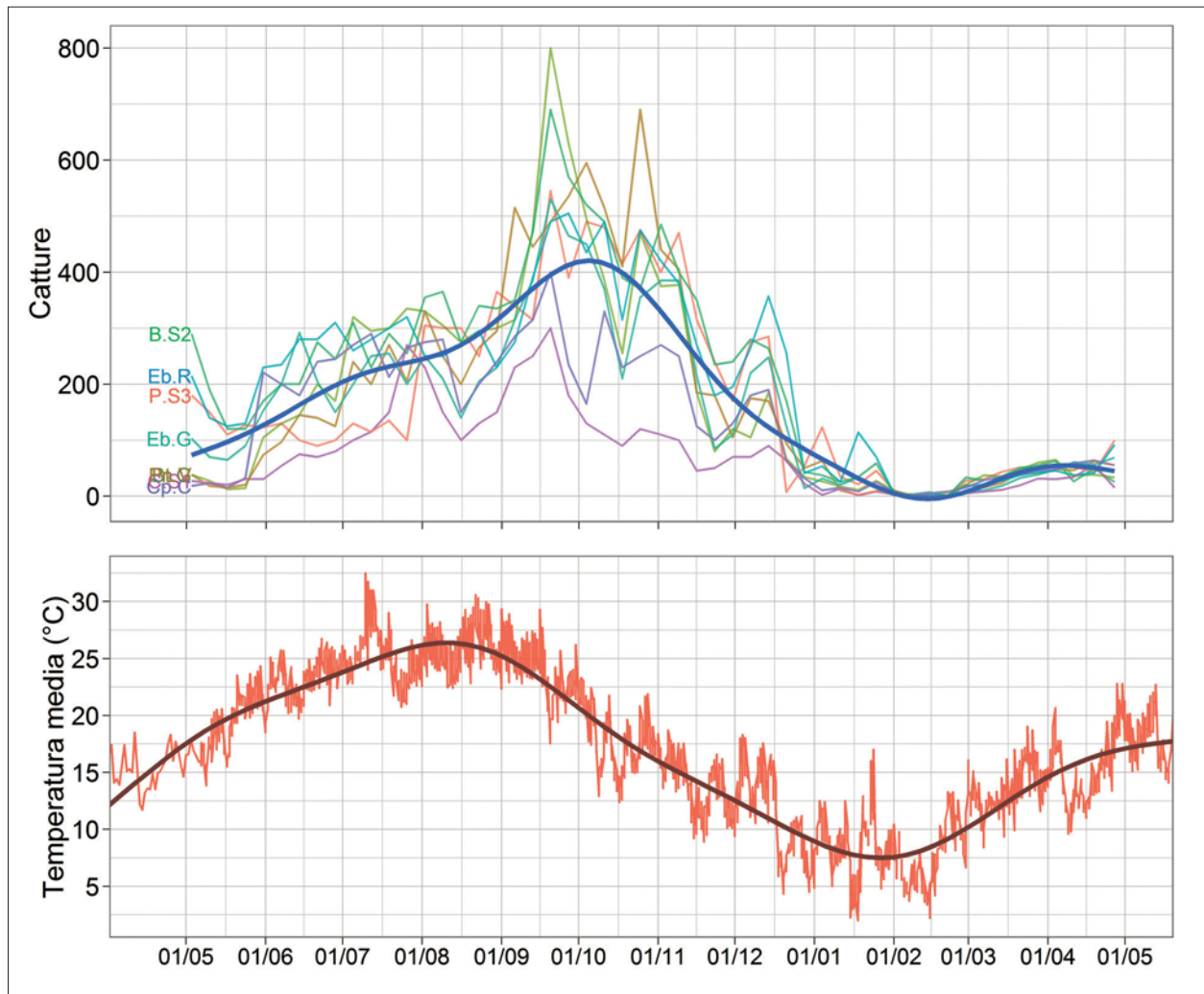


Figura 3

Profilo delle catture di adulti di *Tuta absoluta* in otto stazioni della piana del Sele (prov. Salerno) da maggio 2011 a maggio 2012, con interpolazione (linea blu) e profilo termico.

- gli adulti sono comparsi in gennaio e nel mese di febbraio si è avuta una netta flessione delle catture;
- i voli sono ripresi nella prima quindicina di marzo (in media 20-40 adulti trappola/settimana), sono aumentati progressivamente fino a giugno (160-180 adulti trappola/settimana), raggiungendo la massima frequenza a cavallo fra luglio e agosto (220-260 adulti trappola/settimana);
- dopo una leggera flessione registrata nella seconda metà di agosto, la curva di cattura ha mostrato una vera e propria impennata in settembre (in media ca 400 adulti trappola/settimana), seguita da bruschi declini alternati a nuovi incrementi fino a metà dicembre, prima di scendere a livelli trascurabili nella rimanente parte dell'anno;
- da agosto a ottobre è stato raccolto oltre il 50% del totale degli adulti catturati e in settembre si

sono avuti i valori più alti, corrispondenti al 21% e al 19% delle catture globali, rispettivamente nel 2010 e nel 2011-12.

Nelle figure 4 e 5 le catture settimanali sono messe in relazione con le temperature medie delle settimane corrispondenti. Il culmine della presenza degli adulti di *T. absoluta* in settembre-ottobre indica una relazione non lineare con la temperatura: le catture aumentano con l'innalzamento della temperatura media giornaliera fino a 23-26 °C, ma mostrano poi un andamento stazionario o si riducono nel periodo più caldo.

RIASSUNTO

Tuta absoluta è stata descritta per la prima volta nel 1917 come *Phthorimaea*; successivamente, nel 1962, è stata inclusa in *Gnorimoschema*, poi in *Scrobipalpula* e, dal 1993, nel genere *Tuta*. L'adulto è lungo 5-6 mm con apertura alare di 10-13 mm. Grigio con sfumature beige, è

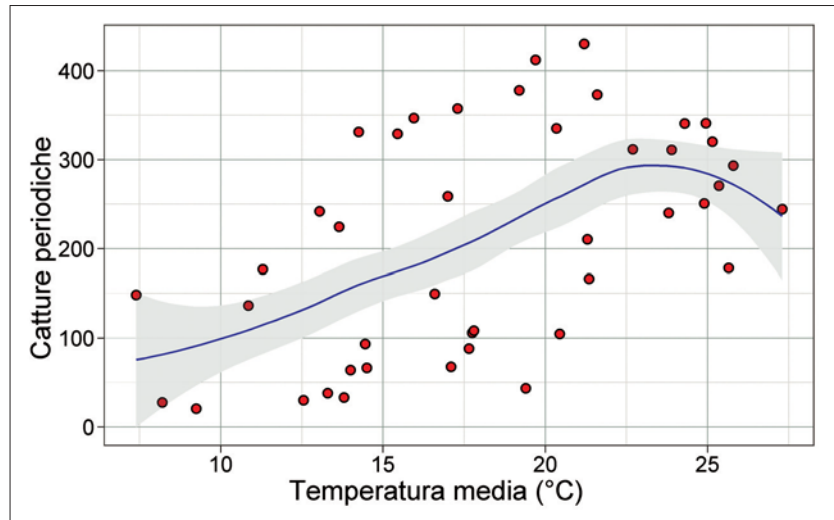


Figura 4
Catture settimanali di adulti di *Tuta absoluta* in funzione della temperatura in otto stazioni nella piana del Sele (prov. Salerno) nel 2009. Valori osservati (simboli) e interpolazione media (linea blu) con banda di confidenza al 95%.

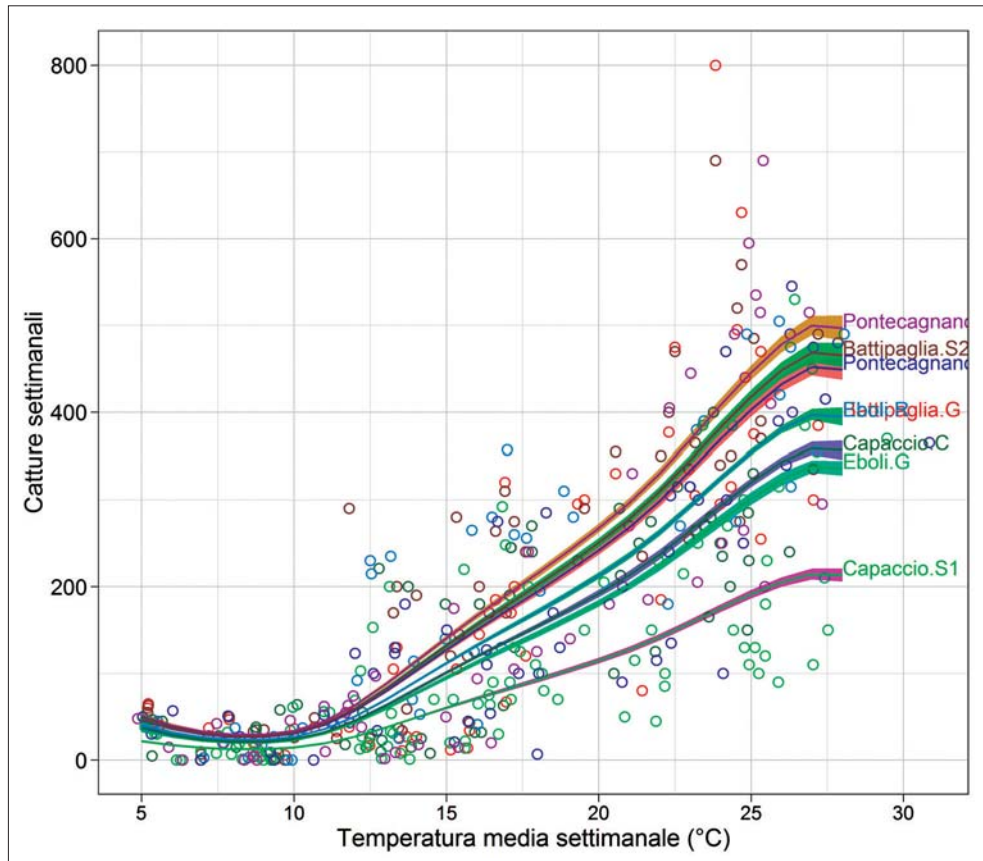


Figura 5
Catture settimanali di adulti di *Tuta absoluta* in funzione della temperatura in otto stazioni nella piana del Sele (prov. Salerno) nel biennio 2011-2012. Valori osservati (simboli) e interpolazioni (linee) con banda di confidenza al 95%.

caratterizzato da ali frangiate, con una serie di strie scure disposte a raggiera nella metà apicale dell'ala anteriore. L'uovo, lungo 0,35-0,38 mm e largo 0,22-0,25 mm, è bianco brillante o appena giallognolo quando deposto, bruno a maturità. La larva è lunga fino a 7-8 mm; sul colore di fondo gialliccio o verdognolo, si evidenzia spesso una

sfumatura dorsale di tonalità rosata più o meno intensa. Il capo è giallo, annerito sui lati e posteriormente, mentre la placca protoracica è chiara con il solo bordo latero-posteriore castano o nericcio. La crisalide, lunga 3,8-4,5 mm e larga 1,3-1,5 mm, ha il cremaster costituito da una brevissima e tozza spinetta disposta in posizione apico-dorsale e

da una serie di 10-11 coppie di setole rigide e uncinate situate sia sul lato dorsale che sul lato ventrale. Il numero di uova deposto per femmina varia da alcune decine a un paio di centinaia. L'incubazione viene completata in 5-6 giorni nel periodo da aprile a ottobre e in 8-10 giorni nella rimanente parte dell'anno. La durata della fase larvale, che comprende di norma quattro età, oscilla in media da 13 a 37 giorni. L'incrisalidamento ha luogo nel suolo o sulla pianta stessa e la sua durata oscilla da un minimo di 8-12 giorni a un massimo di due mesi nella generazione svernante. Nel Salernitano (Scafati), dove sono state riscontrate da 6 a 9 generazioni annue, la durata totale del ciclo è variata dai circa 40 giorni della I e VIII generazione a 28 giorni della VI generazione, fino a 60 giorni per la generazione più tardiva (IX). L'insetto ha un'attività di volo pressoché continua nel corso dell'anno, con incrementi notevoli nei mesi da agosto a ottobre e riduzioni drastiche in novembre-dicembre. Una relazione non lineare è stata trovata tra le catture di adulti alle trappole sessuali e la temperatura: le catture aumentano con l'innalzamento della temperatura media giornaliera fino a 23-26 °C, ma mostrano poi un andamento stazionario o si riducono nel periodo più caldo.

BIBLIOGRAFIA

- ARNÓ J., MUSSOLL A., GABARRA R., SORRIBAS R., PRAT M., GARRETA A., GÓMEZ A., MATAS M., POZO C., RODRÍGUEZ D., 2009 – Tuta absoluta una nueva plaga en los cultivos de tomate. Estrategias de manejo. - Phytoma España, 211: 16-22.
- BALDIZZONE G., GOZMÁNY L., HUEMER P., KARSHOLT O., LVOVSKY A., PARENTI U., PASSERIN D'ENTRÈVES P., RIEDL T., VARALDA P.G., ZANGHERI S., 1995 – *Lepidoptera Gelechioidea*. In: Minelli A., Ruffo S. & La Posta S. (eds.), Checklist delle specie della fauna italiana, 83. Calderini, Bologna.
- BARRIENTOS Z.R., APABLAZA H.J., NORERO S.A., ESTAY P.P., 1998 – *Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Ciencia e Investigación Agraria, 25: 133-137.
- BELDA J.E., CALVO F.J., GIMÉNEZ A., 2010 – *Estrategia para el control biológico de Tuta absoluta en tomate mediante sueltas de Nesidiocoris tenuis en pre-trasplante*. - Phytoma España, 217: 48-52.
- BENTANCOURT C.M., SCATONI I.B., RODRÍGUEZ J.J., 1996 – *Influencia de la temperatura sobre la reproducción y el desarrollo de Scrobipalpus absoluta (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae)*. - Revista Brasileira de Biologia, 56 (4): 661-670.
- BIELZA P., 2010 – *La resistencia a insecticidas en Tuta absoluta (Meyrick)*. - Phytoma España, 217: 103-106.
- BIONDI A., BUONOCORE E., HADDI K., RAPISARDA C., SISCARO G., TROPEA GARZIA G., ZAPPALÀ L., 2011 – *Esperienze di lotta integrata a Tuta absoluta in Sicilia*. XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Genova 13-16 giugno 2011, Sessione VI, Entomologia agraria, Presentazioni Posters, pag. 205.
- BLAND K.P., CORLEY M.F.V., EMMET A.M., HECKFORD R.J., HUEMER P., LANGMAID J.R., PALMER S.M., PARSONS M.S., PITKIN L.M., SATTLER K., SIMPSON A.N.B., 2002 – *Gelechiinae*. In: A. M. Emmet, J. R. Langmaid 'The Moths and Butterflies of Great Britain and Ireland' Volume 4, Part 2, Gelechiidae. Harley Books, cfr. 118-204.
- CABELLO T., 2009 – *Control biológico de la polilla del tomate, Tuta absoluta, en cultivos en invernaderos de España*. - Phytoma España, 214: 22-27.
- CALVO F.J., BELDA J.E., GIMÉNEZ A., 2010 – *Una estrategia para el control, biológico de mosca blanca y Tuta absoluta en tomate*. - Phytoma España, 216: 46-52.
- CAPONERO A., 2010 – *La Tuta del pomodoro*. - Colture Protette, 4: 78-79.
- CLARKE J.F., 1962 – *New species of microlepidoptera from Japan*. - Entomological News, 73 (4): 91-102.
- COCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2011 – *Prove di confusione sessuale contro Tuta absoluta su pomodoro in coltura protetta*. XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Genova 13-16 giugno 2011, Sessione VI, Entomologia agraria, Presentazioni Posters, pag. 214.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUIS K.A. G., BURGIO G., ARPAIA S., NARVÁEZ-VÁSQUEZ C.A., GONZÁLEZ-CABRERA J., CATALÁN RUESCAS D., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, history of invasion and prospects for biological control*. - Journal of Pest Science, 83: 197-215.
- ESPINOSA B., SANNINO L., 2009a – *Tuta, Keiferia e Phthorimaea, tignole da tenere sotto controllo*. - L'Informatore Agrario, 65 (29): 56-58.
- ESPINOSA B., SANNINO L., 2009b – *Confronto fra gli stadi larvali di Phthorimaea operculella, Tuta absoluta e Keiferia lycopersicella*. XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Proceedings, Ancona 15-18 Giugno 2009, pag. 47.
- FINOCCHIARO E., SBRISCIA FIORETTI C., 2010 – *Esperienze di lotta su pomodoro contro Tuta absoluta, lepidottero gelechide di recente introduzione in Italia*. - Atti Giornate Fitopatologiche, 2010, 1: 261-266.
- FOIS F., PORCU M., SAU S., CARRUSCI P., DEIANA A.M., NANNINI M., 2011 – *Osservazioni sulla dinamica di popolazione della tignola del pomodoro Tuta absoluta (Lepidoptera, Gelechiidae) in coltura protetta*. XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Genova 13-16 giugno 2011, Sessione VI, Entomologia agraria, Presentazioni Posters, pag. 221.
- GABARRA R., ARNÓ J., 2010 – *Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña*. - Phytoma España, 217: 66-68.
- GARCIA M.F., VERCHER R., 2010 – *Descripción, origen y expansión de Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Phytoma España, 217: 16-20.
- GERMAIN J.F., LACORDAIRE A.L., COCQUEMPOT C., RAMEL J.M., OUDARD E., 2009 – *Un nouveau ravageur de la tomate en France: Tuta absoluta*. - PHM-Revue Horticole, 512: 37-41.
- GIUSTOLIN T.A., VENDRAMIM J.D., ALVES S.B., VIEIRA S.A., PEREIRA R.M., 2001 – *Susceptibility of Tuta absoluta (Meyrick) (Lep.: Gelechiidae) reared on two species of Lycopersicon to Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. - Journal of Applied Entomology, 125: 551-556.
- GUENAOUI Y., 2008 – *Nouveau ravageur de la tomate en Algérie*. - Phytoma – La Défense des Végétaux, 617: 18-19.
- GUENAOUI Y., BENSAD F., OUEZZANI K., 2010 – *First experiences in managing tomato leaf miner Tuta absoluta Meyrick (Lep.: Gelechiidae) in the Northwest area of the country. Preliminary studies in biological control by use of indigenous natural enemies*. - Phytoma España, 217: 112-113.

- HUEMER P., KARSHOLT O., 2010 – *Microlepidoptera of Europe, volume 6, Gelechiidae II (Gelechiinae: Gnorimoschemini)*. Apollo Books, Stenstrup, 586 pp. (cfr. 204-206).
- IMENES S.D.L., FERNANDES M.A.U., DE CAMPOS T.B., TAKEMATSU A.P., 1990 – *Aspectos biológicos e comportamentais da traça do tomateiro* *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick, 1917), (Lepidoptera-Gelechiidae). - Arquivos do Instituto Biológico, 57 (1/2): 63-68.
- MARTÍ MARTÍ S., MUÑOZ CELDRÁN, CASAGRANDE E., 2010 – *El uso de feromonas para el control de Tuta absoluta: primeras experiencias en campo*. - Phytoma España, 217: 35-40.
- MIRANDA M.M.M., PICANÇO M., ZANUNCIO J.C., GUEDES R.N.C., 1998 – *Ecological life table of Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). - Biocontrol Science and Technology, 8 (4): 597-606.
- POTTING R., 2009 – *Pest risk analysis, Tuta absoluta, tomato leaf miner moth*. Plant protection service of the Netherlands, 24 pp, www.minlnv.nl
- POVOLNÝ D., 1967a – *Genitalia of some nearctic and neotropical members of the tribe Gnorimoschemini (Lepidoptera, Gelechiidae)*. - Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae, 37: 83-127.
- POVOLNÝ D., 1967b – *Die stammesgeschichtlichen Beziehungen der Tribus Gnorimoschemini im Weltraum (Lepidoptera, Gelechiidae)*. Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae, 37: 161-232.
- POVOLNÝ D., 1975 – *On three neotropical species of the tribe Gnorimoschemini (Lepidoptera, Gelechiidae) mining Solanaceae*. Acta Univ. Agric. (Brno), 23: 379-393.
- POVOLNÝ D., 1993 – *Zur Taxonomie und Nomenklatur der amerikanischen gnorimoschemoiden Gattungen Tuta Strand, Tecia Strand, Scrobipalpa Povolný und Keiferia Busck (Insecta: Lepidoptera: Gelechiidae)*. Reichenbachia, 30 (14): 85-98.
- POVOLNÝ D., 1994 – *Gnorimoschemini of southern South America VI: identification keys, checklist of Neotropical taxa and general considerations (Insecta, Lepidoptera, Gelechiidae)*. Steenstrupia, Zoological Museum University of Copenhagen, 20 (1): 1-42.
- SANNINO L., ESPINOSA B., 2009 – *Keiferia lycopersicella, una nuova tignola su pomodoro*. L'Informatore Agrario, 65 (4): 69-70.
- SANNINO L., ESPINOSA B., 2010a – *Incidenza di Tuta absoluta sulla produzione di pomodoro*. L'Informatore Agrario, 66 (10): 37-40.
- SANNINO L., ESPINOSA B., 2010b – *Caratteristiche morfologiche di Tuta absoluta*. In: Tuta absoluta. Guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa (Sannino L. & Espinosa B. eds.), L'Informatore Agrario, 46/2010, Suppl. 1: 17-32.
- SANNINO L., ESPINOSA B., 2010c – *Piante ospiti e biologia della tignola del pomodoro*. In: Tuta absoluta. Guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa (Sannino L. & Espinosa B. eds.), L'Informatore Agrario, 46/2010, Suppl. 1, 33-50.
- SANNINO L., PIRO F., ESPINOSA B., 2012a – *Difesa integrata per il controllo di Tuta absoluta*. L'Informatore Agrario, 68 (1): 47-49.
- SANNINO L., PIRO F., ESPINOSA B., 2012b – *Insetticidi efficaci contro la Tuta*. L'Informatore Agrario, 68 (1): 49-59.
- SANNINO L., PIRO F., ESPINOSA B., 2012c – *Lotta alla tignola del pomodoro con Rynaxypyr*. Atti Giornate Fitopatologiche, 2012, 1: 275-280.
- SPERANZA S., 2009 – *Prime segnalazioni di Tuta absoluta su fagiolino nel Lazio*. Terra e Vita, 46: 14-15.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., BIONDI A., ZAPPALÀ L., 2011 – *Biology, distribution and damage of Tuta absoluta, an exotic invasive pest from South America*. Proceedings EPPO/IOBC/NEPPPO Joint International Symposium on management of Tuta absoluta (tomato borer). Agadir, Morocco, November 16-18, 2011, pag. 12.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., COLOMBO A., CAMPO G., 2009 – *Rinvenuta in Sicilia Tuta absoluta*. L'Informatore Agrario, 65 (4): 71.
- URBANEJA A., VERCHER R., NAVARRO V., GARCIA MARI F., PORCUNA J.L., 2007 – *La polilla del tomate, Tuta absoluta*. Phytoma España, 194: 16-23.
- VIGGIANI G., FILELLA F., DELRIO G., RAMASSINI W., FOXI C., 2009 – *Tuta absoluta, nuovo lepidottero segnalato anche in Italia*. L'Informatore Agrario, 1: 2-4.

IL COMPLESSO DEI PARASSITOIDI DI *TUTA ABSOLUTA* (MEYRICK) IN ITALIA

MASSIMO GIORGINI (*) - UMBERTO BERNARDO (*) - PAOLO ALFONSO PEDATA (*)

(*) Istituto per la Protezione delle Piante (IPP), CNR - UOS di Portici, Via Università n. 133, Portici (NA); e-mail: pedata@ipp.cnr.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 febbraio 2012.

The parasitoid complex of Tuta absoluta (Meyrick) in Italy

After its arrival into Europe from South America, the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) caused severe yield losses to tomato crops both in open field and in protected greenhouses. In Italy, various research groups started to monitor the complex of natural antagonists which moved to develop on this invasive species, by sampling on attacked tomato (both for fresh and processing use) as well as on secondary hosts, both cultivated (eggplants, potato) and spontaneous (*Solanum nigrum*). Several native parasitoids have been found to parasitize *T. absoluta*, following the typical pattern of colonization on exotic pests. The recovered species were, in fact, mainly generalist idiobionts, which cause low levels of parasitism in open field. The species found belong to 13 genera and 6 families (Ichneumonidae, Braconidae, Eulophidae, Elasmidae, Pteromalidae and Trichogrammatidae). In particular, the 16 identified species were: *Diadegma ledicola* Horstmann, *Diadegma pulchripes* (Kokujev), *Agathis fuscipennis* (Zetterstedt), *Bracon hebetor* (Say), *Bracon osculator* (Nees), *Bracon* (*Habrobracon*) *nigricans* Szepilgeti, *Chrysocharis pentheus* (Walker), *Diglyphus crassinervis* Erdős, *Necremnus artynes* (Walker), *Necremnus* sp. near *artynes* (Walker), *Necremnus* sp. near *tidius* (Walker), *Neochrysocharis formosa* (Westwood), *Pnigalio soemius* s.l. (Walker), *Pnigalio cristatus* (Ratzeburg), *Pnigalio incompletus* (Boucek) and *Halticoptera aenea* (Walker). For 13 species, the findings represent the first host-parasitoid association report on *T. absoluta*. This survey suggests that indigenous natural enemies may have a potential role in reducing population of *T. absoluta*, and habitat management techniques should be considered in the development of integrated management strategy of the tomato borer in the Mediterranean area.

KEY WORDS: Parasitoid community, tomato borer, natural enemies, new host-parasitoid associations, habitat management.

INTRODUZIONE

Eventi di invasione biologica di specie non native rappresentano un fenomeno in crescente espansione e di notevole rilevanza quale componente del cambiamento globale (VITOUSEK *et al.*, 1996). Tali eventi hanno notevoli ripercussioni sia da un punto di vista economico che ecologico, fino a causare una riduzione della biodiversità locale, limitando, di fatto, i servizi forniti dagli ecosistemi (GUREVITCH & PADILLA, 2004; HOOPEY *et al.*, 2005).

Gli studi sugli eventi di invasione biologica sono rivolti a indagare sulle cause che rendono alcuni ecosistemi più facilmente invadibili di altri o sul perché alcune specie siano potenzialmente più invasive di altre (MACISAAC *et al.*, 2001; KEANE & CRAWLEY, 2002).

Un'interpretazione intuitiva suggerisce che un organismo esotico possa facilmente stabilirsi e riprodursi se nel nuovo ambiente l'azione di controllo degli antagonisti naturali risulti scarsa o assente (Enemy release hypothesis o ERH) (KEANE & CRAWLEY, 2002; TORCHIN *et al.*, 2002, 2003; MITCHELL & POWER, 2003). Normalmente

si tende a distinguere l'effetto della riduzione apparente degli antagonisti (Apparent enemy reduction), in cui il numero di specie nel nuovo areale di diffusione risulta ridotto, dall'insufficiente impatto che gli antagonisti esercitano sulla specie esotica (Realized enemy release) (TORCHIN *et al.*, 2003; MITCHELL & POWER, 2003; COLAUTTI *et al.*, 2004).

In relazione alle nuove associazioni fra insetti fitofagi invasivi e parassitoidi nativi rispetto alle comunità indigene, CORNELL & HAWKINS (1993) segnalano comunemente un numero più basso di antagonisti naturali caratterizzati da una minore attività di parassitizzazione. Le nuove associazioni coinvolgono più frequentemente parassitoidi idiobionti piuttosto che koinobionti. Le specie appartenenti al primo gruppo richiedono uno scarso o nullo adattamento specifico alla fisiologia dell'ospite, che viene ucciso o paralizzato irreversibilmente prima di essere consumato. Per tali specie, più frequentemente ectoparassitoidi con ampia gamma di ospiti, il passaggio a nuovi ospiti dovrebbe poter avvenire più facilmente. I koinobionti, per contro, sono più spesso endoparassitoidi che devono confrontarsi più intimamente

con la fisiologia dell'ospite. Sono dunque caratterizzati da uno spettro di ospiti più ristretti e minore capacità di adattarsi a nuovi ospiti. CORNELL & HAWKINS (1993) hanno inoltre individuato una significativa, seppur debole, correlazione fra l'abbondanza di specie di parassitoidi e il tempo di residenza di una specie invasiva, proponendo due spiegazioni alternative: 1) "Ipotesi dell'aggiustamento" (adjustment-hypothesis), secondo la quale un parassitoide richiede un certo lasso di tempo per adattarsi da un punto di vista comportamentale, fenologico o biologico a una nuova specie ospite; 2) "Ipotesi della diffusione geografica" (geographic spread-hypothesis), secondo la quale nella progressiva colonizzazione di nuove aree a carico della specie invasiva sia reclutato un numero crescente di specie di parassitoidi. L'arco temporale richiesto perché la comunità di parassitoidi su di una specie invasiva risulti equivalente a quella di specie native è stato grossolanamente indicato poter variare tra i 150 e i 10.000 anni.

La minatrice del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera Gelechiidae), è un dannoso fitofago particolarmente vincolato al pomodoro e secondariamente ad altre solanacee sia coltivate che spontanee, che dalla sua area di origine, il Sud America, ha rapidamente invaso a partire dal 2006 l'Europa, il Nord Africa e il Medio Oriente (URBANEJA *et al.*, 2007; DESNEUX *et al.*, 2010, 2011). Dal 2008 in Italia il fitofago ha colonizzato rapidamente tutte le più importanti regioni produttrici di pomodoro, sia per il consumo fresco che da industria (TROPEA GARZIA *et al.*, 2009; VIGGIANI *et al.*, 2009). Il controllo chimico di *T. absoluta*, che anche nel suo areale di origine risulta essere il fitofago chiave della coltura, presenta notevoli difficoltà per la facilità con cui vengono selezionati ceppi resistenti e per il comportamento endofitico delle larve (SIQUEIRA *et al.*, 2000; LIETTI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011), nonché per il notevole impatto ecologico degli insetticidi sulle comunità di antagonisti naturali (DESNEUX *et al.*, 2007; BIONDI *et al.*, 2012). Quest'ultima conseguenza può ovviamente pregiudicare strategie di controllo integrato già consolidate nei confronti di altre specie fitofaghe. Un controllo eco-sostenibile del fitofago, con lo sviluppo di una metodologia di controllo integrato, richiede una valutazione preliminare delle specie antagoniste indigene che sono state capaci di adattarsi a *T. absoluta* e del loro impatto sulle sue popolazioni.

In numerose aree geografiche del Bacino del Mediterraneo diversi nemici naturali indigeni, sia parassitoidi che predatori, si sono adattati a svilupparsi a carico di *T. absoluta* (DESNEUX *et al.*, 2010; GABARRA & ARNÓ, 2010; MOLLÁ *et al.*, 2010). A

partire dal 2009 diversi gruppi di lavoro hanno iniziato a campionare in diverse regioni italiane al fine di individuare il complesso dei parassitoidi adattatisi sul nuovo ospite, a valutarne in via preliminare il loro impatto ecologico e la fenologia, nell'ottica di poter sviluppare strategie di controllo biologico di tipo conservativo, uno degli obiettivi delle recenti linee guida europee per il controllo integrato (IPM). In questa nota si riassumono i risultati ottenuti.

CAMPIONAMENTO DEI PARASSITOIDI

I campionamenti sono stati condotti con modalità differenti in diverse regioni italiane, raccogliendo materiale infestato di pomodoro (in coltura di pieno campo e sotto serra) e altri potenziali ospiti, sia coltivati (patata, melanzana) che spontanei (*Solanum nigrum*) in diverse condizioni agroeconomiche ed ecologiche.

In dettaglio i campionamenti sono stati condotti secondo le seguenti modalità.

ZAPPALÀ *et al.* (2012) hanno condotto campionamenti in diverse località siciliane, campane e sarde. In particolare i campionamenti a cadenza settimanale hanno riguardato il pomodoro in coltura protetta da agosto 2009 a febbraio 2010 in 6 siti siciliani (province di Catania, Siracusa e Ragusa) e da maggio a ottobre 2010 in 2 siti campani (Province di Caserta e Salerno). In ulteriori 7 siti campani (provincia di Napoli) sono stati effettuati campionamenti sporadici sia su pomodoro da industria che per il consumo fresco nei mesi di settembre e ottobre 2010. In diversi ambienti siciliani e campani sono state inoltre esposte in campo piante di pomodoro sentinella con un elevato numero di stadi pre-immaginali di *T. absoluta*. In Sardegna, in 2 siti in provincia di Cagliari sono stati condotti rispettivamente un campionamento nel periodo di giugno-luglio 2010 e un campionamento con cadenza settimanale da novembre 2010 a maggio 2011, entrambi su pomodoro in coltura protetta. In un altro sito in provincia di Cagliari, i campionamenti condotti da marzo ad aprile 2011 hanno previsto la raccolta specifica di pupe di *T. absoluta* da foglie o bacche infestate di pomodoro coltivato in serra, con lo scopo di valutare l'emergenza di parassitoidi pupali. Infine, in un sito in provincia di Sassari è stata monitorata con cadenza bisettimanale una coltura di pieno campo di patata da novembre 2010 a maggio 2011. Sono stati inoltre previsti campionamenti occasionali di *S. nigrum*.

RIZZO *et al.* (2011) hanno condotto dei campionamenti in serre del palermitano (agricoltura bio-

logica) su colture di pomodoro, da gennaio a giugno 2010, e di melanzana da fine marzo a giugno 2010. Anche in questo caso sono stati previsti campionamenti contestuali di *S. nigrum*.

LONI *et al.* (2011) hanno condotto i campionamenti in provincia di Lucca (Toscana) raccogliendo materiale infestato di *S. nigrum* in corrispondenza di serre di pomodoro durante il periodo di settembre-ottobre 2009 e 2010.

FERRACINI *et al.* (2012) hanno effettuato campionamenti in Liguria, Sicilia e Sardegna.

In tutti i casi il materiale vegetale è stato conservato in gabbie areate fino all'emergenza dei parassitoidi.

In alcuni casi è stata calcolata la percentuale di parassitizzazione come: larve parassitizzate di *T. absoluta* / larve morte di *T. absoluta* + larve vive di *T. absoluta* + larve parassitizzate di *T. absoluta* (ZAPPALÀ *et al.*, 2012), o come adulti di parassitoidi / adulti di *T. absoluta* + adulti di parassitoidi (LONI *et al.*, 2011; RIZZO *et al.*, 2011).

RISULTATI

Durante i campionamenti dei quattro studi sono state ottenute 30 specie di parassitoidi inquadrabili in 13 generi appartenenti a 6 famiglie diverse (Ichneumonidae, Braconidae, Eulophidae, Elasmidae, Pteromalidae e Trichogrammatidae). Di queste sono state identificate 16 specie (Tab. 1).

La maggiore biodiversità è stata rinvenuta nei siti caratterizzati dalla presenza di una vegetazione spontanea varia e abbondante.

In dettaglio le specie di parassitoidi identificate nei vari studi sono state le seguenti:

- *Agathis fuscipennis* (Zetterstedt), endoparassitoide polifago riportato a carico di numerose famiglie di Lepidoptera per l'Europa (SIMBOLLOTTI & VAN ACHTERBERG, 1999; YU & VAN ACHTERBERG, 2010).
- *Bracon hebetor* (Say), ad ampia distribuzione Palearctica, è un ectoparassitoide idiobionte altamente polifago (YU & VAN ACHTERBERG, 2010).
- *Bracon osculator* (Nees), ad ampia distribuzione Palearctica, è un ectoparassitoide idiobionte gregario altamente polifago (YU & VAN ACHTERBERG, 2010), segnalato per l'Italia su *Elachista bisulcella* (Duponchel) ed *E. utonella* (Frey) (Lepidoptera Elachistidae) (PARENTI *et al.*, 1995).
- *Bracon* (*Habrobracon*) *nigricans* Szepilgeti [= *concolorans* Marshall; *concolor* Thomson; *mongolicus* (Telenga)], ad ampia distribuzione Palearctica, è un ectoparassitoide generalista a

carico di stadi larvali di Lepidoptera e Coleoptera. In Italia è già stato segnalato su *Phthorimea operculella* (Zeller) (Lepidoptera Gelechiidae) in Sardegna (ORTU & FLORIS, 1989).

- *Chrysocharis pentheus* (Walker) è un parassitoide ad ampia distribuzione Palearctica segnalato su diversi fillominatori, prevalentemente Diptera Agromyzidae, ma anche su diversi Lepidotteri e Coleotteri (HANSSON, 1985).
- *Diadegma ledicola* Horstmann (Hymenoptera Ichneumonidae) è un endoparassitoide a distribuzione europea, finora segnalato a carico di Lepidoptera Psychidae e Tineidae.
- *Diadegma pulchripes* (Kokujev) (= *turcator* Aubert) (Hymenoptera Ichneumonidae) è un endoparassitoide finora segnalato in relazione a *P. operculella* da Cipro, Creta, Turchia Israele, India e Cina (PUCCI *et al.*, 2003; YU & VAN ACHTERBERG, 2010), con livelli di parassitizzazione anche elevati (ORTU & FLORIS, 1989).
- *Diglyphus crassinervis* è un parassitoide ad ampia distribuzione Palearctica associato a fillominatori (Diptera Agromyzidae) (NOYES, 2003).
- *Necremnus* sp. near *tidius* (Walker) (Hymenoptera Eulophidae) è un ectofago solitario polifago di Lepidoptera fillominatori (BERNARDO & VIGGIANI, 2002).
- *Necremnus artynes* (Walker) (Hymenoptera Eulophidae). Biologia simile alla specie precedente. *N. artynes* è stato recentemente segnalato per la Spagna (DESNEUX *et al.*, 2010). RIZZO *et al.* (2011) hanno riportato questa specie anche per la Sicilia. Tuttavia, nel corso dei campionamenti, ZAPPALÀ *et al.* (2011) e FERRACINI *et al.* (2012) hanno ottenuto esclusivamente individui che si differenziano morfologicamente da *N. artynes* e che sono stati trattati come *N. sp. near artynes*. *N. sp. near artynes* è la specie a più ampia distribuzione sul territorio italiano essendo stata rinvenuta in tutte le regioni monitorate, con l'esclusione della Toscana.
- *Neochrysocharis formosa* (Westwood) [= *Closterocherus formosus* (Westwood)] (Hymenoptera Eulophidae) è un endoparassitoide cosmopolita (BURKS *et al.*, 2011) attivo su numerose specie ospiti (Coleoptera, Diptera e Lepidoptera) (NOYES, 2003). Già segnalato in Italia su *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera Gracillariidae) (MASSA *et al.*, 2001) e *Holocacista rivillei* Stainton (Lepidoptera Heliozelidae) (ALMA, 1995). Ha un buon potenziale di controllo, avendo inflitto percentuali di mortalità di circa il 5% in Argentina (LUNA *et al.*, 2011).
- *Pnigalio soemius* s.l. (Walker) (Hymenoptera Eulophidae) è un ectoparassitoide molto comu-

Tabella 1 – Taxa dei parassitoidi ottenuti da *Tuta absoluta* in Italia (2009-2011).

Specie	Stadio attaccato	Tipo sviluppo	Regione	Composizione % comunità ⁽¹⁾	Composizione % comunità ⁽²⁾
Fam. Ichneumonidae					
<i>Diadegma pulchripes</i>	Larva	Endofago	Si ⁽¹⁾	6,1	–
<i>Diadegma ledicola</i>	Larva	Endofago	L ⁽²⁾	–	22,0
<i>Diadegma</i> sp.	Larva	Endofago	C ⁽¹⁾	0,4	–
<i>Cryptinae</i> gen. sp.	Larva	Endofago	S ⁽¹⁾	1,7	–
Fam. Braconidae					
<i>Agathis</i> sp.	Larva	Endofago	Si ⁽²⁾	–	2,6
<i>Agathis fuscipennis</i>	Larva	Endofago	T ⁽³⁾	–	–
<i>Bracon osculator</i>	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾ , L ⁽²⁾	0,9	5,3
<i>Bracon nigricans</i>	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾	10,8	–
<i>Bracon hebetor</i>	Larva	Ectofago	Sa ⁽²⁾	–	1,8
Family Eulophidae					
<i>Chrysoschalis</i> sp.	Larva	Endofago	Si ⁽¹⁾ , C ⁽¹⁾	2,2	–
<i>Chrysoschalis pentheus</i>	Larva	Endofago	Si ⁽⁴⁾	–	–
<i>Diglyphus crassinervis</i>	Larva	Ectofago	Si ⁽⁴⁾	–	–
<i>Elachertus</i> sp.	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾	0,4	–
<i>Elachertus inunctus</i> sp. gr.	Larva	Ectofago	C ⁽¹⁾	8,2	–
<i>Necremnus</i> sp.	Larva	Ectofago	C ⁽¹⁾ , Si ⁽¹⁾	1,3	–
<i>Necremnus artynes</i>	Larva	Ectofago	Si ⁽⁴⁾	–	–
<i>Necremnus</i> sp. near <i>artynes</i>	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾⁽²⁾ , Sa ⁽¹⁾⁽²⁾ , C ⁽¹⁾	38,5	32,3
<i>Necremnus</i> sp. near <i>tidius</i>	Larva	Ectofago	C ⁽¹⁾ , Sa ⁽¹⁾ , L ⁽²⁾	3,5	26,3
<i>Neochrysoschalis formosa</i>	Larva	Endofago	C ⁽¹⁾ , Si ⁽¹⁾ , L ⁽²⁾	12,1	3,5
<i>Pnigalio</i> sp. a gr. <i>soemius</i>	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾	2,6	–
<i>Pnigalio</i> sp. b gr. <i>soemius</i>	Larva	Ectofago	C ⁽¹⁾	0,4	–
<i>Pnigalio</i> sp. c gr. <i>soemius</i>	Larva	Ectofago	L ⁽²⁾	–	2,6
<i>Pnigalio cristatus</i>	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾ , L ⁽²⁾	0,9	2,6
<i>Pnigalio incompletus</i>	Larva	Ectofago	C ⁽¹⁾	0,4	–
<i>Sympiesis</i> sp.	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾	1,7	–
Fam. Elasmidae					
<i>Elasmus</i> sp.	Larva	Ectofago	Si ⁽¹⁾	1,7	–
Fam. Pteromalidae					
<i>Halticoptera aenea</i>	Larva	Endofago	Si ⁽¹⁾	0,4	–
Fam. Trichogrammatidae					
<i>Trichogramma</i> sp. a	Uovo	Endofago	C ⁽¹⁾	1,7	–
<i>Trichogramma</i> sp. b	Uovo	Endofago	C ⁽¹⁾	1,7	–
<i>Trichogramma</i> sp. c	Uovo	Endofago	Si ⁽¹⁾	1,7	–
<i>Trichogramma</i> sp. d	Uovo	Endofago	Sa ⁽¹⁾	0,4	–

C=Campania; Si =Sicilia; Sa=Sardegna, L= Liguria; T=Toscana

⁽¹⁾ ZAPPALÀ *et al.* (2012); ⁽²⁾ FERRACINI *et al.* (2012); ⁽³⁾ LONI *et al.* (2011); ⁽⁴⁾ RIZZO *et al.* (2011).

ne, a distribuzione paleartica, segnalato in rapporto a oltre 130 specie di fillominatori e galligeni, anche di notevole importanza economica, degli ordini Coleoptera, Diptera, Lepidoptera ed Hymenoptera (NOYES, 2003; BERNARDO *et al.*, 2008). Tuttavia va considerato che allo stato attuale il “concetto tassonomico” di *P. soemius* include un insieme di specie criptiche, alcune polifaghe altre stenofaghe (GEBIOLA *et al.*, 2012). I reperti ottenuti indicano che gli individui ottenuti da *T. absoluta* appartengono almeno a tre differenti specie criptiche. Le specie

riferibili a *P. soemius* s.l. mostrano un’elevata attività di predazione sia allo stadio larvale (host killing) sia allo stadio di adulto (host feeding) e sono quindi dei limitatori di specie fitofaghe potenzialmente molto efficaci (BERNARDO *et al.*, 2006).

- *Pnigalio cristatus* (= *Ratzeburgiola cristata*) (Ratzeburg) (Hymenoptera Eulophidae) è una specie europea segnalata a carico di numerosi fillominatori (Coleoptera, Diptera e Lepidoptera) (MASSA *et al.*, 2001; NOYES, 2003; VERCHER *et al.*, 2005).

- *Pnigalio incompletus* (= *Ratzeburgiola incompleta*) (Boucek) (Hymenoptera Eulophidae) segnalato in rapporto a numerosi ospiti fillominatori (Diptera, Lepidoptera e Coleoptera), ma anch'esso probabilmente rappresentato da varie specie criptiche a regime alimentare stenofago (GEBIOLA *et al.*, 2010).
- *Halticoptera aenea* (Walker) (Hymenoptera Pteromalidae) è un endoparassitoide cosmopolita polifago, prevalentemente associato a ditteri fillominatori (Agromyzidae) (NOYES, 2003).

Per tutte le suddette specie, a eccezione di *N. formosa* e *N. artynes*, le segnalazioni rappresentano una nuova associazione con *T. absoluta*.

DISCUSSIONI

I risultati di questi studi pongono in evidenza come, in un arco di tempo relativamente breve, numerose specie di parassitoidi nativi si siano adattati a riprodursi su di una specie invasiva. Infatti, in un'indagine preliminare condotta poco dopo l'arrivo di *T. absoluta* nel bacino Mediterraneo, erano state segnalate solo 4 specie di parassitoidi (due larvali e due oofaghe) (DESNEUX *et al.*, 2010). Confrontando i risultati dei lavori presentati con la composizione dei parassitoidi in Sud America, emerge un quadro con un numero di specie molto più basso (28 contro 48) (LUNA *et al.*, 2007; DESNEUX *et al.*, 2010), sebbene in termini di composizione relativa di famiglie e di specializzazione trofica le similitudini siano maggiori.

Le dinamiche di adattamento alla specie invasiva ricalcano quanto riscontrato in altri casi studio, con un livello di parassitizzazione relativamente basso, espletato perlopiù da generalisti idiobionti (CORNELL & HAWKINS, 1993). Va comunque sottolineato che frequentemente anche le comunità di parassitoidi vincolate alle specie di fillominatori indigeni, in Europa sono dominate da idiobionti (ASKEW & SHAW, 1974; HAWKINS & LAWTON, 1987; CORNELL & HAWKINS, 1993; HELLRIGL, 2001; NOYES, 2003).

Delle 6 famiglie a cui i parassitoidi ottenuti sono stati attribuiti, la più numerosa in termini di specie è stata quella degli Eulophidae. Nello studio condotto da ZAPPALÀ *et al.* (2012) i parassitoidi più abbondanti sono stati *Necremnus* sp. near *artynes*, *Bracon nigricans* e *Neochrysocharis formosa*, che hanno rappresentato circa il 70% degli individui raccolti, mentre nello studio di FERRACINI *et al.* (2012) *Necremnus* sp. near *artynes* e *Diadegma ledicola* hanno rappresentato oltre l'80% degli individui raccolti. *Necremnus artynes* ha rappresentato oltre il 90% delle catture nei campiona-

menti condotti da RIZZO *et al.* (2011), mentre LONI *et al.* (2011) hanno riferito esclusivamente di catture di *Agathis fuscipennis*.

Delle specie riportate in questi studi, *N. formosa* è l'unica specie presente anche in Sud America, dove è riportata come potenziale agente di controllo biologico (LUNA *et al.*, 2011). *Necremnus* sp. near *artynes*, è la specie che ha presentato la maggiore diffusione, essendo stata ottenuta in molte località monitorate lungo un arco temporale ampio (da maggio a ottobre). La notevole attività di questo parassitoide potrebbe essere messa in relazione all'abbondanza dei suoi ospiti primari, in particolare *Cosmopterix pulchrimella* Chambers su *Parietaria diffusa* (RIZZO, 1999). Il rapido utilizzo di *T. absoluta* sin dall'esordio della colonizzazione del bacino Mediterraneo, da parte di *Necremnus* sp. near *artynes* rappresenta un interessante esempio di flessibilità nella scelta dell'ospite, che potrebbe pertanto ricadere nella "geographic spread-hypothesis", mentre le numerose nuove associazioni riscontrate negli studi lungo un più ampio intervallo temporale, potrebbero far propendere per la necessità, delle specie coinvolte, di adattarsi gradualmente al nuovo ospite ed essere pertanto inquadrabili come esempi di "adjustment hypothesis" (CORNELL & HAWKINS, 1993). Tuttavia indagini di questo tipo richiederebbero in maniera preliminare un corretto inquadramento sistematico delle specie, con l'ausilio della caratterizzazione molecolare e studi comportamentali allo scopo di accertare in maniera precisa la reale gamma di ospiti. Infatti molti parassitoidi ritenuti polifagi in realtà possono rappresentare un complesso di specie criptiche con esigenze alimentari più ristrette di quanto precedentemente ritenuto (BERNARDO *et al.*, 2008; CHESTERS *et al.*, 2012; GEBIOLA *et al.*, 2012).

Nello studio di ZAPPALÀ *et al.* (2012) sono stati registrati livelli di parassitizzazione di *N. sp.* near *artynes* oscillanti dal 5 al 14%. Su *S. nigrum* LONI *et al.* (2011) hanno registrato un livello di parassitizzazione esercitato da *A. fuscipennis* di circa il 20%. L'indagine di RIZZO *et al.* (2011) è la sola a riportare livelli di parassitizzazione considerevoli (oltre l'80%) su melanzana in coltura protetta. Tuttavia gli studi di RIZZO *et al.* (2011) e LONI *et al.* (2011), avendo escluso dal calcolo della percentuale di parassitizzazione il numero delle larve, hanno ottenuto valori più alti e non immediatamente comparabili con i dati forniti da ZAPPALÀ *et al.* (2012).

È, inoltre, da evidenziare che, dato il peculiare comportamento di alcuni dei parassitoidi ritrovati che praticano sia l'*host feeding* distruttivo sia l'*host killing*, il calcolo della parassitizzazione

potrebbe portare a una sottostima della reale azione di controllo esercitata dal parassitoide (BERNARDO *et al.*, 2006).

I dati raccolti suggeriscono che l'abbondanza delle specie di parassitoidi è fortemente influenzata dalla ricchezza della flora spontanea. L'ingegnerizzazione ambientale attraverso un'opportuna gestione della flora spontanea, a livello aziendale e colturale, appare un'efficace tecnica per incrementare l'abbondanza dei nemici naturali e il loro impatto sulle popolazioni dei fitofagi (GARDINER *et al.*, 2009).

La conoscenza della bio-ecologia dei parassitoidi ritrovati rappresenterà un prerequisito per la messa a punto di strategie di controllo biologico di tipo conservativo, anche attraverso tecniche di aumento della variabilità nella coltura (LANDIS *et al.*, 2000).

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato supportato dal progetto PRIN “Biologia e controllo integrato di *Tuta absoluta* (Meyrick) in Italia” e in parte dal progetto SOS-Pom (CISIA) “Sviluppo di strategie di difesa ecocompatibili per migliorare la sostenibilità della produzione di pomodoro in zone ad alta vocazione del Sud Italia (SOS-POM)”.

RIASSUNTO

La minatrice del pomodoro *Tuta absoluta* (Meyrick), a partire dal suo arrivo in Europa dal Sud America, ha determinato consistenti perdite di produzione alle colture di pomodoro sia in pieno campo che in coltura protetta. In Italia diversi gruppi di lavoro hanno incominciato ad indagare sul complesso dei nemici naturali adattatisi a questa specie invasiva già a partire dal 2009, campionando colture di pomodoro (sia per il consumo fresco che per l'industria) ed ospiti secondari, sia coltivati (melanzana, patata) che spontanei (*Solanum nigrum*). Diverse specie di parassitoidi nativi si sono rivelate capaci di parassitizzare *T. absoluta*, seguendo un tipico processo di colonizzazione di una specie esotica. Infatti, la maggioranza delle specie rilevate ricade nel gruppo dei generalisti idiobionti, capaci di esercitare in pieno campo livelli di parassitizzazione non elevati. Le specie ritrovate appartengono a 13 generi e 6 famiglie (Ichneumonidae, Braconidae, Eulophidae, Elasmidae, Pteromalidae and Trichogrammatidae). In particolare le 16 specie identificate sono state: *Diadegma ledicola* Horstmann, *Diadegma pulchripes* (Kokujev), *Agathis fuscipennis* (Zetterstedt), *Bracon hebetor* (Say), *Bracon osculator* (Nees), *Bracon (Habrobracon) nigriscans* Szelenig, *Chrysocharis pentheus* (Walker), *Diglyphus crassinervis* Erdős, *Necremnus artynes* (Walker), *Necremnus* sp. near *artynes* (Walker), *Necremnus* sp. near *tidius* (Walker), *Neochrysocharis formosa* (Westwood), *Pnigalio soemius* s.l. (Walker), *Pnigalio cristatus* (Ratzeburg), *Pnigalio incompletus* (Boucek) and *Halticoptera aenea* (Walker). Per 13

specie tali reperti hanno rappresentato una nuova segnalazione di associazione ospite-*T. absoluta*. Queste indagini suggeriscono un potenziale ruolo dei parassitoidi indigeni nel limitare le popolazioni di *T. absoluta*, che potrebbero essere esaltate inserendo nello sviluppo di programmi di controllo integrato della minatrice del pomodoro nel Bacino Mediterraneo con opportune tecniche di ingegneria ambientale.

BIBLIOGRAFIA

- ALMA A., 1995 – *Ricerche bio-etologiche ed epidemiologiche su Holocacista rivillei Stainton (Lepidoptera Heliozelidae)*. - Redia, 78: 373-378.
- ASKEW R.R., SHAW M.R., 1974 – *An account of the Chalcidoidea parasitising leaf mining insects of deciduous trees in Britain*. - Biol. J. Linn. Soc., 6: 289-335.
- BERNARDO U., VIGGIANI G., 2002 – *Note biologiche sul Necremnus tidius (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparassitoide di Cosmopterix pulchrimella Chambers (Lepidoptera: Cosmopterigidae)*. - Bollettino del Laboratorio di Entomologia agraria Filippo Silvestri, 58: 87-92.
- BERNARDO U., PEDATA P.A., VIGGIANI G., 2006 – *Life history of Pnigalio soemius (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae) and its impact on a leafminer host through parasitization, destructive host-feeding and host-stinging behavior*. - Biol. Control, 37: 98-107.
- BERNARDO U., MONTI M. M., NAPPO A. G., GEBIOLA M., RUSSO A., PEDATA P., VIGGIANI G., 2008 – *Species status of two populations of Pnigalio soemius (Hymenoptera: Eulophidae) reared from two different hosts: an integrative approach*. - Biol. Control, 46: 393-403.
- BIONDI A., DESNEUX N., SISCARO G., ZAPPALÀ L., 2012 – *Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator Orius laevigatus*. - Chemosphere, 87: 803-812.
- BURKS R.A., HERATY J.M., GEBIOLA M., HANSSON C., 2011 – *Combined molecular and morphological phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with focus on the subfamily Entedoninae*. - Cladistics, 27: 1-25.
- COLAUTTI R.I., RICCIARDI A., GRIGOROVICH I.A., MACISAAC H.J., 2004 – *Is invasion success explained by the enemy release hypothesis?* - Ecol. Lett., 7: 721-733.
- CORNELL H.V., HAWKINS B.A., 1993 – *Accumulation of native parasitoid species on introduced herbivores: a comparison of hosts as natives and hosts as invaders*. - Am. Nat., 141: 847-865.
- CHESTERS D., WANG Y., YU F., BAI M., ZHANG T.-X., HU H.-Y., ZHU C.-D., LI C.-D.; ZHANG Y.-Z., 2012 – *The integrative taxonomic approach reveals host specific species in an Encyrtid parasitoid species complex*. - (M.A. Smith, Ed.) PLoS ONE, 7: e37655. doi:10.1371/journal.pone.0037655.t002
- DESNEUX N., DECOURTYE A., DELPUECH J.M., 2007 – *The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods*. - Annual Review of Entomology, 52: 81-106.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUYTS K.A.G., BURGIO G., ARPAIA S., NARVAEZ-VASQUEZ C.A., GONZALEZ-CABRERA J., CATALAN RUESCAS D., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control*. - Journal of Pest Science, 83: 197-215.

- DESNEUX N., LUNA M.G., GUILLEMAUD T., URBANEJA A., 2011 – *The invasive South American tomato pinworm, Tuta absoluta, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production.* - Journal of Pest Science, 84: 403-408.
- FERRACINI C., INGEGNO B.L., NAVONE P., FERRARI E., MOSTI M., TAVELLA L., ALMA A., 2012 – *Adaptation of indigenous larval parasitoids to Tuta absoluta in Italy.* - J. Econ. Ent., 105:1311-1319.
- GABARRA R., ARNÒ J., 2010 – *Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña.* - Phytoma España, 217: 66-68.
- GARDINER M.M., LANDIS D.A., GRATTON C., DIFONZO C.D., O'NEAL M., CHACON J.M., WAYO M.T., SCHMIDT N.P., MUELLER E.E., HEIMPEL G.E., 2009 – *Landscape diversity enhances biological control of an introduced crop pest in the north-central USA.* - Ecological Applications, 19: 143-154.
- GEBIOLA M., GÓMEZ-ZURITA J., MONTI M.M., NAVONE P., BERNARDO U., 2012 – *Integration of molecular, ecological, morphological and endosymbiont data for species delimitation within the Pnigalio soemius complex (Hymenoptera: Eulophidae).* - Mol. Ecol., 21: 1190-1208.
- GEBIOLA M., BERNARDO U., BURKS R., 2010 – *A reevaluation of the generic limits of Pnigalio Schrank (Hymenoptera: Eulophidae) based on molecular and morphological evidence.* - Zootaxa, 2484: 35-44.
- GUREVITCH J., PADILLA D.K., 2004 – *Are invasive species a major cause of extinctions?* - Trends Ecol. Evol., 19: 470-474.
- HANSSON C., 1985 – *Taxonomy and biology of the Palearctic species of Chrysocharis Förster, 1856 (Hymenoptera: Eulophidae).* - Entomologia Scandinavica, supplement, 26: 1-130.
- HAWKINS B.A., LAWTON J.H., 1987 – *Species richness for parasitoids of British phytophagous insects.* - Nature, 326: 788-790.
- HELLRIGL K., 2001 – *Neue Erkenntnisse und Untersuchungen über die Roßkastanien-Miniermotte Cameraria ohridella Deschka & Dimic, 1986 (Lepidoptera, Gracillariidae).* - Gredleriana, 1: 9-81.
- HOOPER D.U., CHAPIN F.S., EWEL J.J., HECTOR A., INCHAUSTI P., LAVOREL S., LAWTON J.H., LODGE D.M., LOREAU M., NAEEM S., SCHMID B., SETALA H., SYMSTAD A.J., VANDERMEER J., WARDLE D.A., 2005 – *Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge.* - Ecol. Monogr., 75: 3-35.
- KEANE R.M., CRAWLEY M.J., 2002 – *Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis.* - Trends Ecol. Evol., 17: 164-170.
- LANDIS D.A., WRATTEN S.D., GURR G.M., 2000 – *Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture.* - Annual Review of Entomology, 45: 175-201.
- LIETTI M.M., BOTTO E., ALZOGARAY R.A., 2005 – *Insecticide resistance in argentine populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).* - Neotropical Entomology, 34: 113-119.
- LONI A., ROSSI E., VAN ACHTERBERG K., 2011 – *First report of Agathis fuscipennis in Europe as parasitoid of the tomato leafminer Tuta absoluta.* - Bulletin of Insectology, 64: 115-117.
- LUNA M.G., SÁNCHEZ N.E., PEREYRA P.C., 2007 – *Parasitism of Tuta absoluta (Lepidoptera, Gelechiidae) by Pseudapanteles dignus (Hymenoptera, Braconidae) under laboratory conditions.* - Environmental Entomology, 36: 887-893.
- LUNA M.G., WADA V.I., LA SALLE J., SÁNCHEZ N.E., 2011 – *Neochrysocharis formosa (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae), a newly recorded parasitoid of the Tomato moth, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), in Argentina.* - Neotropical Entomology, 40: 412-414.
- MACISAAC H.J., GRIGOROVICH I.A., RICCIARDI A., 2001 – *Reassessment of species invasion concepts: the Great Lakes basin as a model.* - Biol. Inv., 3: 405-416.
- MASSA B., RIZZO M.C., CALECA V., 2001 – *Natural alternative hosts of Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) parasitoids of the Citrus leafminer Phyllocnistis citrella Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) in the Mediterranean Basin.* - Journal of Hymenoptera Research, 10: 91-100.
- MITCHELL C.E., POWER A.G., 2003 – *Release of invasive plants from fungal and viral pathogens.* - Nature, 421: 625-627.
- MOLLÁ O., ALONSO M., MONTON H., BEITIA F., VERDÚ M.J., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2010 – *Control biológico de Tuta absoluta: catalogación de enemigos naturales y potencial de los miridos depredadores como agentes de control.* - Phytoma España, 217: 42-47.
- NOYES J.S., 2003 – *Universal Chalcidoidea Database.- World Wide Web electronic publication.* [online] URL: <http://www.nhm.ac.uk/entomology/chalcids/index.html>.
- ORTU S., FLORIS I., 1989 – *Indagine preliminari per il controllo di Phthorimaea operculella su coltivazioni di patata in Sardegna.* - La Difesa delle Piante, 12: 81-88.
- PARENTI U., BERGAMASCO P., SCARAMOZZINO P. L., VARALDA P. G., 1995 – *Limitatori naturali degli Elachistidae (Lepidoptera).* - Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, 13: 45-76.
- PUCCI C., SPANEDDA A.F., MINUTOLI E., 2003 – *Field study of parasitism caused by endemic parasitoids and by the exotic parasitoid Copidosoma koehleri on Phthorimaea operculella in Central Italy.* - Bulletin of Insectology, 56: 221-224.
- RIZZO M.C., 1999 – *Entomofauna della flora sinantropica e relazioni con quella di alcuni agroecosistemi.* - Tesi di dottorato in Entomologia Agraria, XII ciclo: 82 pgg.
- RIZZO M.C., MARGIOTTA V., CALECA V., 2011 – *Necremnus arynes parassitoide di Tuta absoluta su pomodoro, melanzana e Solanum nigrum in serra a conduzione biologica.* - Atti del Congresso Nazionale di Entomologia, 2011, pg. 357.
- SILVA G.A., PICANÇO M.C., BACCI L., CRESPO A.L., ROSADO J.F., GUEDES R.N.C., 2011 – *Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, Tuta absoluta.* - Pest Management Science, 67: 913-920.
- SIMBOLOTTI G., VAN ACHTERBERG C., 1999 – *Revision of the West Palaearctic species of the genus Agathis Latreille (Hymenoptera: Braconidae).* - Zoologische Verhandelingen Leiden, 325: 3-167.
- SIQUEIRA H.A.A., GUEDES R.N.C., PICANÇO M.C., 2000 – *Insecticide resistance in populations of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae).* - Agricultural and Forest Entomology, 2: 147-153.
- TORCHIN M.E., LAFFERTY K.D. & KURIS A.M., 2002 – *Parasites and marine invasions.* - Parasitology, 124: S137-S151.
- TORCHIN M.E., LAFFERTY K.D., DOBSON A.P., MCKENZIE V.J., KURIS A.M., 2003 – *Introduced species and their missing parasites.* - Nature, 421: 628-630.

- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., COLOMBO A., CAMPO G., 2009 – *Rinvenuta in Sicilia Tuta absoluta*. - L'Informatore Agrario, 65: 71.
- URBANEJA A., LLÁCER E., TOMÁS O., GARRIDO A., JACAS J.A., 2000 – *Indigenous natural enemies associated with Phyllocnistis citrella (Lepidoptera: Gracillariidae) in Eastern Spain*. - Biol. Control, 18: 199-207.
- VERCHER R., COSTA-COMELLES J., MARZAL C., GARCÍA-MARÍ F., 2005 – *Recruitment of native parasitoid species by the invading leafminer Phyllocnistis citrella (Lepidoptera: Gracillariidae) on citrus in Spain*. - Environ. Entom., 34: 1129-1138.
- VIGGIANI G., FILELLA F., DELRIO G., RAMASSINI W., FOXI C., 2009 – *Tuta absoluta, nuovo lepidottero segnalato anche in Italia*. - L'Informatore Agrario, 65: 66-68.
- VITOUSEK P.M., D'ANTONIO C.M., LOOPE L.L., WESTBROOKS R., 1996 – *Biological invasions as global environmental change*. - Am. Sci., 84: 218-228.
- YU D.S.K., VAN ACHTERBERG C., 2010 – *Taxapad Ichneumonoidea (May 2009 version)*. - In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist* (Bisby F. A., Roskov Y. R., Orrell T. M., Nicolson D., Paglinawan L. E., Bailly N., Kirk P. M., Bourgoin T., Baillargeon G., Eds). - DVD, Species 2000, Reading, UK.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P., RAPISARDA C., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012 – *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta in Southern Italy*. - Bulletin of Insectology 65: 51-61.

ADATTAMENTO DI LIMITATORI INDIGENI DI *TUTA ABSOLUTA* IN ITALIA: IL PARASSITOIDE *BRACON NIGRICANS*

LUCIA ZAPPALÀ (*) - ANTONIO BIONDI (*) (**) - GAETANO SISCARO (*)
GIOVANNA TROPEA GARZIA (*) - KEES VAN ACHTERBERG (***) - NICOLAS DESNEUX (**)

(*) Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Catania, Italy; e-mail: lzappala@unict.it

(**) French National Institute for Agricultural Research (INRA), Sophia-Antipolis, France.

(***) Department of Terrestrial Zoology, Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis, Leiden, The Netherlands

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 febbraio 2012.

Adaptation of indigenous parasitoids to Tuta absoluta in Italy: the parasitic wasp Bracon nigricans

During the years following the first report in Italy of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), several indigenous generalist parasitoids have been recorded on this new host. Among these, only a few have been identified as potential biological control agents for the pest. In particular, the parasitoid *Bracon nigricans* Szépligeti (Hymenoptera: Braconidae), widely distributed in the whole Palaearctic region, has been largely found on the invasive moth. Data on *B. nigricans* biological traits on *T. absoluta* are here reported. Laboratory trials have been conducted to define the parasitoid host stage preference, its life tables, the young instars developmental time, its longevity, its reproductive behaviour, its progeny sex-ratio, the wasp host-killing activity, the effect of the host density on the parasitoid fecundity, fertility and biocontrol activity and the effect of a sugary-proteic diet on the adults performance. *Bracon nigricans* proved to be an idiobiont, synovigenic, gregarious, ectoparasitoid of *T. absoluta* 3rd and 4th instar larvae, with a slightly male-biased sex-ratio. Female wasps showed behavioural plasticity in host use, as initial host paralysis was followed by either host-feeding, oviposition or a rejection of the host. This led to high mortality rate in the exposed hosts (around 70%). While, only 33% of the laid parasitoid eggs reached adulthood, suggesting that the exotic moth showed only a partial suitability for the endemic parasitoid development. Although further field studies are needed, data obtained under laboratory conditions suggest that *B. nigricans* could be considered as a potential biological control agent of *T. absoluta* in the newly invaded areas.

KEY WORDS: Biology behaviour, Host-feeding, Life tables, Biological control, Tomato.

INTRODUZIONE

Il successo dell'insediamento di specie esotiche in aree di nuova colonizzazione è legato a una maggiore competitività rispetto alle specie indigene, nonché al ridotto controllo da parte degli agenti biotici di contenimento (GRABENWEGER *et al.*, 2010). Nelle aree di nuova colonizzazione, infatti, il numero dei nemici naturali presenti può essere ridotto, così come la loro efficacia nel contenimento delle specie esotiche. È altresì necessario tenere in considerazione che gli entomofagi indigeni necessitano tempo per adattarsi e controllare efficacemente le specie esotiche. Sono noti numerosi esempi di specie invasive su cui si sviluppa un ridotto numero di parassitoidi indigeni, per lo più costituiti da idiobionti che non devono adattarsi alla fisiologia del proprio ospite e possono pertanto spostarsi facilmente su nuovi ospiti (ASKEW e SHAW, 1986), assicurando in alcuni casi, un efficace controllo dei fitofagi (GODFRAY *et al.*, 1995; URBANEJA *et al.*, 2000). La

maggior parte di questi esempi, ovvero i fitofagi più vulnerabili, è rappresentata da specie endofitiche (GIRARDOZ *et al.*, 2006). La conoscenza della composizione e del ruolo dei fattori biotici di controllo e delle strategie per preservarli, è pertanto considerata una priorità nella messa a punto di efficaci strategie di controllo di fitofagi esotici (VAN LENTEREN e WOETS, 1988).

Il contesto nel quale si inserisce questo lavoro è quello dello studio della composizione del complesso parassitario in fase di adattamento al fitofago esotico delle Solanacee *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), nelle aree di nuova colonizzazione, e l'individuazione di potenziali agenti di controllo biologico¹. Diverse specie indigene di predatori e parassitoidi generalisti sono state trovate svilupparsi a carico di *T.*

¹ I risultati dello studio sui parassitoidi indigeni adattatisi a *T. absoluta* sono stati presentati, nel medesimo incontro, da M. Giorgini. Il suo contributo è pubblicato in questo stesso volume.

absoluta nel bacino del Mediterraneo e il loro ruolo come fattori di contenimento delle popolazioni del fitofago è ancora in corso di definizione (DESNEUX *et al.*, 2010; GABARRA & ARNÓ, 2010; MOLLÁ *et al.*, 2010; DO ANLAR & YI IT, 2011; LONI *et al.*, 2011; AL-JBOORY *et al.*, 2012; CHAILLEUX *et al.*, 2012; FERRACINI *et al.*, 2012; URBANEJA *et al.*, 2012; ZAPPALÀ *et al.*, 2012a). Tra questi si inserisce *Bracon* (*Habrobracon*) *nigricans* Szépligeti (= *concolorans* Marshall; *concolor* Thomson; *mongolicus* Telenga) (Hymenoptera: Braconidae), ectoparassitoide larvale a distribuzione Palearctica, già segnalato su diverse specie di Lepidotteri (YU & VAN ACHTERBERG, 2010). Tra i suoi ospiti se ne annoverano alcuni d'interesse applicato, quali ad esempio la tignola della patata, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), sulla quale il braconide era già stato rinvenuto in Sardegna (ORTU & FLORIS, 1989).

Bracon nigricans è stato recentemente segnalato per la prima volta in associazione con *T. absoluta* in Sicilia (ZAPPALÀ *et al.*, 2012a) e successivamente in Spagna (URBANEJA *et al.*, 2012) e in Giordania (AL-JBOORY *et al.*, 2012). Al fine di stabilire le potenziali capacità di controllo biologico di questa specie, sono stati avviati studi volti ad acquisire conoscenze di base sulla sua biologia e sulla sua strategia riproduttiva a carico del nuovo ospite (BIONDI *et al.*, 2012a). A tal fine sono state condotte prove di laboratorio atte a definire: (i) la preferenza per lo stadio dell'ospite in condizioni di scelta; (ii) le tavole di sopravvivenza e di durata dello sviluppo degli stadi giovanili; (iii) la longevità, la riproduzione degli adulti e la *sex-ratio* della loro progenie; (iv) l'attività di *host-killing* di tipo sia riproduttivo che non; (v) l'effetto della densità dell'ospite sulla fecondità, sulla fertilità e sull'attività di biocontrollo espressa in termini di ospiti uccisi e (vi) l'effetto di un nutrimento artificiale zuccherino-proteico nelle *performance* degli adulti.

ALLEVAMENTO DEGLI INSETTI

I ceppi del fitofago, *T. absoluta*, e del parassitoide, *B. nigricans*, sono stati ottenuti durante campionamenti condotti in coltivazioni commerciali di

pomodoro in pieno campo in Sicilia orientale, in agosto 2010 (ZAPPALÀ *et al.*, 2012a). Gli insetti utilizzati per la realizzazione dei biosaggi sono stati mantenuti su ospite vegetale naturale (piante di pomodoro cv. Marmande), all'interno di gabbie con una struttura in PVC ricoperta di rete anti-insetto, in condizioni ambientali controllate (25 ± 1 °C; $60 \pm 10\%$ U.R. e un fotoperiodo di 14L:10D). Le stesse condizioni sono state mantenute durante lo svolgimento di tutti i biosaggi.

PREFERENZA PER LO STADIO DELL'OSPITE

Al fine di stabilire lo stadio del fitofago preferito da *B. nigricans*, è stato condotto un esperimento in condizioni di scelta esponendo 5 esemplari di ciascuno degli stadi preimmaginali di sviluppo di *T. absoluta* (uova, L1, L2, L3, L4 e crisalidi) a una femmina e due maschi neo-sfarfallati (≤ 48 ore) di *B. nigricans* per 72 h. Il biosaggio è stato effettuato all'interno di piastre Petri (130 mm di diametro) dotate nella parte superiore di un'apertura coperta con rete a maglia fine per assicurare un'adeguata areazione dell'arena sperimentale. All'interno della stessa venivano anche poste microgocce di miele e sei foglioline, appena recise, di pomodoro. Al termine del periodo di esposizione sono stati registrati il numero di esemplari parassitizzati, divisi per stadio di sviluppo, e il numero di uova deposte per ciascuno stadio parassitizzato.

I risultati ottenuti hanno messo chiaramente in evidenza che l'attività di ovideposizione è significativamente influenzata dallo stadio biologico del fitofago, sia come percentuale di parassitizzazione che come numero medio di uova deposte per stadio. Entrambi tali valori sono risultati significativamente più elevati sulle larve di 3^a e 4^a età (Tab. 1). In particolare, *B. nigricans* ha parassitizzato il 31,98% ($\pm 4,30$) delle larve di 3^a età e il 61,87% ($\pm 4,03$) delle larve di 4^a età; significativamente inferiore è stata la parassitizzazione sulle larve di 2^a età ($6,15 \pm 2,71\%$) e nessuna attività è stata invece registrata su uova, larve di 1^a età e crisalidi (Tab. 1). Il numero medio di uova deposte per stadio parassitizzato è stato pari a 0,36 ($\pm 0,15$) sulle L2, 1,11 ($\pm 0,06$) sulle L3 e 1,78 ($\pm 0,20$) sulle L4 (Tab. 1).

Tabella 1 – Preferenza per lo stadio dell'ospite: Percentuale di stadi parassitizzati e numero di uova deposte nei vari stadi dell'ospite (media $\pm$ ES) da parte di femmine di *Bracon nigricans* in condizioni di scelta.

	Uova	L1	L2	L3	L4	crisalidi
Percentuale ospiti parassitizzati	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,15 $\pm$ 2,71	31,98 $\pm$ 4,30	61,87 $\pm$ 4,03	0,00 $\pm$ 0,00
Numero uova deposte per stadio	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,36 $\pm$ 0,15	1,11 $\pm$ 0,06	1,78 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00

TAVOLE DI SOPRAVVIVENZA DEGLI STADI
PREIMMAGINALI

Il tempo di sviluppo e la sopravvivenza degli stadi giovanili di *B. nigricans* sono stati studiati seguendo lo sviluppo di uova deposte di recente (≤ 6 ore) fino allo sfarfallamento degli adulti. Quaranta femmine coetanee (10 giorni dal loro sfarfallamento), fecondate e con esperienza di ovideposizione, sono state poste singolarmente in piastre Petri da 2,5 cm di diametro insieme a una larva di 4^a età di *T. absoluta* (che è risultato lo stadio preferito dal parassitoide in base alle osservazioni precedenti) e alcune microgocce di miele. Prima dell'esposizione all'attività parassitaria, le larve dell'ospite sono state precedentemente pesate ($3,583 \pm 0,092$ mg in media; min: 3 mg; max 4 mg), considerato che il peso dell'ospite può significativamente influenzare lo sviluppo degli stadi giovanili del parassitoide (HARDY *et al.*, 1992). Dopo 6 ore di parassitizzazione le femmine venivano spostate in una nuova piastra Petri con una nuova larva, mentre le larve parassitizzate che presentavano 1 e 2 uova di *B. nigricans* venivano isolate per la prova. La decisione di scegliere questa dimensione di gruppo di uova deposte in un singolo evento (*clutch*) è stata presa in conformità a prove preliminari da cui è risultato che il numero medio di uova deposte dalle femmine di *B. nigricans* per ciascuna larva di *T. absoluta* è pari a circa 1,5 (BIONDI & ZAPPALÀ, dati non pubblicati). Pertanto sono stati isolati 50 *clutch* composti da un solo uovo e 50 *clutch* composti da 2. Il tempo di sviluppo e la sopravvivenza delle uova, delle larve e delle pupe sono stati controllati registrati a intervalli di 6 ore fino allo sfarfallamento degli adulti.

Lo sfarfallamento degli adulti di *B. nigricans* da uova neo-deposte è avvenuto dopo $269,65 \pm 2,70$ e $270,67 \pm 7,32$ ore (circa 11 giorni) per femmine e maschi rispettivamente, senza differenze significative tra i sessi (Tab. 2). Allo stesso modo nessuna differenza significativa tra i due sessi è stata rilevata nella durata dello sviluppo dei singoli stadi. In questa prova sono stati ottenuti 56 adulti in totale, di cui 22 femmine e 34 maschi, con una *sex-ratio* pertanto pari a 0,60 maschi/tot. Il tasso totale di sopravvivenza degli stadi giovanili (da uovo ad adulto) di *B. nigricans* su larve di 4^a età di *T. absoluta* è risultato pari a $37,4 \pm 4,11$ %. La quota di mortalità più elevata è stata registrata allo stadio larvale, quando solo il $42,63 \pm 4,49$ % delle larve è sopravvissuto. Differentemente, la quota di schiusura delle uova è stata dell' $86,4 \pm 2,90$ % mentre si sono ottenuti sfarfallamenti di adulti dal $98,11 \pm 1,88$ % delle pupe. Nonostante questa prova sia stata condotta utilizzando lo stadio dell'ospite pre-

Tabella 2 – Tavole di sopravvivenza delle forme giovanili: Tempo di sviluppo, in ore, dei diversi stadi giovanili maschili e femminili (media $\pm$ ES) di *Bracon nigricans*.

	Femmine	Maschi
Uovo	$27,35 \pm 1,01$	$27,83 \pm 0,83$
Larva	$68,50 \pm 5,26$	$72,73 \pm 4,10$
Pupa	$173,80 \pm 4,41$	$175,17 \pm 6,43$
Totale	$269,65 \pm 2,70$	$270,67 \pm 7,32$

ferito dal parassitoide e selezionando le più comuni dimensioni del *clutch*, ulteriori prove dovrebbero essere condotte per valutare il ruolo della dimensione dell'ospite e del *clutch* nello sviluppo del parassitoide (HARDY *et al.*, 1992).

Il successo dell'attività parassitaria, dopo l'accettazione dell'ospite e pertanto lo sviluppo larvale del parassitoide, può dipendere da molteplici fattori fisiologici e genetici. Solitamente le interazioni tra parassitoide e ospite sono mediate da prodotti genici che le femmine del parassitoide iniettano nella vittima al momento dell'ovideposizione o che la progenie produce durante il suo sviluppo (PENNACCHIO & STRAND, 2006). Queste peculiari componenti inducono complesse alterazioni fisiologiche nell'ospite, in particolare a carico del suo sistema immunitario, favorendo lo sviluppo del parassitoide. Tali fattori sono molto studiati nel caso degli endoparassitoidi e, nonostante lo siano molto meno per gli ectoparassitoidi (PENNACCHIO & STRAND, 2006), il ridotto sviluppo larvale registrato nelle prove condotte suggerisce di interpretare le interazioni ospite/parassitoide anche in una prospettiva coevolutiva. In particolare, la mancanza di coevoluzione nel complesso *T. absoluta*-pomodoro e *B. nigricans* potrebbe giustificare l'assenza dei suddetti meccanismi e pertanto il ridotto sviluppo larvale. Un altro fattore che potrebbe avere influito sullo sviluppo larvale del parassitoide è la potenziale presenza di sostanze tossiche all'interno delle larve ospiti (DESNEUX *et al.*, 2009). In particolare, alcuni metaboliti secondari presenti nelle solanacee sono ben noti per le loro proprietà insetticide (NENAAH, 2011) e alcuni di questi potrebbero essere sequestrati dalla larve di *T. absoluta* e così veicolati indirettamente alle larve del parassitoide.

TAVOLE DI SOPRAVVIVENZA DEGLI ADULTI

Valori età-specifici di sopravvivenza, attività riproduttiva e di biocontrollo delle femmine del parassitoide sono stati studiati a temperatura costante (25 ± 1 °C). I valori giornalieri di riproduzione e di mortalità indotta nell'ospite non legata

ad attività riproduttiva (*host-stinging* e *host-feeding* non seguiti da ovideposizione) sono stati registrati su 15 femmine neo-sfarfallate (<12 ore) poste a contatto con 5 larve mature di *T. absoluta* ogni 24 ore in piastre Petri da 90 mm di diametro in presenza di microgocce di miele e foglioline di pomodoro appena recise. Per assicurare che le femmine fossero fecondate e si accoppiassero per l'intera durata della vita, per ogni femmina venivano aggiunti 2 maschi, che venivano rimpiazzati con altri maschi neosfarfallati ogni settimana. Giornalmente venivano registrati: (i) il numero di larve uccise e non parassitizzate, (ii) il numero di larve parassitizzate (cioè quelle che presentavano sul loro corpo o all'interno della propria mina almeno un uovo), (iii) il numero di uova deposte, (iv) la dimensione del *clutch* e (iv) la sopravvivenza del parassitoide. Gli esemplari sopravvissuti erano poi trasferiti in piastre con nuove larve, mentre le larve precedentemente esposte venivano allevate fino allo sfarfallamento degli adulti per registrare numero e *sex-ratio* della progenie del parassitoide. Inoltre, per valutare se il contatto con l'ospite e pertanto l'attività di *host-feeding* potesse avere un'influenza sulla longevità delle femmine di *B. nigricans*, questa, oltre che nella prova sopra descritta, è stata misurata anche in assenza delle larve ospiti. Venti femmine e venti maschi neosfarfallati (<12 ore) sono stati isolati singolarmente all'interno di tubi in vetro (185 mm di lunghezza e 25 mm di diametro), chiusi con tappi in cotone e provvisti di microgocce di miele rinnovate ogni 5 giorni, quindi la sopravvivenza è stata registrata giornalmente.

Le femmine di *B. nigricans* hanno fatto registrare, come la maggior parte dei parassitoidi sinovigenici (JERVIS *et al.*, 2001), un breve periodo di pre-ovide-

posizione della durata media di $1,27 \pm 0,3$ giorni che rappresenta solo una minima parte dell'intera durata della vita. Il periodo di ovideposizione è durato $37,60 \pm 3,25$ giorni con una media di $1,66 \pm 0,14$ uova (min 0, max 8) deposte per femmina per giorno. Un totale di $82,8 \pm 7,81$ uova (min 48, max 127) sono state deposte da una femmina nel corso dell'intera vita. I valori medi di ovideposizione giornaliera sono risultati variabili tra 0 e $3,6 \pm 0,55$ uova deposte/femmina il 18° giorno, mentre il picco di sfarfallamenti ($1,7 \pm 0,43$ adulti/femmina/giorno), è stato registrato nel caso delle femmine di 16 giorni di età. La progenie prodotta lungo l'intero corso della vita è stata pari a $29,79 \pm 3,01$ (min 13, max 40) adulti/femmina, con una *sex-ratio* di $0,63 \pm 0,05$ maschi sfarfallati sul totale della progenie. L'attività di ovideposizione di *B. nigricans* è risultata irregolare e tale andamento potrebbe essere legato all'oogenesi nelle specie sinovigeniche con uova anidropiche, come la congenere *B. hebetor* (Say) le cui femmine hanno un corto ovidotto e ovari provvisti di pochi ovaroli che non sono in grado di contenere un ampio numero di uova grandi e ricche di tuorlo (JERVIS & KIDD, 1986).

Il numero di uova deposte per ospite parassitizzato è risultato uniforme nel corso della vita, con un livello di gregarismo (media generale $1,52 \pm 0,07$; max 5 uova deposte/ospite parassitizzato) non differente in maniera significativa tra le settimane di vita delle femmine (Tab. 3). Dai risultati ottenuti dalle suddette prove emerge che le femmine di *B. nigricans*, a densità costanti dell'ospite, non modificano la dimensione del *clutch* in funzione della loro età e pertanto del loro carico di uova, mentre quando il carico di uova è massimo, esso viene suddiviso tra un numero più elevato di ospiti, aumentando così il numero di larve parassi-

Tabella 3 – Tavole di sopravvivenza degli adulti: Medie settimanali ($\pm$ ES) dei valori età specifici dei parametri biologici di femmine di *Bracon nigricans*.

	1ª settimana	2ª settimana	3ª settimana	4ª settimana	5ª settimana	6ª settimana	7ª settimana
N. medio uova deposte giorno/femmina	$1,95 \pm 0,27$	$2,35 \pm 0,54$	$2,51 \pm 0,18$	$2,27 \pm 0,32$	$1,72 \pm 0,36$	$0,91 \pm 0,20$	$0,40 \pm 0,21$
N. medio uova deposit /ospite parassitizzato (grado di gregarismo)	$1,62 \pm 0,11$	$1,39 \pm 0,12$	$1,54 \pm 0,08$	$1,54 \pm 0,12$	$1,52 \pm 0,11$	$1,28 \pm 0,11$	$1,63 \pm 0,06$
N. medio progenie prodotta/giorno/femmina	$0,37 \pm 0,08$	$0,85 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,1$	$0,87 \pm 0,13$	$0,63 \pm 0,13$	$0,38 \pm 0,09$	$0,09 \pm 0,05$
% ospiti parassitizzati	$24,38 \pm 2,63$	$29,14 \pm 4,82$	$35,84 \pm 2,74$	$30,98 \pm 4,14$	$21,32 \pm 4,57$	$12,86 \pm 2,42$	$4,93 \pm 2,52$
% ospiti paralizzati	$46,48 \pm 2,45$	$47,62 \pm 4,02$	$43,75 \pm 3,83$	$45,46 \pm 4,24$	$33,96 \pm 6,34$	$34,00 \pm 3,39$	$22,12 \pm 4,95$
<i>Sex-ratio</i> media della progenie (mm/totale)	$0,94 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,04$	$0,62 \pm 0,08$	$0,59 \pm 0,10$	$0,63 \pm 0,11$	$0,54 \pm 0,14$	$0,52 \pm 0,02$
Media della sopravvivenza degli stadi giovanili della progenie	$13,82 \pm 2,23$	$32,29 \pm 3,09$	$36,96 \pm 3,73$	$35,57 \pm 4,33$	$32,44 \pm 6,00$	$22,22 \pm 5,07$	$12,78 \pm 0,73$

tizzate nel periodo di maggiore produzione delle uova. Infatti, i valori settimanali di ospiti parassitizzati hanno raggiunto il loro massimo quando il carico di uova da deporre era altrettanto elevato, cioè nel corso della 3^a settimana ($35,83 \pm 2,73$ %) con dati significativamente differenti se confrontati con quelli registrati nelle ultime 2 settimane (Tab. 3). Questi risultati sono da mettere in relazione soprattutto con la fase di senescenza riproduttiva delle femmine i cui ovarii non presentano più oociti (MANGEL & HEIMPEL, 1998). In realtà, è stato registrato un periodo di post-ovideposizione della durata di $3,67 \pm 0,6$ giorni.

Sia il numero di uova deposte che la progenie prodotta per settimana hanno seguito questo andamento ed entrambi i valori sono risultati significativamente differenti tra le settimane (Tab. 3). In particolare, la massima attività riproduttiva è stata registrata nella 3^a settimana, con una media di $2,51 \pm 0,18$ uova deposte/femmina/giorno e $1,00 \pm 0,13$ progenie prodotta/femmina/giorno (Tab. 3).

La *sex-ratio* della progenie ha fatto registrare differenze statisticamente significative tra le settimane di vita delle femmine. In particolare i suoi valori sono variati tra $0,94 \pm 0,03$ e $0,52 \pm 0,02$ maschi sfarfallati/progenie totale (Tab. 3). Ciò suggerisce che le femmine di *B. nigricans* presentano partenogenesi arrenotoca e che le uova deposte nei primi giorni di ovideposizione sono aploidi (non fecondate), dato che le femmine necessitano di tempo per accoppiarsi con successo dopo il loro sfarfallamento. Inoltre, la *sex-ratio* della progenie totale è risultata lievemente sbilanciata a favore dei maschi ($0,62 \pm 0,05$ maschi/progenie totale). Ciò può essere spiegato col fatto che, così come si osserva in molte specie di braconidi, le uova non fecondate danno origine a maschi aploidi, mentre le fecondate (diploidi) possono svilupparsi in maschi o femmine. Inoltre, l'aplodiploidia è associata ad un meccanismo genetico tipico di molti Imenotteri i quali se eterozigoti al locus del sesso si sviluppano come femmine, mentre se omozigoti o emizigoti allo stesso locus si sviluppano come maschi diploidi e aploidi (HEIMPEL & DE BOER, 2008). Ciò comporta che a maggiori livelli di eterozigosi, generalmente presenti nelle popolazioni naturali, corrisponde una *sex-ratio* a favore delle femmine, mentre al contrario nelle popolazioni ottenute da allevamenti, come nel caso di questo studio, alti livelli di inbreeding portano all'incremento della quota di maschi nella popolazione (HEIMPEL *et al.*, 1999; BIONDI *et al.*, 2012a). Inoltre, numerosi sono i casi noti di ridotta o nulla sopravvivenza di maschi diploidi, come riscontrato per esempio in diverse specie del genere *Bracon* (HOLLOWAY *et al.*, 1999). Pertanto, la

ridotta *fitness* dei maschi diploidi di *B. nigricans* dovrebbe essere ulteriormente indagata per spiegare la sua *sex-ratio*, così come il suo ridotto tasso di sviluppo da uovo ad adulto.

Le osservazioni giornaliere sulle uova deposte e sugli adulti di conseguenza sviluppati hanno mostrato che, nonostante la media generale della percentuale di adulti sfarfallati per uova deposte nel corso dell'intera vita ($32,11 \pm 3,43$ %) fosse simile a quella ottenuta nella prova sullo sviluppo delle forme pre-immaginali, questo valore è risultato fortemente legato all'età della madre. In particolare, le percentuali della 1^a e della 7^a settimana ($13,82 \pm 2,23$ % e $12,78 \pm 0,73$ %, rispettivamente) erano significativamente inferiori rispetto alle percentuali di sviluppo osservate nelle altre settimane (Tab. 3). Pertanto, i risultati ottenuti in queste prove dimostrano che le strategie riproduttive delle femmine di *B. nigricans* sono fortemente correlate alla loro età. In tal modo potrebbe spiegarsi la produzione di progenie di scarsa qualità (per esempio uova meno vitali), durante la 1^a e la 7^a settimana. Le giovani femmine di *B. nigricans*, come la maggioranza degli Imenotteri sinovigenici, hanno necessità di alimentarsi sull'ospite per allocare risorse nutritive nei processi riproduttivi e pertanto la progenie prodotta inizialmente potrebbe essere di qualità inferiore rispetto a quella delle femmine con esperienza (JERVIS & KIDD, 1986). La produzione di progenie di qualità ridotta prima della limitazione nella dotazione di uova della madre (*senescenza riproduttiva*) è già documentata per altre specie di braconidi (MANGEL & HEIMPEL, 1998).

Un'altra ipotesi per spiegare questo risultato è il compromesso riproduttivo della madre tra *host-feeding* e ovideposizione; in altri termini, a causa di esigenze nutrizionali maggiori, le femmine giovani e vecchie possono praticare più *host-feeding*, nonché quest'ultimo associato a ovideposizione sullo stesso ospite. Infatti, nella maggioranza dei sistemi ospite-parassitoide, le punture di alimentazione sull'ospite sono di tipo distruttivo, cioè uccidono l'ospite e lo rendono inadatto alla ovideposizione, mentre in altri sistemi, come in quello *B. nigricans*/*T. absoluta*, i singoli ospiti possono sostenere sia parassitizzazione che punture di alimentazione (JERVIS & KIDD, 1986).

Le femmine di *B. nigricans* uccidono le larve dell'ospite con una iniezione di veleno che causa, dopo pochi secondi, una paralisi permanente. Dopo questa immobilizzazione dell'ospite, le femmine hanno mostrato un'intensa attività di *host-stinging* seguita da ovideposizione o da *host-feeding*. Quest'ultima attività da parte di *B. nigricans* è stata provata dalla presenza di "tubi di alimentazione" costruiti dalla femmine del parassitoide

(BIONDI, osservazione personale). È ben noto che le sostanze ottenute a seguito delle punture di alimentazione sono utilizzate per maturare le uova e, senza eccezioni, le specie che si nutrono allo stadio adulto sull'ospite sono sinovigeniche (JERVIS & KIDD, 1986).

Grazie a questa attività di *host-killing* di tipo non riproduttivo, le femmine di *B. nigricans* hanno ucciso nel corso della vita una media di $87,40 \pm 8,46$ (min 55; max 123) larve dell'ospite, mentre il valore medio giornaliero era $2,01 \pm 0,09$ (min 0; max 5) larve uccise/femmina (40% degli ospiti esposti). Il periodo di *host-killing* ha avuto durata pari a $39,70 \pm 3,43$ giorni, e ciò indica che le femmine hanno continuato a uccidere ospiti anche dopo la fine del periodo di ovideposizione. La stessa attività post-riproduttiva era già stata osservata anche su *B. hebetor* (JERVIS *et al.*, 1994).

I valori settimanali di larve ospiti paralizzate sono risultati significativamente differenti tra le prime quattro settimane e le ultime tre, con i primi più alti dei secondi. In particolare, le percentuali di larve paralizzate sono variate tra $47,62 \pm 4,02$ % e $22,12 \pm 4,95$ % nella seconda e nell'ultima settimana, rispettivamente. La quota di ospiti paralizzati e non parassitizzati potrebbe essere anche dovuta a una strategia per controllare la densità del fillominatore sul vegetale ospite in modo tale da assicurare che una fogliolina contenente una larva parassitizzata non rischi di andare perduta a seguito dell'attività trofica delle larve non parassitizzate che si alimentano sullo stesso substrato (PATEL *et al.*, 2003). È evidente che, un eccesso di attività trofica sulle foglie può causare disseccamento, necrosi e abscissione delle foglioline, causando in tal modo una potenziale riduzione della sopravvivenza delle larve del parassitoide. Un'altra possibile causa di questo comportamento è che le femmine del parassitoide uccidano più larve per fornire una riserva alimentare per attività riproduttiva futura e/o per la progenie, ovvero per le larve del parassitoide in corso di sviluppo (LAUZIÈRE *et al.*, 1999).

Il tempo necessario per raggiungere il 50% di mortalità degli adulti del parassitoide (LT_{50}) è risultato pari a 44,5 e 45 giorni per le femmine in contatto con larve dell'ospite nelle piastre Petri e per quelle mantenute nei tubi in vetro senza ospite, rispettivamente. La sopravvivenza media è di $41,47 \pm 2,42$ giorni per le femmine con ospite e miele, e $42,75 \pm 2,28$ per le femmine alimentate solo con miele, senza differenze significative tra i trattamenti. Al contrario sono state rilevate differenze significative di longevità tra maschi e femmine mantenuti all'interno dei tubi in vetro; in particolare la longevità dei maschi alimentati solo con miele è stata di $27,20 \pm 2,39$ (min 10, max 47) giorni, con una LT_{50} di 27 giorni.

Il contributo dei regimi alimentari alla sopravvivenza è ben documentato per numerose specie di parassitoidi in condizioni di laboratorio (JERVIS *et al.*, 2001), e mentre una correlazione positiva tra *host-feeding* e fecondità sembra essere distribuita in maniera omogenea tra le specie di parassitoidi, lo stesso *host-feeding* può avere un effetto positivo o nessun effetto sulla longevità (HEIMPEL & COLLIER, 1996). Nelle prove condotte, l'*host-feeding* non presenta vantaggi per le femmine di *B. nigricans* in termini di longevità quando un'altra fonte alimentare (nello specifico miele) è contestualmente disponibile.

EFFETTO DELLA DENSITÀ DELL'OSPITE E DELL'ALIMENTO

Al fine di valutare l'eventuale risposta funzionale del parassitoide all'aumentare della densità dell'ospite parassitizzabile nonché l'effetto della presenza di un addizionale apporto zuccherino-proteico (Protonectar®, Lega Italia) sulla *fitness* delle femmine, 10 femmine neo sfarfallate di *B. nigricans* per ciascun biosaggio sono state singolarmente esposte, per l'intera durata della vita, a tre diverse densità dell'ospite (10, 20 e 40 larve) e a 10 larve con e senza la presenza dell'alimento artificiale, rispettivamente. Le larve utilizzate per questi biosaggi erano di 3^a e 4^a età, stadi che sono risultati, come già detto, maggiormente parassitizzati nella prova di preferenza per lo stadio dell'ospite. L'arena, le procedure sperimentali e i parametri registrati sono stati gli stessi di quelli descritti in precedenza per lo studio delle tavole di sopravvivenza degli adulti a eccezione del fatto che gli ospiti venivano sostituiti a intervalli regolari di tre giorni.

I risultati ottenuti, hanno evidenziato un effetto significativo dell'alimento zuccherino-proteico sulla longevità sia delle femmine che dei maschi. Un effetto significativo è stato registrato anche sulla mortalità complessivamente indotta nell'ospite, in termini sia di ospiti parassitizzati che di larve paralizzate. Dall'analisi dei dati emerge che il numero di larve paralizzate è più elevato senza nutrimento aggiuntivo rispetto alla quota di larve parassitizzate che è più bassa a causa di una minore disponibilità di uova mature (Tab. 4).

Lo stesso tipo d'influenza dell'alimento è stato riscontrato anche sulla fecondità giornaliera che è risultata più elevata per le femmine con alimento addizionale rispetto a quella delle femmine a cui sono state somministrate solo larve senza alimento aggiuntivo. E le stesse femmine altresì sopravvivono più a lungo, come visto anche in precedenza. Questo effetto è ancora più evidente quando si

Tabella 4 – Effetto dell'alimento: Numero di uova deposte, progenie ottenuta, larve parassitizzate e paralizzante (media $\pm$ ES) da ciascuna femmina di *Bracon nigricans* in presenza o in assenza di alimento aggiuntivo.

	Senza alimento addizionale	Con alimento addizionale
Totale uova deposte/femmina/intera vita	20,33 $\pm$ 2,96	128,70 $\pm$ 23,99
Totale progenie/femmina/intera vita	12,11 $\pm$ 1,81	56,67 $\pm$ 10,90
% larve parassitizzate	34,52 $\pm$ 2,99	49,69 $\pm$ 2,88
Totale larve parassitizzate/femmina/intera vita	17,30 $\pm$ 3,21	62,10 $\pm$ 11,03
% larve paralizzante	46,96 $\pm$ 2,12	37,05 $\pm$ 1,3
Totale larve paralizzante/femmina/intera vita	19,81 $\pm$ 1,45	46,71 $\pm$ 7,77

guarda al numero totale di uova deposte da ciascuna femmina lungo l'intera durata della vita (Tab. 4). Lo stesso effetto è chiaramente emerso sia sulla progenie ottenuta giornalmente per ciascuna femmina che sulla fertilità totale nel corso della vita (Tab. 4).

Le prove volte a valutare gli effetti della densità dell'ospite sul parassitoide hanno mostrato un effetto significativo sulla longevità dei maschi, mentre nessun effetto è stato riscontrato sulla longevità delle femmine nonché sulla fecondità e fertilità del parassitoide che, tuttavia, sono risultate leggermente più elevate a densità crescenti (Tab. 5).

L'effetto della densità dell'ospite è chiaramente evidente quando si osservano sia il numero di larve parassitizzate che quello delle larve paralizzante. Queste ultime in particolare aumentano in misura sensibilmente superiore rispetto alle prime (Tab. 5). Questa risposta funzionale (descrive l'entità di ovideposizione in relazione alla densità dell'ospite e deve essere necessariamente preso in considerazione quando si determina il potenziale di controllo biologico di una nuova specie (SOLOMON 1949; LUNA *et al.*, 2007).

CONCLUSIONI

Bracon nigricans ha dimostrato di essere un ectoparassitoide idiobionte, gregario, con una *sex-ratio* lievemente a favore dei maschi. Tuttavia, questa specie ha fatto registrare una notevole plasticità

comportamentale in rapporto al nuovo ospite *T. absoluta*, considerato che le punture sull'ospite possono o meno essere seguite da *host-feeding* e ovideposizione. Questo braconide è una specie tipicamente sinovigenica e pertanto longeva, capace di riprodursi a basse densità dell'ospite e, producendo uova anidropiche, è in grado di conservare il materiale riproduttivo in funzione della densità dell'ospite (JERVIS *et al.*, 2001). Inoltre, è interessante considerare che le specie sinovigeniche, non essendo limitate da parametri temporali, possono spendere più tempo nelle attività di foraggiamento e di ricerca dell'ospite.

Tutte le caratteristiche biologiche e comportamentali di *B. nigricans*, come emerge dai dati ottenuti nelle prove condotte, indicano che questo parassitoide potrebbe essere efficacemente impiegato per applicazioni di controllo biologico di *T. absoluta*. Tuttavia, prima di poter fare qualunque considerazione sull'efficacia in campo di *B. nigricans*, è necessario indagare su diversi ulteriori elementi che potrebbero fortemente incidere sull'attività di biocontrollo e sulle dinamiche di popolazione del parassitoide in condizioni di campo. Tali parametri sono essenzialmente rappresentati dalle interazioni tra nemici naturali (predatori e parassitoidi) che condividono lo stesso ospite/preda (LUNA *et al.*, 2010, BOMPARD *et al.*, 2012), la capacità di dispersione (SÁNCHEZ *et al.*, 2009; ZAPPALÀ *et al.*, 2012b), gli effetti letali e sub letali dei pesticidi (DESNEUX *et al.*, 2007; BIONDI *et al.*, 2012b; LU *et al.*, 2012), le condizioni agronomiche

Tabella 5 – Effetto della densità dell'ospite: Numero di uova deposte, progenie ottenuta, larve parassitizzate e paralizzante (media $\pm$ ES) da ciascuna femmina di *Bracon nigricans* a diverse densità dell'ospite (10, 20 e 40 larve).

	10 ospiti	20 ospiti	40 ospiti
Tot. uova deposte/femmina/intera vita	128,70 $\pm$ 23,99	141,51 $\pm$ 21,83	160,90 $\pm$ 12,00
Tot. progenie/femmina/intera vita	56,67 $\pm$ 10,90	82,5 $\pm$ 13,24	91,60 $\pm$ 0,48
% larve parassitizzate	49,69 $\pm$ 2,88	32,95 $\pm$ 3,54	18,52 $\pm$ 1,62
Tot. larve parassitizzate/femmina/intera vita	62,10 $\pm$ 11,03	82,20 $\pm$ 10,94	101,06 $\pm$ 6,63
% larve paralizzante	37,05 $\pm$ 1,3	32,99 $\pm$ 2,27	22,07 $\pm$ 0,87
Tot. larve paralizzante/femmina/intera vita	46,71 $\pm$ 7,77	89,60 $\pm$ 13,51	186,20 $\pm$ 12,73

(DESNEUX & RAMIREZ-ROMERO, 2009) e i livelli di biodiversità funzionale presenti all'interno degli agro-ecosistemi nonché nelle loro adiacenze (GARDINER *et al.*, 2009; ZAPPALÀ *et al.*, 2012a).

Negli ultimi anni, una crescente attenzione è stata rivolta al ruolo dei nemici naturali generalisti come regolatori delle popolazioni di fitofagi in agro-ecosistemi. L'impiego di queste specie come agenti biotici di contenimento non è stato efficacemente implementato soprattutto a causa di carenze conoscitive della loro biologia e capacità parassitaria, che costituiscono elementi chiave per il successo di un programma di controllo biologico. I risultati ottenuti in questo studio rappresentano il primo passo verso l'acquisizione di elementi scientifici per un efficace inserimento di *B. nigricans* nei programmi di controllo biologico e integrato di *T. absoluta* in aree di nuova colonizzazione.

RIASSUNTO

Negli anni successivi alla prima segnalazione in Italia della Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), diversi parassitoidi indigeni generalisti sono stati ritrovati su questo nuovo ospite. Tra questi, solo alcuni sono stati identificati come potenziali agenti di controllo biologico del fitofago esotico. In particolare, il parassitoide *Bracon nigricans* Szépligeti (Hymenoptera: Braconidae), distribuito nell'intera regione Paleartica, è stato largamente rinvenuto sul lepidottero esotico. Sono qui riportati dati sulla biologia di *B. nigricans* su *T. absoluta*. Prove di laboratorio sono state condotte per definire la preferenza per lo stadio dell'ospite, le tavole di sopravvivenza e di durata dello sviluppo degli stadi giovanili, la longevità, la riproduzione degli adulti e la *sex-ratio* della loro progenie, l'attività di *host-killing*, l'effetto della densità dell'ospite sulla fecondità, sulla fertilità e sull'attività di biocontrollo nonché l'effetto di un nutrimento artificiale zuccherino-proteico sulle *performance* degli adulti. *Bracon nigricans* è risultato essere un ectoparassitoide idiobionte, gregario e sinovigenico di larve di 3^a e 4^a età di *T. absoluta* con una *sex-ratio* leggermente sbilanciata a favore dei maschi. Le femmine hanno fatto registrare una plasticità comportamentale nell'utilizzazione dell'ospite, testimoniata dal fatto che l'iniziale paralisi dell'ospite fosse seguita da host-feeding, da ovideposizione o da rifiuto dell'ospite. Ciò ha comportato elevati livelli di mortalità negli ospiti esposti (intorno al 70%); mentre solo il 33% delle uova deposte ha raggiunto lo stadio adulto, facendo desumere che il nuovo ospite, *T. absoluta*, non sia pienamente adatto allo sviluppo del parassitoide indigeno. Nonostante siano necessari ulteriori studi in condizioni di campo, i dati ottenuti in laboratorio suggeriscono che *B. nigricans* possa essere considerato un potenziale agente di controllo biologico di *T. absoluta* nelle aree di nuova colonizzazione.

BIBLIOGRAFIA

AL-JBOORY I.J., KATBEH-BADER A., AL-ZAIDI S., 2012 – *First observation and identification of some natural enemies collected from heavily infested tomato by Tuta*

- absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Jordan. Middle East J. Sci. Res., 11: 435-438.
- ASKEW R.R., SHAW S.R., 1986 – *Parasitoid Communities: Their size, structure and development*. pp 225-264. In: *Insect Parasitoids* (Waage J., Greathead D., Eds). - London Academic Press.
- BIONDI A., DESNEUX N., AMIENS-DESNEUX E., SISCARO G., ZAPPALÀ L., 2012a – *Biology and developmental strategies of the Palaearctic parasitoid Bracon nigricans on the Neotropical moth Tuta absoluta*. J. Econ. Entomol., submitted.
- BIONDI A., MOMMAERTS V., SMAGGHE G., VIÑUELA E., ZAPPALÀ L., DESNEUX N., 2012b – *The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods*. Pest Manag. Sci. (in press) DOI: 10.1002/ps.3396.
- BOMPARD A., JAWORSKI C.C., DESNEUX N., 2012 – *Sharing a predator: can an invasive species affect the predation pressure on a local pest?* Popul. Ecol. (in press).
- CHAILLEUX A., DESNEUX N., SEGURET J., THI KHANH H.D., MAIGNET P., TABONE E., 2012 – *Assessing European egg parasitoids as a mean of controlling the invasive South American tomato pinworm Tuta absoluta*. PLoS ONE, 7(10): e48068. doi:10.1371/journal.pone.0048068
- DESNEUX N., BARTA R.J., HOELMER K.A., HOPPER K.R., HEIMPEL G.E., 2009 – *Multifaceted determinants of host specificity in an aphid parasitoid*. - Oecologia, 160: 387-398.
- DESNEUX N., DECOURTYE A., DELPUECH J.M., 2007 – *The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods*. Ann. Rev. Entomol., 52: 81-106.
- DESNEUX N., RAMIREZ-ROMERO R., 2009 – *Plant characteristics mediated by growing conditions can impact parasitoid's ability to attack host aphids in winter canola*. - J. Pest Sci. 82: 335-342.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUYS K.A.G., BURGIO G., ARPAIA S., NARVÁEZ-VASQUEZ C.A., GONZÁLEZ-CABRERA J., CATALÁN RUESCAS D., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control*. - J. Pest Sci., 83: 197-215.
- DOANLAR M., YIIT A., 2011 – *Parasitoid Complex of the Tomato Leaf Miner, Tuta absoluta (Meyrick 1917), (Lepidoptera: Gelechiidae) in Hatay, Turkey*. - KSU J. Nat. Sci., 14: 28-37.
- FERRACINI C., INGEGNO B.L., NAVONE P., FERRARI E., MOSTI M., TAVELLA L., ALMA A., 2012 – *Adaptation of indigenous larval parasitoids to Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy*. - J. Econ. Entomol., 105: 1311-1319.
- GABARRA R., ARNÓ J., 2010 – *Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña*. - Phytoma España, 217: 66-68.
- GARDINER M.M., LANDIS D.A., GRATTON C., DIFONZO C.D., O'NEAL M., CHACON J.M., WAYO M.T., SCHMIDT N.P., MUELLER F.F., HEIMPEL G.E., 2009 – *Landscape diversity enhances biological control of an introduced crop pest in the north-central USA*. - Ecol. Appl., 19: 143-154.
- GIRARDOZ S., KENIS M., QUICKE D.L.J., 2006 – *Recruitment of native parasitoids by an exotic leaf miner, Cameraria ohridella: host-parasitoid synchronization and influence of the environment*. - Agric. For. Entomol., 8: 49-56.
- GODFRAY H.C.J., AGASSIZ D.L.J., NASH D.R., LAWTON

- J.H., 1995 – *The recruitment of parasitoid species to two invading herbivores*. - J. Anim. Ecol., 64: 671-684.
- GRABENWEGER G., KEHRLI P., ZWEIMÜLLER I., AUGUSTIN S., AVTZIS N., BACHER S., FREISE J., GIRARDOZ S., GUICHARD S., HEITLAND W., LETHMAYER C., STOLZ M., TOMOV R., VOLTER L., KENIS M., 2010 – *Temporal and spatial variations in the parasitoid complex of the horse chestnut leafminer during its invasion of Europe*. - Biol. Invasions, 12: 2797-2813.
- HARDY I.C.W., GRIFFITHS N.T., GODFRAY H.C., 1992 – *Clutch size in a parasitoid wasp: a manipulation experiment*. - J. Anim. Ecol., 61: 121-129.
- HEIMPEL G.E., ANTOLIN M.F., STRAND M.R., 1999 – *Diversity of sex-determining alleles in Bracon hebetor*. - Heredity, 82: 282-291.
- HEIMPEL G.E., COLLIER T.R., 1996 – *The evolution of host-feeding behaviour in insect parasitoids*. - Biol. Rev., 71: 373-400.
- HEIMPEL G.E., DE BOER J.G., 2008 – *Sex Determination in the Hymenoptera*. - Annu. Rev. Entomol., 53: 209-30.
- HOLLOWAY A.K., HEIMPEL G.E., STRAND M.R., 1999 – *Survival of diploid males in Bracon sp. near hebetor (Hymenoptera: Braconidae)*. - Ann. Entomol. Soc. Am., 92: 110-116.
- JERVIS M.A., HEIMPEL G.E., FERNS P.N., HARVEY J.A., KIDD N.A.C., 2001 – *Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'*. - J. Anim. Ecol., 70: 442-458.
- Jervis M.A., Kidd N.A.C., 1986 – *Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids*. - Biol. Rev., 61: 395-434.
- JERVIS M.A., KIDD N.A.C., ALMEY H.E., 1994 – *Post-reproductive life in the parasitoid Bracon hebetor (Say) (Hym., Braconidae)*. - J. Appl. Entomol., 117: 72-77.
- LAUZIÈRE I., PÉREZ-LACHAUD G., BRODEUR J., 1999 – *Influence of host density on the reproductive strategy of Cephalonomia stephanoderis, a parasitoid of the coffee berry borer*. - Entomol. Exp. Appl., 92: 21-28.
- LONI A., ROSSI E., VAN ACHTERBERG K., 2011 – *First report of Agathis fuscipennis in Europe as parasitoid of the tomato leafminer Tuta absoluta*. - Bull. Insectol., 64: 115-117.
- LU Y.H., WU K.M., JIANG Y.Y., GUO Y.Y., DESNEUX N., 2012 – *Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services*. - Nature 487: 362-365.
- LUNA M.A.G., SÁNCHEZ N.E., PEREYRA P.C., 2007 – *Parasitism of Tuta absoluta (Lepidoptera, Gelechiidae) by Pseudapanteles dignus (Hymenoptera, Braconidae) under laboratory conditions*. - Environ. Entomol., 36: 887-893.
- LUNA M.A.G., WADA V.I., SÁNCHEZ N.E., 2010 – *Biology of Dineulophus pthorimaeae (Hymenoptera: Eulophidae) and field interaction with Pseudapanteles dignus (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato*. - Ann. Entomol. Soc. Am., 103: 936-942.
- MANGEL M., HEIMPEL G.E., 1998 – *Reproductive senescence and dynamic oviposition behaviour in insects*. - Evol. Ecol. 12, 871-879.
- MOLLÁ O., ALONSO M., MONTON H., BEITIA F., VERDÚ M. J., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2010 – *Control biológico de Tuta absoluta: catalogación de enemigos naturales y potencial de los miridos depredadores como agentes de control*. - Phytoma España, 217: 42-47.
- NENAAH G., 2011 – *Individual and synergistic toxicity of solanaceous glycoalkaloids against two coleopteran stored-product insects*. - J. Pest Sci., 84: 77-86.
- ORTU S., FLORIS I., 1989 – *Indagine preliminare per il controllo di Pthorimaea operculella su coltivazioni di patata in Sardegna*. - La difesa delle piante, 12: 81-88.
- PATEL K.J., SCHUSTER D.J., SMERAGE G.H., 2003 – *Density dependent parasitism and host-killing of Liriomyza trifolii (Diptera: Agromyzidae) by Diglyphus intermedius (Hymenoptera: Eulophidae)*. - Fla. Entomol., 86: 8-14.
- PENNACCHIO F., STRAND M.R., 2006 – *Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera*. - Ann. Rev. Entomol., 51: 233-258.
- SÁNCHEZ N.E., PEREYRA P.C., LUNA M.G.A., 2009 – *Spatial patterns of parasitism of the solitary parasitoid Pseudapanteles dignus (Hymenoptera: Braconidae) on Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Environ. Entomol., 38: 365-374.
- SOLOMON M.E., 1949 – *The natural control of animal populations*. - J. Anim. Ecol., 18: 1-35.
- Urbaneja A., Gonzalez-Cabrera J., Arnò J., Gabarra R., 2012 – *Prospects for the biological control of Tuta absoluta in tomatoes of the Mediterranean basin*. - Pest Manag. Sci., 68: 1215-1222.
- URBANEJA A., LLÁCER E., TOMÁS O., GARRIDO A., JACAS J.A., 2000 – *Indigenous natural enemies associated with Phyllocnistis citrella (Lepidoptera: Gracillariidae) in Eastern Spain*. - Biol. Control, 18: 199-207.
- VAN LENTEREN J.C., WOETS J., 1988 – *Biological and integrated pest control in greenhouses*. - Annu. Rev. Entomol., 33: 239-269.
- YU D.S.K., VAN ACHTERBERG C., 2010 – *Taxapad Ichneumonoidea (May 2009 version)*. In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist (Bisby F.A., Roskov Y. R., Orrell T.M., Nicolson D., Paglinawan L.E., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., Baillargeon G., Eds). - DVD, Species 2000, Reading, UK.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P.A., RAPISARDA C., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012a – *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta (Meyrick) in Southern Italy*. - Bull. Insectol., 65: 51-61.
- ZAPPALÀ L., CAMPOLO O., GRANDE S.B., SARACENO F., BIONDI A., SISCARO G., PALMERI V. 2012b – *Dispersal of Aphytis melinus (Hymenoptera: Aphelinidae) after augmentative releases in citrus orchards*. - Eur. J. Entomol., 109: 561-568.

ADATTAMENTO DI LIMITATORI INDIGENI: I PARASSITOIDI DEL GENERE *NECREMNUS* E IL PREDATORE *DICYPHUS ERRANS*

LUCIANA TAVELLA (*) - CHIARA FERRACINI (*) - BARBARA LETIZIA INGEGNO (*)
MARCO MOSTI (**) - PAOLO NAVONE (*) - ALBERTO ALMA (*)

(*) DIVAPRA - Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano", Università degli Studi di Torino, Via L. da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (TO); e-mail: luciana.tavella@unito.it

(**) Bioplanet s.c.a. Via Masiera prima, 1195 - 47521 Martorano di Cesena (FC)

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 febbraio 2012.

Adaptation of native natural enemies: the parasitoids of the genus Necremnus and the predator Dicyphus errans

Tomato crop in the Mediterranean Basin and in Europe has been recently affected by a new exotic pest, *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae). With its larval feeding activity this pest causes serious yield losses, posing a threat to both greenhouse and open field tomato production. Chemical control is difficult to achieve due to its resistance developed to many conventional insecticides and the side effects on useful organisms in IPM programmes. In this paper, the suitability and effectiveness of native natural enemies have been investigated to assess their potential role in the control of *T. absoluta*. In particular, the parasitoids *Necremnus* near *artynes* and *N.* near *tidius* (Hymenoptera, Eulophidae) and the generalist predator *Dicyphus errans* (Hemiptera, Miridae), found on tomato infested by *T. absoluta*, were evaluated in controlled conditions. These species revealed to be effective causing a high mortality of *T. absoluta*. Both *Necremnus* species proved to control first and second instar larvae by host feeding and parasitism activity, while the mirid bug preyed mainly on eggs and first instar larvae. Further investigations are therefore needed to confirm their role as potential biological agents in commercial tomato plantations.

KEY WORDS: eulophids, mirid bug, biological control, *Tuta absoluta*.

INTRODUZIONE

La coltura del pomodoro nel bacino del Mediterraneo è stata recentemente soggetta ad attacchi da parte del fitofago esotico *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae). Questa specie, originaria dell'America centrale e segnalata per la prima volta in Europa nel 2006 e in Italia nel 2008 (URBANEJA *et al.*, 2009; VIGGIANI *et al.*, 2009), si nutre soprattutto a spese del pomodoro e di altre solanacee coltivate e spontanee. Nel 2004 *T. absoluta* è stata inserita nella lista A1 delle specie da quarantena dell'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), poi nel 2009 nella lista A2. La lotta chimica contro il fitofago è molto difficile a causa della sua spiccata resistenza a numerosi fitofarmaci e degli effetti collaterali sui limitatori naturali nelle colture gestite con programmi di difesa integrata (LIETTI *et al.*, 2005; CABELLO *et al.*, 2009; IRAC, 2011).

Ricerche sui limitatori naturali sono state condotte in Sud America con lo scopo di rinvenire potenziali candidati da utilizzare in programmi di lotta biolo-

gica. In particolare sono stati indagati i parassitoidi oofagi *Trichogramma pretiosum* (Riley), *T. nerudai* (Pintureau & Gerding), *T. exiguum* Pinto & Platner e *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja (Hymenoptera, Trichogrammatidae) (PRATISSOLI & PARRA, 2000; ZUCCHI & QUERINO, 2000; FARIA *et al.*, 2008; DESNEUX *et al.*, 2010; VIRGALA & BOTTO, 2010), e parassitoidi larvali quali *Apanteles gelechiidivoris* Marsh, *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck), *Bracon* spp. (Hymenoptera, Braconidae), *Dineulophus phthorimaeae* (de Santis) (Hymenoptera, Eulophidae), e *Diadegma* spp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) (COLOMO *et al.*, 2002; MARCHIORI *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2005; BAJONERO *et al.*, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2009; LUNA *et al.*, 2010). Nessuno di questi parassitoidi si è tuttavia dimostrato in grado di contenere le popolazioni del lepidottero e ulteriori studi sono ancora in corso.

Ricerche relative ai limitatori indigeni in grado di adattarsi al fitofago esotico sono state condotte in diversi Paesi dell'area Mediterranea. Parassitoidi larvali quali *Agathis fuscipennis* (Zetterstedt) e *Bracon* spp. (Hymenoptera, Braconidae), *Necremnus* spp.

e *Stenomesus* spp. (Hymenoptera, Eulophidae) (ARNÓ & GABARRA, 2010; GABARRA & ARNÓ, 2010; LONI *et al.*, 2011; RIZZO *et al.*, 2011; ZAPPALÀ *et al.*, 2011, 2012a), e predatori quali *Macrolophus pygmaeus* (Rambur), *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera, Miridae), *Nabis pseudoferus* (Remane) (Hemiptera, Nabidae) (URBANEJA *et al.*, 2009; MOLLÁ *et al.*, 2010; FOIS *et al.*, 2011; ZAPPALÀ *et al.*, 2012b), sono stati segnalati in Spagna e più recentemente in Italia, a dimostrazione di un graduale adattamento al nuovo ospite di varie specie di limitatori. Fra i parassitoidi larvali ottenuti nel corso di ricerche svolte in aree orticole in Liguria, Sardegna e Sicilia nel biennio 2009-2010, *Necremnus prope artynes* (Walker) e *N. prope tidius* (Walker) sono risultati particolarmente abbondanti (FERRACINI *et al.*, 2012).

Inoltre, in Italia tre specie di miridi predatori indigeni con regime alimentare zoofitofago, *M. pygmaeus*, *N. tenuis* e *Dicyphus errans* (Wolff) (Hemiptera, Miridae), sono attive su pomodoro (TAVELLA *et al.*, 1997; TAVELLA & GOULA, 2001; INGEGNO *et al.*, 2008; INGEGNO *et al.*, 2009). Fra queste, l'ultima specie non è mai stata indagata per valutarne l'efficacia di predazione nei confronti di *T. absoluta* in vista di un possibile impiego in lotta biologica e integrata. Specie paleartica, diffusa in Europa e Asia occidentale (KERZHNER & JOSIFOV, 1999) e presente in tutta Italia (SERVADEI, 1967), *D. errans* vive su varie piante ospiti, al tempo stesso pungendole e predando piccoli artropodi. Per adattamenti morfologici e comportamentali preferisce piante ospiti glandulari e ricoperte di peluria (VOIGT *et al.*, 2007), come pomodoro e *Solanum nigrum* L. (Solanaceae), entrambi ospiti di *T. absoluta* (DESNEUX *et al.*, 2010; RIZZO *et al.*, 2011). Presenza e abbondanza di questa solanacea spontanea nell'agroecosistema possono quindi svolgere un auspicabile ruolo di *reservoir* per questi limitatori naturali (INGEGNO *et al.*, 2008).

Allo scopo di impostare strategie di controllo biologico, i due parassitoidi del genere *Necremnus* e il predatore *D. errans*, apparsi promettenti limitatori del lepidottero esotico, sono stati oggetto di studi volti ad accertarne la capacità di individuare e scegliere il nuovo ospite o preda e valutarne l'efficacia di contenimento.

METODOLOGIA

Allevamenti di insetti e piante

Gli adulti di *N. prope artynes* e *N. prope tidius* sono stati forniti dal Bioplanet s.c.a. (Cesena, Italia) ove, dopo prove preliminari, le due specie sono state ritenute idonee per l'allevamento massale. Gli adulti coetanei sono stati separati per sesso, alimentati con gocce di miele somministrate su un cartellino e iso-

lati singolarmente in provette di vetro (12 cm × 1,8 cm diametro), in cella climatica a 24 ± 1°C, 60 ± 5% UR, 16 h fotoperiodo.

Adulti di *D. errans* sono stati raccolti su pomodoro e *S. nigrum* in varie località piemontesi; in laboratorio sono stati identificati e posti in allevamento su piante di pomodoro, su cui erano aggiunte periodicamente uova di *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) (Bioplanet s.c.a., Cesena), in gabbie in rete (47,5 cm di lato).

Allevamenti massali di *T. absoluta* sono stati predisposti in serra (27 ± 3°C, 55 ± 23% UR, 16 h fotoperiodo) a partire da colonie prelevate in coltivazioni di pomodoro in pieno campo in Liguria, in modo da garantire una continua disponibilità di tutti gli stadi di sviluppo del lepidottero.

Per i biosaggi olfattometrici allevamenti massali di *Cosmopterix pulchrimella* Chambers (Lepidoptera, Cosmopterigidae), riportato in letteratura come ospite naturale delle specie *Necremnus artynes* (Walker) e *N. tidius* (Walker) (BERNARDO & VIGGIANI, 2002; THE NATURAL HISTORY MUSEUM, 2011), sono stati predisposti da una colonia raccolta su *Parietaria officinalis* L. (Urticaceae) in Piemonte.

Piante di *Lycopersicon esculentum* Mill. (alte circa 25 cm) e di *P. officinalis* sono state utilizzate sia per gli allevamenti massali che per le prove di laboratorio. Tutte le piante sono state coltivate in vasi di plastica (20 cm diametro), irrigate giornalmente, concimate e mantenute in serra sperimentale (27 ± 3°C, 55 ± 23% UR, 16 h fotoperiodo).

Prove di parassitizzazione con Necremnus spp.

Allo scopo di valutare un'eventuale preferenza dei due parassitoidi per le differenti età larvali dell'ospite, piante di pomodoro infestate con cinque larve per ogni età (totale 20 larve) di *T. absoluta* sono state inserite in cilindri di plexiglas (40 cm × 18 cm diametro) ed esposte per 48 h a femmine del parassitoide, sfarfallate da 5 giorni. Le femmine sono state quindi rimosse e le larve osservate al microscopio. Sono state effettuate cinque ripetizioni per ciascuna specie di parassitoide.

Per accertare l'efficacia di contenimento delle due specie del genere *Necremnus* nei confronti di *T. absoluta*, 20 ritagli di foglie di pomodoro, ognuno con una mina contenente una larva neonata, sono stati distribuiti omogeneamente su una pianta sana con quattro foglie per ottenere, dopo 48 h, una densità di cinque larve per foglia, senza provocare il collasso della pianta. La pianta è stata poi isolata in una gabbietta in plexiglas (20 × 20 × 30 cm), al cui interno è stata introdotta e mantenuta per 5 giorni una femmina del parassitoide sfarfallata da 5 giorni e fecondata. Per ogni specie di parassitoide sono state effettuate 10 ripetizioni con femmine diverse, mentre 10

piante sono state allestite come testimone. Le piante sono state controllate giornalmente per due settimane sino allo sfarfallamento del lepidottero e di eventuali parassitoidi. Gli adulti ottenuti sono stati quindi prelevati e conteggiati.

Prove di predazione con D. errans

Per valutare l'attività di contenimento svolta dal miride dicifino, piante di pomodoro sono state periodicamente esposte ad adulti del lepidottero per ottenere coorti sincronizzate di uova. Dalle piante le uova sono state trasferite con l'ausilio di un pennellino su un apice fogliare composto da tre foglioline (15 uova per apice) all'interno di una capsula di Petri (9 cm diametro), ove è stato introdotto un adulto di *D. errans*. Dopo 24 h, le uova sono state esaminate allo stereomicroscopio per rilevare il numero di uova predate e/o svuotate. Le prove sono state condotte utilizzando 10 femmine e 10 maschi, dopo l'accoppiamento in due periodi successivi, cioè 5 e 10 giorni dopo lo sfarfallamento. Per ogni prova sono state allestite 10 capsule senza predatore come testimone.

Un biosaggio preliminare è stato effettuato per esaminare la preferenza del predatore nei confronti dei quattro stadi larvali di *T. absoluta*. Cinque larve per ogni età (totale 20 larve) sono state trasferite con l'ausilio di un pennellino su un apice fogliare composto da quattro foglioline e simultaneamente offerte a 10 femmine e 10 maschi di *D. errans*, sfarfallati da 5 giorni, in capsula di Petri (20 cm diametro). Dopo 24 h le larve sono state esaminate allo stereomicroscopio per rilevare il numero di larve morte e/o svuotate di ciascuna età.

Per valutare l'efficacia di predazione nei confronti delle larve, cinque larve neonate di *T. absoluta* sono state trasferite su un apice fogliare di pomodoro in capsula di Petri (20 cm diametro), al cui interno è stato introdotto un adulto di *D. errans*. Dopo 24 h, le larve sono state esaminate allo stereomicroscopio per rilevare il numero di larve predate e/o svuotate. Le prove sono state condotte utilizzando 10 femmine e 10 maschi (5 e 10 giorni dopo lo sfarfallamento), previo isolamento di 24 h. Per ogni prova sono state allestite 10 capsule senza predatore come testimone.

Biosaggi in olfattometro

Per indagare le risposte dei due parassitoidi del genere *Necremnus* e del predatore *D. errans* nei confronti delle sostanze volatili emesse da piante di pomodoro sane e infestate da *T. absoluta*, sono stati eseguiti biosaggi in olfattometro a Y secondo i protocolli decritti in FERRACINI *et al.* (2012) e INGEGNO *et al.* (2011).

Per i due parassitoidi *N. prope artynes* e *N. prope*

tidius sono state saggiate in olfattometro femmine sfarfallate da 5 giorni. In particolare, sono stati effettuati tre confronti per ogni specie di parassitoide: a) foglie di parietaria infestate da *C. pulchrimella* contro foglie di pomodoro infestate da *T. absoluta*; b) foglie di parietaria sana contro foglie di pomodoro sano; c) foglie di pomodoro sano contro foglie di pomodoro infestate da *T. absoluta*. Prima di essere utilizzate nei biosaggi olfattometrici, le femmine sono state mantenute a 15°C per 18 h in provette di vetro (12 cm × 1,8 cm diametro), al cui interno erano poste gocce di miele, chiuse con tappo di cotone inumidito, senza avere a disposizione alcun ospite o substrato vegetale. Per ogni confronto sono state saggiate 30 femmine.

Per il predatore *D. errans*, per ogni confronto sono stati saggiati 30 adulti sfarfallati da circa una settimana, previamente isolati per 18 h in provette di vetro, chiuse con tappo di cotone inumidito. In particolare, sono stati effettuati sei confronti: a) foglie di pomodoro sano contro foglie di pomodoro infestate con uova di *T. absoluta*; b) foglie di pomodoro sano contro foglie di pomodoro infestate con larve di prima età; c) foglie di pomodoro sano contro foglie di pomodoro infestate con larve di quarta età; d) foglie di pomodoro sano contro adulti di *T. absoluta*; e) foglie di pomodoro sano contro foglie di pomodoro precedentemente infestate con larve; f) foglie di pomodoro infestate da larve di prima età contro foglie di pomodoro infestate da larve di quarta età. Per ottenere le piante precedentemente infestate, tutte le larve sono state rimosse dalle foglie, avendo l'accortezza di alterare meno possibile la mina.

Analisi statistiche

I dati ottenuti nelle prove di parassitizzazione (adulti di *T. absoluta* sfarfallati) e di predazione a carico delle uova sono stati confrontati mediante analisi della varianza (ANOVA) e, ove necessario, le medie sono state separate usando il test di Tukey. I dati di predazione a carico delle larve di prima età e i dati relativi alla preferenza nei confronti delle diverse età larvali mostrata dalle due specie di parassitoidi e dal predatore sono stati analizzati mediante analisi non parametrica di Kruskal-Wallis e le medie sono state separate con il test di U Mann-Whitney.

Nei biosaggi olfattometrici le risposte sono state analizzate usando il test del Chi-quadro. L'ipotesi nulla era che gli insetti scegliessero le fonti odorose con uguale frequenza mostrando un'eguale distribuzione (50:50) tra i due rami dell'olfattometro a Y. Gli esemplari che non hanno effettuato una scelta sono stati esclusi dalle analisi statistiche.

Tutte le analisi sono state eseguite con il software SPSS versione 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RISULTATI

Prove di parassitizzazione con Necremnus spp.

Alla presenza di diversi stadi larvali di *T. absoluta*, le femmine sia di *N. prope artynes* sia di *N. prope tidius* hanno dimostrato di preferire larve di prima e seconda età, come ospiti sia per la nutrizione che per l'oviposizione ($F = 87,55$; $gl = 3$; $P < 0,001$ per *N. prope artynes*; $F = 195,85$; $gl = 3$; $P < 0,001$ per *N. prope tidius*). Infatti, elevate percentuali di larve di prima e seconda età sono state uccise dai parassitoidi, mentre quelle di terza e quarta età non sono mai state attaccate (Tabella 1).

In base ai dati ottenuti in queste prove preliminari, l'efficacia delle due specie di parassitoidi è stata valutata su larve di prima e seconda età su piante di pomodoro in vaso; entrambe le specie hanno causato un'elevata mortalità delle larve di *T. absoluta* con differenze statisticamente significative rispetto alle piante testimoni, in cui non era stato introdotto il parassitoide. Il numero medio ($\pm$ ES) di adulti di *T. absoluta* sfarfallati è stato pari a $2,6 \pm 0,9$ e $1,2 \pm 0,5$ in presenza di *N. prope artynes* e *N. prope tidius*, rispettivamente, a differenza delle piante testimoni in cui il numero medio è stato pari a $17,2 \pm 0,6$ ($F = 180,28$; $gl = 2$; $P < 0,001$).

Femmine di entrambe le specie sono state in grado di parassitizzare le larve ospiti e il numero medio ($\pm$ ES) di progenie ottenuta è stato pari a $2,7 \pm 1,1$ e $1,5 \pm 0,4$ con una *sex ratio* di 1:3,5 e 1:1,1 (♀:♂) per *N. prope artynes* and *N. prope tidius*, rispettivamente. Il tempo di sviluppo dall'introduzione del parassitoide allo sfarfallamento della progenie è stato inferiore per *N. prope artynes* ($10,2 \pm 0,1$ giorni)

rispetto a *N. prope tidius* ($14,3 \pm 0,2$ giorni), a differenza di un tempo medio di almeno 3 settimane impiegato dagli individui di *T. absoluta*.

Prove di predazione con D. errans

Entrambi i sessi di *D. errans* hanno predato le uova di *T. absoluta* in numero non significativamente differente in relazione sia al sesso sia al periodo di sfarfallamento ($F = 2,06$; $gl = 3$; $P = 0,122$) (Tabella 2). Le percentuali di predazione a carico delle uova si sono attestate su valori relativamente alti, variando tra 58,0% e 82,7% per i maschi sfarfallati da 10 giorni e per le femmine sfarfallate da 5 giorni, rispettivamente.

Quando al predatore sono state offerte simultaneamente le larve di differente età, entrambi i sessi hanno attaccato quasi soltanto le larve di prima età. Le larve di seconda età sono state predate solo dalle femmine e per una piccola percentuale (4%), mentre le larve di terza e quarta età non sono mai state attaccate (Tabella 3).

Il numero medio di larve predate di prima età nell'arco di 24 h è riportato in Tabella 2. Complessivamente le femmine sono state più efficaci dei maschi, predando circa $2,4 \pm 0,5$ larve contro $1,3 \pm 0,3$ larve. In particolare i maschi sfarfallati da 10 giorni sono risultati meno efficienti consumando un numero di larve significativamente inferiore rispetto alle femmine sfarfallate sia da 5 sia da 10 giorni ($\chi^2 = 8,33$; $gl = 3$; $P = 0,040$).

Biosaggi in olfattometro

Nei biosaggi in olfattometro quasi tutte le femmine dei due parassitoidi hanno scelto una fonte odorosa

Tabella 1 – Numero medio ($\pm$ ES) di larve di *Tuta absoluta* uccise da femmine dei parassitoidi *Necremnus prope artynes* e *Necremnus prope tidius*.

Specie	n. medio di larve uccise			
	I età	II età	III età	IV età
<i>N. prope artynes</i>	4,20 $\pm$ 0,37 a	3,80 $\pm$ 0,20 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
<i>N. prope tidius</i>	4,80 $\pm$ 0,20 a	4,60 $\pm$ 0,24 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b

Per ciascun parassitoide valori seguiti da lettere diverse sono significativamente differenti (Kruskal-Wallis, test di Mann-Whitney, $P < 0,001$).

Tabella 2 – Numero medio ($\pm$ ES) di uova e di larve di prima età di *Tuta absoluta* predate da femmine e maschi di *Dicyphus errans* sfarfallati da 5 e 10 giorni.

gg dallo sfarfallam.	n. uova predate*		n. larve di I età predate**	
	femmine	maschi	femmine	maschi
5	9,10 $\pm$ 1,37 A	10,80 $\pm$ 1,35 A	2,50 $\pm$ 0,52 a	1,50 $\pm$ 0,50 ab
10	12,40 $\pm$ 0,72 A	8,70 $\pm$ 1,17 A	2,30 $\pm$ 0,30 a	1,10 $\pm$ 0,18 b

I valori seguiti da lettere diverse sono significativamente differenti (*ANOVA, test di Tukey, $P < 0,05$; **Kruskal-Wallis, test di Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Tabella 3 – Percentuale (media $\pm$ ES) di larve predate di differenti età di *Tuta absoluta* simultaneamente offerte a femmine e maschi di *Dicyphus errans*.

Età larvale	% di larve predate	
	femmine	maschi
I	68,0 $\pm$ 10,2 a	44,0 $\pm$ 11,7 a
II	4,0 $\pm$ 4,0 b	0,0 $\pm$ 0,0 b
III	0,0 $\pm$ 0,0 b	0,0 $\pm$ 0,0 b
IV	0,0 $\pm$ 0,0 b	0,0 $\pm$ 0,0 b

Le percentuali seguite da lettere diverse sono significativamente differenti (Kruskal-Wallis, test di Mann-Whitney, $P < 0,05$).

nel tempo prefissato. In particolar modo, le femmine di *N. prope artynes* si sono dimostrate più attratte dal pomodoro infestato rispetto alla parietaria infestata ($\chi^2 = 19,20$; $gl = 1$; $P < 0,001$), e dal pomodoro sano rispetto alla parietaria sana ($\chi^2 = 4,80$; $gl = 1$; $P = 0,028$). Differenze statisticamente significative sono state anche evidenziate nel caso di femmine di *N. prope artynes* confrontando piante di pomodoro infestate e sane ($\chi^2 = 10,80$; $gl = 1$; $P = 0,001$) (Figura 1). Nelle prove con *N. prope tidius*, nessuna differenza significativa è stata rilevata tra piante di pomodoro e parietaria sane ($\chi^2 = 0,53$; $gl = 1$; $P = 0,465$), e tra piante di pomodoro e parietaria infestate ($\chi^2 = 3,33$; $gl = 1$; $P = 0,068$). Le piante di pomodoro infe-

state sono invece state più attrattive di quelle sane ($\chi^2 = 8,53$; $gl = 1$; $P = 0,003$) (Figura 2).

In olfattometro, *D. errans* non ha mostrato preferenze tra gli odori emessi dal pomodoro e dagli adulti del lepidottero, tra gli odori emessi dal pomodoro sano e da quello infestato con uova di *T. absoluta* e tra gli odori emessi dal pomodoro infestato con larve di prima età e quello infestato con larve di quarta età. Al contrario, ha preferito l'odore della pianta infestata con larve di prima età rispetto a quella sana, l'odore della pianta infestata con larve di quarta età rispetto a quella sana, e l'odore della pianta in precedenza infestata con vari stadi larvali rispetto a quella sana.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Diverse specie di parassitoidi larvali di *T. absoluta* appartenenti alla famiglia Eulophidae sono stati segnalati sia in Sud America che nell'area Mediterranea (DESNEUX *et al.*, 2010). Tuttavia questo dato non sorprende poiché questa famiglia comprende varie specie di parassitoidi di minatori fogliari e di galligeni, spesso in grado di adattarsi a ospiti esotici. In particolar modo il genere *Necremnus* è apparso recentemente un candidato promettente nel controllo biologico di *T. absoluta* (MOLLÁ *et al.*, 2008, 2010; GABARRA & ARNÓ, 2010; FOIS *et al.*, 2011;

Figura 1

Risposte di *Necremnus prope artynes* in olfattometro a Y agli odori emessi da piante di pomodoro infestate da *Tuta absoluta* (δ) e sane (π), e da piante di parietaria infestate da *Cosmopterix pulcherrimella* (α) e sane (β). I numeri nelle barre rappresentano gli individui che si sono spostati verso la fonte odorosa. Il test del χ^2 (* $P < 0,10$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$; $gl = 1$) ha saggiato l'ipotesi che la distribuzione delle risposte fra i due rami di scelta deviasse da un'ipotesi nulla in cui le fonti odorose avessero pari frequenza.

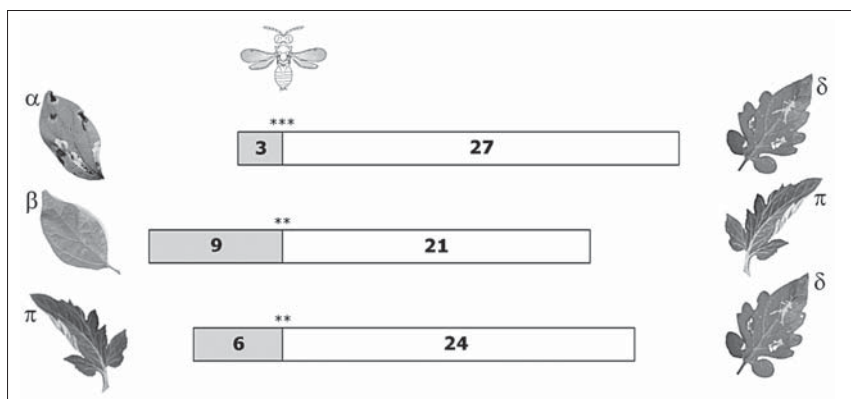
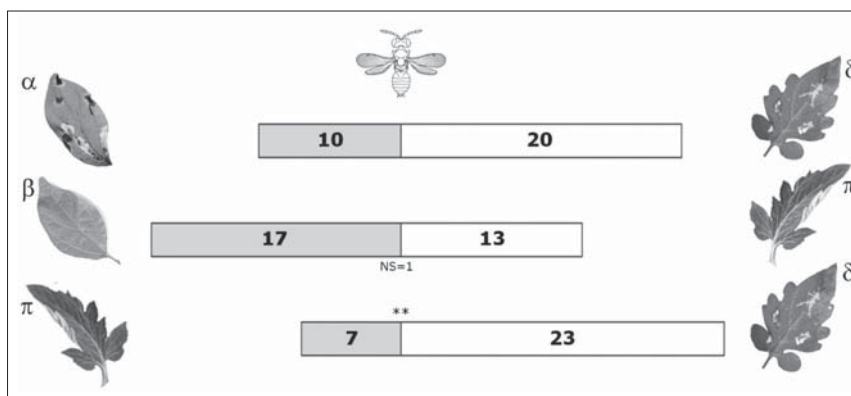


Figura 2

Risposte di *Necremnus prope tidius* in olfattometro a Y agli odori emessi da piante di pomodoro infestate da *Tuta absoluta* (δ) e sane (π), e da piante di parietaria infestate da *Cosmopterix pulcherrimella* (α) e sane (β). I numeri nelle barre rappresentano gli individui che si sono spostati verso la fonte odorosa. Il test del χ^2 (* $P < 0,10$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$; $gl = 1$) ha saggiato l'ipotesi che la distribuzione delle risposte fra i due rami di scelta deviasse da un'ipotesi nulla in cui le fonti odorose avessero pari frequenza.



RIZZO *et al.*, 2011; FERRACINI *et al.*, 2012; ZAPPALÀ *et al.*, 2012a). Il genere include parassitoidi ectofagi solitari e gregari di larve di coleotteri, lepidotteri e ditteri (COUDRON *et al.*, 2000; BERNARDO & VIGGIANI, 2002; DOSDALL *et al.*, 2007); molte specie risultano tuttavia ancora poco studiate e poche informazioni relative alla loro bio-etologia sono attualmente reperibili in letteratura.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una buona attività di limitazione nei confronti del lepidottero esotico. In laboratorio entrambe le specie del genere *Necremnus* hanno causato un'elevata mortalità delle larve di *T. absoluta* dovuta a fenomeni di *host feeding* e parassitizzazione, con preferenza per le larve di prima e seconda età. Inoltre sono risultati fortemente attratti dal pomodoro infestato dal lepidottero esotico. Infatti, nei biosaggi olfattometrici hanno dimostrato di preferire il pomodoro infestato dal lepidottero anche rispetto alla parietaria infestata da *C. pulchrimella* riportato come ospite primario di *N. artynes* e *N. tidius* (BERNARDO & VIGGIANI, 2002; THE NATURAL HISTORY MUSEUM, 2011).

Analogamente ai parassitoidi, anche i risultati ottenuti in questo primo studio sulla capacità di *D. errans* di predare *T. absoluta* sono stati incoraggianti. Entrambi i sessi del miride predatore sono stati in grado di predare giornalmente all'incirca 10 uova di *T. absoluta*. A differenza di quanto osservato per gli altri due dicifini *M. pygmaeus* e *N. tenuis* in cui le femmine sono apparse più voraci dei maschi (URBANEJA *et al.*, 2009), le femmine e i maschi di *D. errans*, sfarfallati sia da 5 sia da 10 giorni, hanno dimostrato di consumare un numero di uova pressoché simile.

Tra i differenti stadi larvali offerti simultaneamente, gli adulti di *D. errans* di entrambi i sessi hanno attaccato quasi soltanto le larve di prima età, poiché meno mobili e di taglia inferiore, consumandone giornalmente un numero molto simile a quello osservato in precedenza per le specie *N. tenuis* e *M. pygmaeus* da URBANEJA *et al.* (2009). Recentemente proprio questi due dicifini, già allevati e commercializzati dalle biofabbriche, sono stati ampiamente impiegati in programmi di lotta integrata e biologica contro *T. absoluta* (BELDA *et al.*, 2011; HARPAZ *et al.*, 2011; JACOBSON, 2011; SEGURET *et al.*, 2011). Data l'elevata efficacia nei confronti di uova e larve di prima età, osservata nelle prove in laboratorio, *D. errans* potrebbe essere introdotto nell'agroecosistema all'inizio della stagione colturale mediante piante rifugio (*banker plants*) in modo da favorirne un precoce insediamento nelle coltivazioni di pomodoro.

Nonostante i risultati sinora ottenuti sul potenziale di limitazione del lepidottero esotico da parte dei due eulofidi parassitoidi e del miride predatore

siano molto incoraggianti, ulteriori studi sono ancora necessari per definire la posizione sistematica ed individuare gli ospiti naturali delle due specie di *Necremnus*, ad oggi quasi del tutto sconosciuti, e per valutarne unitamente al miride *D. errans* le reali possibilità di applicazione in campo nell'ambito dei programmi di lotta biologico-integrata.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la Dott.ssa Ester Ferrari, il Dott. Diego Gallinotti ed Evaggelia Kalaitzoglou per il supporto fornito nelle prove di laboratorio.

RIASSUNTO

La coltura del pomodoro nel bacino del Mediterraneo e in Europa è stata recentemente colpita da un nuovo fitofago esotico *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae), responsabile di gravi danni alla produzione con l'attività trofica delle larve. La lotta chimica a questo fitofago è difficoltosa a causa della resistenza sviluppata a molti insetticidi convenzionali e all'effetto collaterale sugli organismi utili nei programmi di lotta integrata. In questo lavoro, l'adattamento e l'efficacia di alcuni limitatori indigeni sono stati valutati per accertarne il potenziale ruolo per il controllo del lepidottero esotico. In particolare, i due parassitoidi *Necremnus* prope *artynes* e *N. prope tidius* (Hymenoptera, Eulophidae) e il predatore generalista *Dicyphus errans*, (Hemiptera, Miridae), rinvenuti su pomodoro infestato da *T. absoluta*, sono stati indagati in condizioni controllate. Queste specie si sono rivelate efficaci antagonisti di *T. absoluta* provocandone un'alta mortalità. Entrambe le specie del genere *Necremnus* sono state in grado di controllare efficacemente le larve di prima e seconda età con attività di *host feeding* e parassitizzazione, mentre il miride ha dimostrato di predare attivamente uova e larve di prima età. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per definire la posizione sistematica e individuare gli ospiti naturali delle due specie di *Necremnus*, e per valutare le reali potenzialità di applicazione in campo dei due parassitoidi e del miride predatore nell'ambito dei programmi di lotta biologico-integrata.

BIBLIOGRAFIA

- ARNÓ J., GABARRA R., 2010 – *Controlling Tuta absoluta, a new invasive pest in Europe*. ENDURE training in integrated pest management, no. 5, pp. 1-8. (http://www.endure-network.eu/about_endure/all_the_news/new_guide_tackling_tuta_absoluta).
- BELDA J.E., GIMÉNEZ A., JAVIER CALVO F., 2011 – *Success and extension of biological control strategies for managing Tuta absoluta (Meyrick) (Lep. Gelechiidae) populations in the Mediterranean area*. EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Abstracts' Book of the International Symposium on management of *Tuta absoluta* (tomato borer). - Agadir, Morocco, November 16-18, 2011: 28.
- BAJONERO J., CORDOBA N., CANTOR F., RODRIGUEZ D., RICARDO CURE J., 2008 – *Biology and life cycle of Apanteles gelechiidivoris (Hymenoptera: Braconidae)*

- parasitoid of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Agron. Colomb. 26: 417-426.
- BERNARDO U., VIGGIANI G., 2002 – *Notizie biologiche sul Necremnus tidius (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparassitoide di Cosmopterix pulchrimella Chambers (Lepidoptera: Cosmopterigidae)*. - Boll. Lab. Entomol. Agr. Filippo Silvestri 58: 87-92.
- CABELLO T., GALLEGO J.R., VILA E., SOLER A., DEL PINO M., CARNERO A., HERNÁNDEZ-SUÁREZ E., POLASZEK A., 2009 – *Biological control of the South American tomato pinworm, Tuta absoluta (Lep.: Gelechiidae), with releases of Trichogramma achaeae (Hym.: Trichogrammatidae) on tomato greenhouses of Spain*. - IOBC/WPRS Bull. 49: 225-230.
- COLOMO M.V., BERTA D.C., CHOCOBAR M.J., 2002 – *El complejo de himenópteros parasitoides que atacan a la "polilla del tomate" Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) en la Argentina*. - Acta Zool. Lillo. 46: 81-92.
- COUDRON T.A., KNOP WRIGHT M.M., PUTTLER B., BRANDT S.L., RICE W.C., 2000 – *Effect of the ectoparasite Necremnus breviamulus (Hymenoptera: Eulophidae) and its venom on natural and factitious hosts*. - Ann. Entomol. Soc. Am. 93: 890-897.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUYS K.A.G., BURGIO G., ARPAIA S., NÁRVAEZ-VÁSQUEZ C.A., GONZÁLEZ-CABRERA J., CATÁLAN RUESCAS D., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control*. - J. Pest. Sci. 83: 197-215.
- DOSDALL L.M., GIBSON G.A.P., OLFERT O., KEDDIE B.A., ULMER B.J., 2007 – *Contributions to the life history, host range, and distribution of Necremnus tidius (Hymenoptera: Eulophidae)*. - Ann. Entomol. Soc. Am. 100: 861-868.
- FARIA C.A., TORRES J.B., FERNANDES A.M.V., FARIAS A.M.I., 2008 – *Parasitism of Tuta absoluta in tomato plants by Trichogramma pretiosum Riley in response to host density and plant structures*. - Cienc. Rural, Santa Maria 38: 1504-1509.
- FERRACINI C., INGEGNO B.L., NAVONE P., FERRARI E., MOSTI M., TAVELLA L., ALMA A., 2012 – *Adaptation of indigenous larval parasitoids to Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy*. - J. Econ. Entomol. 105: 1311-1319.
- FOIS F., PORCU M., SAU S., CARRUSCI P., DEIANA M., NANNINI M., 2011 – *Osservazioni sulla dinamica di popolazione della tignola del pomodoro Tuta absoluta (Lepidoptera, Gelechiidae) in coltura protetta*. Atti XXIII Congr. Naz. Ital. Entomol., 13-16 giugno 2011, Genova: 221.
- GABARRA R., ARNÓ J., 2010 – *Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña*. - Phytoma España 217: 65-68.
- HARPAZ L.S., GRAPH S., RIKI K., AZOLAY L., ROZENBERG T., YAKOV N., ALON T., ALUSH A., STINBERG S., GERLING D., 2011 – *IPM of Tuta absoluta in Israel*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Abstracts' Book of the International Symposium on management of Tuta absoluta (tomato borer). - Agadir, Morocco, November 16-18, 2011: 32.
- INGEGNO B.L., PANSÀ M.G., TAVELLA L., 2009 – *Tomato colonization by predatory bugs (Heteroptera: Miridae) in agroecosystems of NW Italy*. - IOBC/WPRS Bull. 49: 287-291.
- INGEGNO B.L., PANSÀ M.G., TAVELLA L., 2011 – *Plant preference in the zoophytophagous generalist predator Macrolophus pygmaeus (Heteroptera: Miridae)*. - Biol. Control 58: 174-181.
- INGEGNO B.L., GOULA M., NAVONE P., TAVELLA L., 2008 – *Distribution and host plants of the genus Dicyphus in the Alpine valleys of NW Italy*. - Bull. Insectol. 61 (1): 139-140.
- [IRAC] Insecticide Resistance Action Committee, 2011 – *Tuta absoluta the tomato leafminer or tomato borer. Recommendations for sustainable and effective resistance management insecticide resistance management*. (http://www.iraonline.org/wp-content/uploads/2009/12/Tuta_brochure_print-version_11Oct11.pdf).
- JACOBSON R., 2011 – *Tuta absoluta: A season-long IPM strategy based on predatory bugs*. EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Abstracts' Book of the International Symposium on management of Tuta absoluta (tomato borer). - Agadir, Morocco, November 16-18, 2011: 33.
- KERZHNER I.M., JOSIFOV M., 1999 – *Cimicomorpha II: Miridae*. In Aukema B., Rieger C. Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Vol. 3. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, The Netherlands: 577.
- LIETTI M.M.M., BOTTO E., ALZOGARAY R.A., 2005 – *Insecticide resistance in Argentine populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Neotrop. Entomol. 34: 113-119.
- LONI A., ROSSI E., VAN ACHTERBERG K., 2011 – *First report of Agathis fuscipennis in Europe as parasitoid of the tomato leafminer Tuta absoluta*. - Bull. Insectol. 64: 115-117.
- LUNA M.A.G., WADA V.I., SÁNCHEZ N.E., 2010 – *Biology of Dineulophus phthorimaeae (Hymenoptera: Eulophidae) and field interaction with Pseudapanteles dignus (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato*. - Ann. Entomol. Soc. Am. 103: 936-942.
- MARCHIORI C.H., SILVA C.G., LOBO A.P., 2004 – *Parasitoids of Tuta absoluta (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) collected on tomato plants in Lavras, state of Minas Gerais, Brazil*. - Braz. J. Biol. 64: 551-552.
- MIRANDA M.M.M., PICANCO M., ZANUNCIO J.C., BACCI L., DA SILVA E.M., 2005 – *Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato*. - Cienc. Rural, Santa Maria 35: 204-208.
- MOLLÁ O., MONTÓN H., BEITIA F., URBANEJA A., 2008 – *La polilla del tomate Tuta absoluta (Meyrick), una nueva plaga invasora*. - Terralia 69: 36-42.
- MOLLÁ O., ALONSO M., MONTÓN H., BEITIA F., VERDÚ M.J., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2010 – *Control biológico de Tuta absoluta. Catalogación de enemigos naturales y potencial de los míridos depredadores como agentes de control*. - Phytoma España 217: 42-46.
- PRATISSOLI D., PARRA J.R.P., 2000 – *Fertility life table of Trichogramma pretiosum (Hym., Trichogrammatidae) in eggs of Tuta absoluta and Phthorimaea operculella (Lep., Gelechiidae) at different temperatures*. - J. Appl. Entomol. 124: 339-342.
- RIZZO M.C., MARGIOTTA V., CALECA V., 2011 – *Necremnus arynes parassitoide di Tuta absoluta su pomodoro, melanzana e Solanum nigrum in serra a conduzione biologica*. Atti XXIII Congr. Naz. Entomol., 13-16 giugno 2011, Genova: 357.

- SÁNCHEZ N.E., PEREYRA P.C., LUNA M.G., 2009 – *Spatial patterns of parasitism of the solitary parasitoid Pseudapanteles dignus (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae) on the tomato leafminer Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Environ. Entomol. 38: 365-374.
- SEGURET J., MAIGNET P., RIDRAY G., 2011 – *Efficacy of the combination of two beneficials to control Tuta absoluta (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato glasshouses in southern France*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Abstracts' Book of the International Symposium on management of *Tuta absoluta* (tomato borer). - Agadir, Morocco, November 16-18, 2011: 47.
- SERVADEI A., 1967 – *Rhynchota (Heteroptera, Homoptera Auchenorrhyncha). Catalogo topografico e sinonimico*. In: Fauna d'Italia, 9. Calderini, Bologna: 1-851.
- TAVELLA L., ALMA A., SARGIOTTO C., 1997 – *Samplings of Miridae Dicyphinae in tomato crops of northwestern Italy*. - IOBC/WPRS Bull. 20 (4): 249-256.
- TAVELLA L., GOULA M., 2001 – *Dicyphini collected in horticultural areas of northwestern Italy (Heteroptera Miridae)*. - Boll. Zool. agr. Bachic., Ser. II. 33: 93-102.
- THE NATURAL HISTORY MUSEUM, 2011 – *Universal Chalcidoidea Database. Chalcidoid associates of named taxon: search results*. <http://www.nhm.ac.uk/research500/curation/research/projects/chalcidoids/database/detail.dsml?FamilyCode=HE&VALAUTHOR=%28Walke%29&VALGENUS=Necremnus&HOMCODE=0&VALDATE=1839&VALSPECIES=artynes&&listPageURL=browseMedia.dsml%3f&tab=associates>.
- URBANEJA A., MONTÓN H., MOLLÁ O., 2009 – *Suitability of the tomato borer Tuta absoluta as prey for Macrolophus pygmaeus and Nesidiocoris tenuis*. - J. Appl. Entomol. 133: 292-296.
- VIGGIANI G., FILELLA F., DELRIO G., RAMASSINI W., FOXI C., 2009 – *Tuta absoluta, nuovo lepidottero segnalato anche in Italia*. - Inf.tore Agr. 65 (2): 66-68.
- VIRGALA RIQUELME M.B., BOTTO E.N., 2010 – *Estudios biológicos de Trichogrammatoidea bactrae Nagaraja (Hymenoptera: Trichogrammatidae), parasitoide de huevos de Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Neotrop. Entomol. 39: 612-617.
- VOIGT D., GORB E., GORB S., 2007 – *Plant surface-bug interactions: Dicyphus errans stalking along trichomes*. - Arthropod-Plant Interactions 1 (4): 221-243.
- ZAPPALÀ L., BIONDI A., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2011 – *Studi sui parassitoidi indigeni di Tuta absoluta in Sicilia*. Atti XXIII Congr. Naz. Ital. Entomol., 13-16 Giugno 2011, Genova: 335.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P., RAPISARDA C., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012a – *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta in Southern Italy*. - Bull. Insectol. 65 (1): 51-61.
- ZAPPALÀ L., SISCARO G., BIONDI A., MOLLÁ O., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2012b – *Efficacy of sulphur on Tuta absoluta and its side effects on predator Nesidiocoris tenuis*. - J. Appl. Entomol. 136: 401-409.
- ZUCCHI R.A., QUERINO R.B., 2000 – *Towards a database for the Trichogramma species, their hosts and plant associations in the South America*. In Proceedings of the XXI International Congress of Entomology, (abstr.) Book I, August 20-26, 2000, Iguassu Falls, Brazil: 201.

PROSPETTIVE E LIMITI DELL'IMPIEGO DI FEROMONI SESSUALI PER LA LOTTA CONTRO LA TIGNOLA DEL POMODORO

GAVINO DELRIO (*) - ARTURO COCCO (*) - SALVATORE DELIPERI (*)

(*) Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italia; gdelrio@uniss.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 febbraio 2012.

Use of sex pheromones to control the tomato leafminer, Tuta absoluta: perspectives and limitations

In 2010-2012, greenhouse and open-field trials were conducted in Sardinia on the potential use of the sex pheromone to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. Pheromone monitoring traps were useful to outline the pest phenology, although no correlation was found between male captures and *T. absoluta* infestation in open-field crops. Conversely, in greenhouse tomato crops with low pest population density the number of males was correlated with that of leaf mines. The mass trapping technique, deploying pheromone water traps at increasing densities up to 100 traps/ha, was not effective in controlling *T. absoluta* infestations. On the other hand, light traps, which captured approx. 50% of females, reduced the leaf damage during the summer-winter tomato growing season (1 trap/350-500 m²), but they were not effective in the winter-summer season (1 trap/700-1000 m²).

The mating disruption technique, tested in greenhouses with insect-proof screens by deploying 1000 dispensers/ha (60 g of a.i./ha), effectively reduced male captures at pheromone monitoring traps as well as leaf and fruit damage in both tomato growing seasons.

KEY WORDS: *Tuta absoluta*, monitoring, mass trapping, mating disruption.

INTRODUZIONE

La tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera; Gelechiidae), originaria del Sud America (DESNEUX *et al.*, 2010), è stata segnalata in Spagna nel 2006 (URBANEJA *et al.*, 2007) e ha successivamente invaso tutto l'areale mediterraneo fino al Medio Oriente (ABDUL RAZZAK *et al.*, 2010). In Italia è stata ritrovata nel 2008 in Sardegna e Calabria (VIGGIANI *et al.*, 2009) e successivamente in quasi tutte le altre regioni (SPERANZA & SANNINO, 2011).

Tuta absoluta è una specie omodinamica, polivoltina e polifaga; è stata riscontrata prevalentemente su Solanacee ma anche su fagiolo e *Malva* sp. Il pomodoro costituisce l'ospite di elezione fra le Solanacee coltivate, con danni che possono arrivare anche al 100% della produzione, mentre meno infestate sono melanzana, peperone e patata. La Solanacea spontanea più frequentemente attaccata in Italia è la morella comune, *Solanum nigrum* L.

Il controllo di *T. absoluta* sul pomodoro, reso difficile dai costumi endofitici delle larve, si è basato in Sud America essenzialmente sull'uso massiccio di insetticidi, con 2-3 trattamenti per settimana e fino a 36 interventi per ciclo colturale (PICANÇO *et al.*, 1995). Ciò ha portato all'insorgenza di popolazioni resistenti ai diversi principi

attivi man mano utilizzati, come metamidofos, permetrina, abamectina e cartap (SIQUEIRA *et al.*, 2000) e, recentemente, anche a insetticidi di nuova generazione come spinosad (REYES *et al.*, 2011). Anche le popolazioni di *T. absoluta* introdotte accidentalmente in Italia si sono dimostrate resistenti a numerosi principi attivi. In prove effettuate in serre di pomodoro della Sardegna con 11 insetticidi, solo spinosad e, in minor misura, indoxacarb e metaflumizone hanno mostrato una buona efficacia (NANNINI, 2011), mentre in pieno campo, in condizioni di forte attacco, due trattamenti con diversi principi attivi (spinosad, indoxacarb, deltametrina o chlorpyrifos) non sono stati sufficienti a controllare l'infestazione (G. DELRIO & C. FOXI, dati non pubblicati).

Le difficoltà incontrate nella lotta chimica alla tignola del pomodoro hanno stimolato la ricerca di metodi di controllo eco-sostenibili, con l'impiego di *Bacillus thuringiensis* (GONZALES-CABRERA *et al.*, 2011), nematodi entomopatogeni (BATALLA-CARRERA *et al.*, 2010), predatori e parassitoidi (MOLLÀ *et al.*, 2011; CABELLO *et al.*, 2009; ZAPPALÀ *et al.*, 2012) e la selezione di cultivar di pomodoro resistenti (OLIVEIRA *et al.*, 2009). L'identificazione del feromone sessuale di *T. absoluta*, costituito da una miscela di (3E,8Z,11Z)-tetradecatrien-1-yl acetato e di (3E,8Z)-tetradecadien-1-yl

acetato nel rapporto di 90:10 (SVATOS *et al.*, 1996), ha aperto la strada anche alle applicazioni di lotta biotecnica. Il componente principale del feromone sessuale si è dimostrato fortemente attrattivo nei confronti dei maschi in campo (MICHEREFF FILHO *et al.*, 2000a) e, in Brasile, sono state osservate catture medie di 1200 maschi per notte a trappole innescate con feromone sintetico (FERRARA *et al.*, 2001). I feromoni sessuali sono ampiamente impiegati per il monitoraggio e per il controllo di molti lepidotteri dannosi, mediante le tecniche di cattura massale e di confusione sessuale. Anche per la tignola del pomodoro sono state proposte le trappole a feromoni per stabilire soglie di intervento (VERCHER *et al.*, 2010) e per la tecnica delle catture massali (AL-ZAIDI, 2010), e sono iniziate le ricerche sull'efficacia della tecnica di confusione sessuale in pieno campo e in coltura protetta (MICHEREFF FILHO *et al.*, 2000b; MARTÌ MARTÌ *et al.*, 2010; VACAS *et al.*, 2011; COCCO *et al.*, 2012).

Si riportano qui i risultati della sperimentazione condotta in Sardegna negli anni 2010-2012 sull'utilizzazione del feromone sessuale per il controllo della tignola del pomodoro, insieme a quanto riportato su questo tema nella letteratura scientifica.

MONITORAGGIO

Le trappole a feromoni costituiscono un mezzo semplice e adeguato per monitorare l'andamento delle popolazioni di *T. absoluta* e delineare la fenologia dell'insetto nelle diverse aree climatiche e colturali. Nel nord della Sardegna (Sorso, Sassari), gli adulti sono stati riscontrati in pieno campo durante tutto il 2011, con densità molto basse nei mesi invernali e massima presenza in quelli estivi (Fig. 1a). L'aumento delle catture di maschi è risultato correlato a quello delle temperature e a fine agosto sono state raggiunte catture medie superiori a 1000 maschi per trappola per settimana. L'insetto si sviluppa in inverno sulle colture di patata precoce e su *Solanum nigrum*, mentre nel periodo estivo attacca soprattutto il pomodoro e la melanzana (Fig 1b) (S. DELIPERI, dati non pubblicati).

L'esame visivo delle piante e dei frutti di pomodoro per stimare il livello di infestazione di *T. absoluta* e per definire delle soglie di intervento è particolarmente oneroso, mentre le trappole a feromoni potrebbero semplificare il campionamento, se fosse stabilita una relazione affidabile fra catture e infestazione. Una correlazione significativa fra il numero di maschi catturato alle trappole e il livello di danno alla pianta e ai frutti è stata stabilita in colture di pomodoro in pieno

campo in Spagna (VERCHER *et al.*, 2010) e, in Brasile, sono state proposte soglie di intervento basate sulle catture (BENVENGA *et al.*, 2007). Al contrario, in condizioni di alte densità di *T. absoluta* in campi di pomodoro da industria in Sardegna centrale, non è stata trovata alcuna correlazione significativa fra catture e infestazione (Fig. 2). In particolare, le catture di maschi sono apparse molto elevate nella fase iniziale della coltura, probabilmente per un effetto di richiamo dei maschi dalle aree circostanti i campi di pomodoro, indotto anche dalle trappole.

Nelle colture in serra invece, in condizioni di basse popolazioni (catture inferiori a 25 maschi/trappola/settimana), è stata riscontrata in Sardegna una correlazione significativa fra catture di maschi e numero medio di mine per foglia di pomodoro (Fig. 3). Diversamente, in serre della Tunisia con alte densità di adulti è stata rilevata una correlazione fra catture e tasso di infestazione sulle foglie, ma non fra catture e numero di mine per foglia (ABBES & CHERMITI, 2011).

L'uso delle trappole a feromoni per la stima delle infestazioni e per stabilire le soglie di intervento sembra al momento incontrare le stesse difficoltà conosciute per altri lepidotteri; sono pertanto necessarie ulteriori ricerche per definirne le migliori condizioni di impiego.

CATTURE MASSALI

La tecnica delle catture massali, con trappole a feromoni o luminose, ha avuto una forte diffusione fra gli operatori ed è impiegata estensivamente in coltura protetta, senza che ne sia stata ancora adeguatamente sperimentata la reale efficacia. Sono anche commercializzate trappole ad alimentazione solare che, per aumentare l'attrazione, integrano una specifica lunghezza d'onda luminosa e il feromone sessuale.

Le trappole a feromoni più comunemente usate sono innescate con quantità diverse di feromone sessuale e diffusori di vario tipo, con una durata di attrazione di 5-6 settimane, e hanno un dispositivo di cattura costituito da un piatto (32-34 cm di diametro) riempito di acqua. Le ditte produttrici di feromoni e trappole consigliano di disporre in campo un numero variabile da 15 a 30 trappole per ettaro, allo scopo di catturare un numero di maschi sufficiente a ridurre la probabilità di accoppiamento delle femmine e conseguentemente la deposizione di uova fecondate.

Prove di cattura massale condotte in Sardegna in serre di pomodoro dotate di reti anti-insetto con l'impiego di trappole a feromoni ad acqua, a

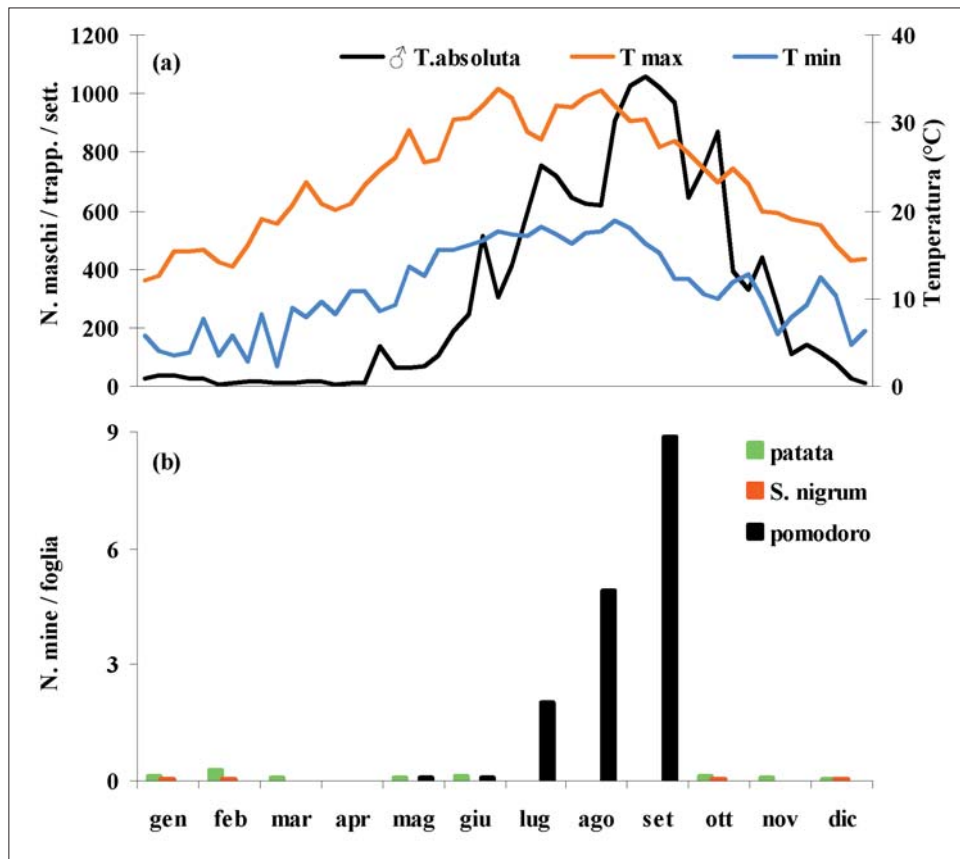


Fig. 1
Andamento delle temperature e delle catture di maschi di *Tuta absoluta* alle trappole a feromone in pieno campo (a) e dell'infestazione sulle piante ospiti (b) in nord Sardegna (2011).

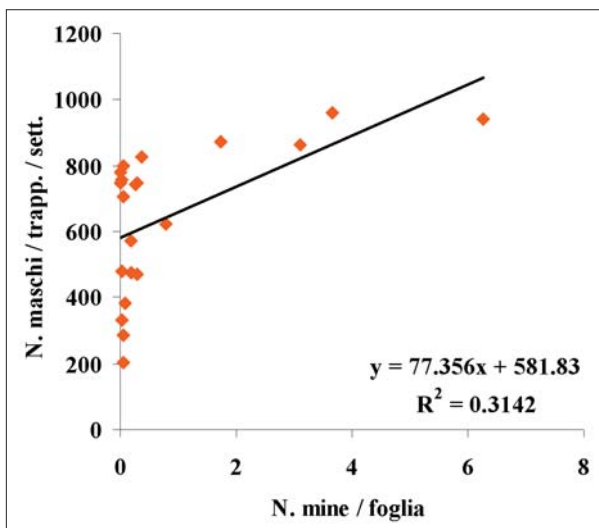


Fig. 2
Correlazione tra le catture di maschi di *Tuta absoluta* alle trappole a feromone e l'infestazione su piante di pomodoro in pieno campo (Sardegna, 2010).

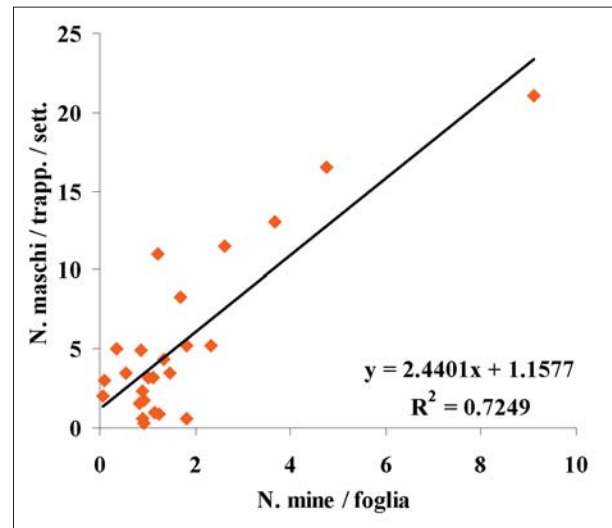


Fig. 3
Correlazione tra le catture di maschi di *Tuta absoluta* alle trappole a feromone e l'infestazione su piante di pomodoro in cultura protetta (Sardegna, 2011).

densità crescenti fino a 100 trappole/ha, hanno dimostrato l'inaffidabilità di questa tecnica per il controllo di *T. absoluta*. Le trappole sono risultate efficienti e hanno catturato un alto numero di maschi; solo in un caso però è stata riscontrata una differenza significativa fra il numero di mine

fogliari nella serra difesa con le trappole rispetto a quella testimone e, in un altro, fra le percentuali di frutti infestati. Tuttavia, poiché non è stato rilevato alcun effetto della densità delle trappole sulla riduzione dell'infestazione (COCCO *et al.*, 2012) (Tab. 1), anche l'aumento del numero dei

Tabella 1 – Prove di cattura massale di *Tuta absoluta* con l'impiego di trappole ad acqua innescate con feromone in serre della Sardegna (2010-2012).

	N. maschi/trappola	N. mine/foglia ^a	% frutti attaccati
Controllo	–	6,1*	12,7
28 trappole/ha	965	2,7	11,3
Controllo	–	1,4	2,8
40 trappole/ha	810	1,7	0,6*
Controllo	–	0,9	1,3
40 trappole/ha	524	1,2	0,8
100 trappole/ha	454	0,7	2,8

^a Dati medi riferiti all'intero ciclo colturale

* Significativo a P = 0,05

maschi catturati per unità di superficie, dovuto all'intensificazione delle trappole, non è stato sufficiente a contenere gli attacchi. L'impiego della tecnica delle catture massali con feromoni è reso difficoltoso anche dal comportamento poligamo dei maschi di *T. absoluta*, che possono accoppiarsi in media per 6,5 volte durante tutta la vita (SILVA, 2008). Per ottenere buoni risultati con questa tecnica è pertanto necessario catturare la quasi totalità dei maschi e questo potrà ottenersi solo con un netto miglioramento dei sistemi di attrazione e cattura. Infatti, in serre di pomodoro sprovviste di reti anti-insetto della Tunisia non è stata ottenuta una riduzione dell'infestazione e del danno ai frutti con l'impiego di una trappola a feromoni per 500 m² di superficie (ABBES & CHERMITI, 2011).

Le trappole luminose catturano gli adulti di ambedue i sessi di *T. absoluta* e sono state propo-

ste per il controllo del fitofago in serre di pomodoro (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

In Sardegna sono state sperimentate trappole a suzione con 2 tubi a luce nera di 6 W per la difesa del pomodoro in serre con reti anti-insetto. Le prove sono state condotte in due distinti cicli colturali di pomodoro, impiegando diverse densità di trappole. Nel ciclo colturale estivo-invernale sono state riscontrate basse catture di adulti alle trappole luminose, con circa il 50% di femmine. Densità di una trappola per 350 o per 500 m² hanno ridotto di circa il 50% le infestazioni sulle foglie, ma solo in una prova è stata trovata una differenza significativa fra la percentuale di frutti attaccati nelle serre difese con la tecnica delle catture massali e quelle testimone (Tab. 2). Nel ciclo colturale invernale-estivo le catture di adulti (con in media 46% di femmine) sono risultate molto elevate, soprattutto nell'ultimo mese della coltivazione. L'effetto delle catture massali, con una trappola per 700 o 1000 m², è risultato inconsistente sull'infestazione sulle foglie e sui frutti. Infatti, non è stato rilevato alcun effetto significativo sulla riduzione del numero di mine fogliari, mentre l'infestazione sui frutti è risultata più bassa nelle serre difese con trappole luminose in una prova, ma più alta in una seconda prova (Tab. 2).

CONFUSIONE SESSUALE

Prove di lotta contro *T. absoluta* sono state condotte in Europa e Sud America con alterni risultati. In Brasile, la confusione sessuale condotta su

Tabella 2 – Prove di cattura massale di *Tuta absoluta* con l'impiego di trappole luminose in serre della Sardegna (2010-2011).

	N. adulti catturati		N. mine/foglia ^a	% frutti attaccati
	Maschi	Femmine		
<i>Ciclo estivo-invernale</i>				
Controllo	–	–	1,4	2,8*
1 trappola/500 m ²	92	46	0,9	0,2
Controllo	–	–	6,1*	12,7
1 trappola/500 m ²	84	119	2,2	15,6
1 trappola/350 m ²	153	114	2,6	16,3
<i>Ciclo invernale-estivo</i>				
Controllo	–	–	2,5	4,4*
1 trappola/1000 m ²	4409	3957	2,0	2,6
Controllo	–	–	1,4	12,8
1 trappola/1000 m ²	846	1442	1,0	8,6
1 trappola/700 m ²	1582	647	0,8	21,7*

^a Dati medi riferiti all'intero ciclo colturale

* Significativo a P = 0,05

pomodoro in pieno campo con quantità di ingrediente attivo crescenti fino a 80 g/ha ha ridotto significativamente le catture dei maschi alle trappole a feromone ma non ha influenzato il danno su piante e frutti rispetto alle parcelle non trattate. I risultati non del tutto soddisfacenti sono stati addebitati alle limitate dimensioni delle parcelle, alla composizione e dose di feromone impiegata e all'alta densità di popolazione del fitofago (MICHEREFF FILHO *et al.*, 2000b). Prove di confusione sessuale in coltura protetta svolte in Spagna impiegando erogatori di feromone o un formulato micro-incapsulato hanno evidenziato l'inefficienza di questa tecnica a dosi ridotte (2 g/ha di ingrediente attivo) (MARTÍ MARTÍ *et al.*, 2010), mentre una quantità di feromone pari a 30 g/ha ha permesso di ridurre significativamente il danno causato dalla tignola del pomodoro (VACAS *et al.*, 2011). Nel corso del 2010-2011, ulteriori esperimenti sono stati svolti in Sardegna su pomodoro in serra nei cicli colturali invernale-estivo ed estivo-autunnale (COCCO *et al.*, 2012). In entrambi i cicli di coltivazione, le serre protette con 1000 erogatori/ha (60 g/ha di ingrediente attivo) hanno mostrato catture alle trappole a feromoni e danni su piante e frutti significativamente inferiori rispetto alle serre testimone (Tab. 3).

Durante il ciclo invernale-estivo, in una serra con 500 erogatori/ha (30 g/ha) non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti e comparabili con quelli di VACAS e collaboratori (2011), probabilmente a causa della differente formulazione degli erogatori o del livello di isolamento della serra. I risultati ottenuti in Spagna e in Sardegna sono concordi nell'indicare l'importanza dell'isolamento nelle serre da proteggere con la confusione sessuale, in quanto questa tecnica si è mostrata inefficace in

serre prive di reti anti-insetto (COCCO *et al.*, 2011; VACAS *et al.*, 2011).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il feromone sessuale di *T. absoluta* è stato identificato nel 1996, ma solo da qualche anno, soprattutto in seguito alla diffusione dell'insetto nell'area mediterranea, sono iniziate le ricerche sul suo potenziale impiego per le tecniche di monitoraggio e controllo.

Il monitoraggio della tignola del pomodoro è attualmente basato essenzialmente sull'esame visivo delle piante infestate. L'impiego delle trappole a feromoni, che potrebbe ridurre notevolmente i costi di campionamento, è ancora in fase sperimentale e potrà essere proposto nella pratica agricola solo quando e se saranno trovate correlazioni affidabili fra catture e infestazione nelle diverse aree agro-ecologiche di coltivazione del pomodoro. Maggiori prospettive per determinare soglie di intervento basate sulle catture di maschi alle trappole sembrano aversi nella coltura in serra, in cui le popolazioni di *T. absoluta* risultano più basse e le condizioni ecologiche sono più stabili.

La tecnica delle catture massali, con trappole a feromoni o luminose, nonostante sia molto diffusa nella pratica per la difesa del pomodoro in coltura protetta, non ha dato al momento risultati di sicura affidabilità. In questo settore saranno determinanti i miglioramenti tecnologici nelle tecniche di attrazione e cattura degli adulti (ad esempio integrando l'attrazione del feromone e delle radiazioni luminose) o nello sviluppo di tecniche attratticide (lure and kill). Migliori risultati sono stati ottenuti con la confusione sessuale; tuttavia anche l'applicazione

Tabella 3 – Prove di confusione sessuale per il controllo di *Tuta absoluta* in serre della Sardegna (2010-2011).

	N. maschi/trappola	N. mine/foglia ^a	% frutti attaccati
<i>Ciclo invernale-estivo</i>			
Controllo	196,5	1,3	3,2
500 erogatori/ha	51,0	2,4	6,7
1000 erogatori/ha	6,0*	0,3*	1,2*
Controllo	594,0	1,3	4,7
1000 erogatori/ha	5,7 *	0,2*	0,6*
<i>Ciclo estivo-invernale</i>			
Controllo	715,8	1,6	5,0
1000 erogatori/ha	36,5 *	0,3*	0,6*
Controllo	660,5	1,1	1,7
1000 erogatori/ha	47,0*	0,5*	0,4*

^a Dati medi riferiti all'intero ciclo colturale

* Significativo a P = 0,05

cazione di questa tecnica nelle serre di pomodoro dipenderà dai miglioramenti apportati ai diffusori e soprattutto dall'abbattimento dei costi di sintesi del feromone, che risultano ancora troppo elevati.

RIASSUNTO

Durante il 2010-2012 sono state condotte in Sardegna ricerche sul potenziale impiego del feromone sessuale per il controllo della tignola del pomodoro, *Tuta absoluta*. Le trappole a feromoni sono risultate utili per delineare la fenologia dell'insetto, sebbene non sia stata riscontrata una correlazione fra le catture dei maschi e le infestazioni in pieno campo. Nelle coltivazioni di pomodoro in serra invece, in condizioni di bassa densità di popolazione di *T. absoluta*, è stata trovata una correlazione significativa tra il numero di maschi catturati e quello di mine fogliari. La tecnica di cattura massale dei maschi, con l'impiego in serra di trappole ad acqua innescate con feromoni a densità crescenti fino a 100 trappole/ha, non è risultata affidabile per il controllo di *T. absoluta*. Le trappole luminose, invece, con catture di circa il 50% di femmine, hanno ridotto l'infestazione fogliare nel ciclo estivo-invernale del pomodoro (1 trappola per 350-500 m²), ma non in quello invernale-estivo (1 trappola per 700-1000 m²).

La tecnica di confusione sessuale con l'impiego di 1000 erogatori/ha (60 g di feromone) in serre dotate di reti anti-insetto è risultata efficace in entrambi i cicli colturali nel ridurre le catture di maschi alle trappole a feromoni e l'infestazione sulle foglie e sui frutti.

BIBLIOGRAFIA

- ABBES K., CHERMITI B., 2011 – *Comparison of two marks of sex pheromone dispensers commercialized in Tunisia for their efficiency to monitor and to control by mass-trapping Tuta absoluta under greenhouses*. - Tunisian J. Plant Prot., 6: 133-148.
- ABDUL RAZZAK A.S., AL-YASIRI I.I., FADHIL H.Q., 2010 – *First record of tomato borer (tomato moth) Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on tomato crop in Iraq*. - Arab Near East Plant Prot. Newsletter, 51: 34.
- AL-ZAIDI S., 2010 – *Manejo de Tuta absoluta mediante feromonas*. - Phytoma España, 217: 41.
- BATALLA-CARRERA L., MORTON A., GARCÍA-DEL-PINO F., 2010 – *Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer Tuta absoluta in laboratory and greenhouse conditions*. - BioControl, 55: 523-530.
- BENVENGA S.R., FERNANDES O.A., GRAVENA S., 2007 – *Tomada de decisão de controle da traça-do-tomateiro através de armadilhas com feromônio sexual*. - Hortic. Bras., 25: 164-169.
- CABELLO T., GALLEGO J.R., VILA E., SOLER A., DEL PINO M., CARNERO A., HERNÁNDEZ-SUÁREZ E., POLASZEK A., 2009 – *Biological control of the South American tomato pinworm Tuta absoluta (Lep.: Gelechiidae), with releases of Trichogramma achaeae (Hym.: Trichogrammatidae) in tomato greenhouses of Spain*. - IOBC/WPRS Bull., 49: 225-230.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2011 – *Prove di confusione sessuale contro Tuta absoluta su pomodoro in coltura protetta*. Atti XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Genova 13-16 giugno 2011: 214.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2012 – *Potential of mass trapping for Tuta absoluta management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps*. - IOBC/WPRS Bull., 80: 319-324.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2013 – *Control of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique*. - J. App. Entomol., 137: 16-28.
- DE OLIVEIRA A.C.R., VELOSO V.R.S., BARROS R.G., FERNANDES P.M., DE SOUZA E.R.B., 2008 – *Captura de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) com armadilha luminosa na cultura do tomateiro tutorado*. - Pesqui. Agropecu. Trop., 38: 153-157.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUYS K.A.G., BURGIO G., ARPAIA S., NARVÁEZ-VASQUEZ C.A., GONZÁLEZ-CABRERA J., RUESCAS D.C., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospect for biological control*. - J. Pest. Sci. 83: 197-215.
- FERRARA F.A.A., VILELA E.F., JHAM G.N., EIRAS A.E., PÍCANÇO M.C., ATTYGALLE A.B., SVATOŠ A., FRIGHERITO R.T.S., MEINWALD J., 2001 – *Evaluation of the synthetic major component of the sex pheromone of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - J. Chem. Ecol., 27: 907-917.
- GONZÁLEZ-CABRERA J., MOLLÁ O., MONTÓN H., URBANEJA A., 2011 – *Efficacy of Bacillus thuringiensis (Berliner) in controlling the tomato borer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Biocontrol, 56: 71-80.
- MARTÍ MARTÍ S., MUÑOZ CELDRÁN M.M., CASAGRANDE E., 2010 – *El uso de feromonas para el control de Tuta absoluta: primeras experiencias en campo*. - Phytoma España, 217: 35-40.
- MICHEREFF FILHO M., VILELA E.F., ATTYGALLE A.B., MEINWALD J., SVATOŠ A., JHAM G.N., 2000a – *Field trapping of tomato moth, Tuta absoluta with pheromone traps*. - J. Chem. Ecol., 26: 875-881.
- MICHEREFF FILHO M., VILELA E.F., JHAM G.N., ATTYGALLE A.B., SVATOŠ A., MEINWALD J., 2000b – *Initial studies of mating disruption of the tomato moth, Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) using synthetic sex pheromone*. - J. Braz. Chem. Soc., 11: 621-628.
- MOLLÁ O., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2011 – *The combined use of Bacillus thuringiensis and Nesidicoris tenuis against the tomato borer Tuta absoluta*. - Biocontrol, 56: 883-891.
- NANNINI M., FODDI F., MURGIA G., PISCI R., SANNA F., 2011 – *Insecticide efficacy trials for management of the tomato borer Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), a new tomato pest in Sardinia (Italy)*. - Acta Hort. (ISHS), 917: 47-53.
- OLIVEIRA F.A., DA SILVA D.J.H., LEITE G.L.D., JHAM G.N., PÍCANÇO M., 2009 – *Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of Lycopersicon esculentum and three cultivars to Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Sci. Hortic., 119: 182-187.
- PÍCANÇO M.C., GUEDES R.N.C., LEITE G.L.D., FONTES P.C.R., SILVA E.A., 1995 – *Incidência de Scrobipalpoides absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro sob diferentes sistemas de tutoramento e controle químico de pragas*. - Hortic. Bras., 13: 180-183.
- REYES M., ROCHA K., ALARCÓN L., SIEGWART M., SAUPHANOR B., 2011 – *Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad*. - Pestic. Biochem. Phys., 102: 45-50.
- SILVA S.S., 2008 – *Fatores da biologia reprodutiva que influenciam o manejo comportamental de Tuta absoluta*

- (Meyrick) (*Lepidoptera: Gelechiidae*). - Tesi di laurea , 63 pp. URL: <http://www.ppgea.ufrpe.br/novosite/files/dissertacoes/Shenia%20Santos%20Silva.pdf>.
- SIQUEIRA H.A.A., GUEDES R.N.C., PICAÑO M.C., 2000. *Insecticide resistance in population of Tuta absoluta (Lepidoptera, Gelechiidae)*. - Agric. For. Entomol., 2: 147-153.
- SPERANZA S., SANNINO L., 2011 – *The current status of Tuta absoluta in Italy*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of Tuta absoluta (tomato borer). URL http://archives.eppo.org/MEETINGS/2011_conferences/tuta/brochure_tuta.pdf: 21-23.
- SVATOŠ A., ATTYGALLE A.B., JHAM G.N., FRIGHETTO R.T.S., VILELA E.F., ŠAMAN D., MEINWALD J., 1996 – *Sex pheromone of tomato pest Scrobipalpuloides absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - J. Chem. Ecol., 22: 787-800.
- URBANEJA A., VERCHER R., NAVARRO V., GARCIA MARÍ F., PORCINA J.L., 2007 – *La polilla del tomate, Tuta absoluta*. - Phytoma España, 194: 16-23.
- VACAS S., ALFARO C., PRIMO J., NAVARRO-LLOPIS V., 2011 – *Studies on the development of a mating disruption system to control the tomato leafminer, Tuta absoluta Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Pest Manag. Sci., 67: 1473-1480.
- VERCHER R., CALABUIG A., FELIPE C., 2010 – *Ecología, muestreos y umbrales de Tuta absoluta (Meyrick)*. - Phytoma España, 217: 23-26.
- VIGGIANI G., FILELLA F., DELRIO G., RAMASSINI W., FOXI C., 2009 – *Tuta absoluta, nuovo lepidottero segnalato anche in Italia*. - L'Informat. Agr., 65: 66-68.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPE-RI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P., RAPISARDA C., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012 – *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta in Southern Italy*. - Bull. Insect., 65: 51-61.

ORIENTAMENTI DI LOTTA INTEGRATA PER IL CONTENIMENTO DI *TUTA ABSOLUTA* (MEYRICK) IN ITALIA

GAETANO SISCARO (*) - ANTONIO BIONDI (*) - KHALID HADDI (*) - CARMELO RAPISARDA (*)
GIOVANNA TROPEA GARZIA (*) - LUCIA ZAPPALÀ (*)

(*) Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali (DiGeSA), Università degli Studi di Catania, Via Santa Sofia, 100 - 95123 Catania; gsiscaro@unict.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 17 febbraio 2012.

Guidelines for Integrated Pest Management of Tuta absoluta (Meyrick) in Italy

The major sustainable control strategies of the Tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) are here reported. After describing the economic importance and the highlights of the biology of the exotic pest we define the most promising integrated pest management techniques. Within preventive strategies we focused the possible role of functional biodiversity to enhance the natural enemies through the promotion of ecological infrastructures; the cultural practices and exclusion techniques aimed to mitigate the susceptibility of the crop all through its development phase. The monitoring techniques based both on plant sampling and adult trapping are discussed together with the constraints of the economic thresholds. Then the potentiality of the biological control strategies is reported, with particular reference to the microbial control and most valuable strategies for the exploitation of indigenous antagonists. Finally, a feasible integrated pest management strategy of the Tomato leafminer is outlined so to ensure the best option for the protection of tomato crops in Italy.

KEY WORDS: South American tomato pinworm, integrated pest management, tomato.

INTRODUZIONE

La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), è un fitofago di primario interesse economico del pomodoro durante tutto il suo ciclo di produzione e commercializzazione. Questa specie di origine neotropicale è diffusa in Sud America, sin dal 2006 si è rapidamente insediata in Europa (URBANEJA *et al.*, 2007; DESNEUX *et al.*, 2010). In Italia è stata segnalata nel 2008 (TROPEA GARZIA *et al.*, 2009; VIGGIANI *et al.*, 2009) e si è rapidamente diffusa nelle principali regioni produttrici di pomodoro interessando sia le coltivazioni per il mercato fresco che quelle destinate alla trasformazione. Negli ultimi anni, la diffusione del fitofago si è estesa, interessando gran parte dei Paesi europei e nord africani, nonché diverse aree del Medio Oriente (DESNEUX *et al.*, 2011; TROPEA GARZIA *et al.*, 2012).

Trattasi di una specie polivoltina che mostra un'alta capacità riproduttiva (PEREYRA & SANCHEZ, 2006). Le uova sono deposte, per lo più singolarmente, su foglie e steli, le larve giovani appena nate praticano un foro per svilupparsi all'interno dei tessuti della pianta, dove permangono fino a maturità alla ricerca di siti di alimentazione. La ninfosi avviene principalmente nel terreno e gli

adulti presentano un'attività prevalentemente crepuscolare (TROPEA GARZIA *et al.*, 2012).

La distribuzione del fitofago sulla pianta dipende dalla fase di sviluppo e dalla fenologia della pianta infestata; quest'aspetto è importante per definire un metodo di campionamento affidabile e per valutare il comportamento e l'impatto degli antagonisti naturali. Si osserva infatti che, le larve e le mine si ritrovano con maggiore frequenza sulle foglie espanse nella parte media della chioma, mentre le uova tendono ad essere deposte sulle foglie espanse nella parte apicale della pianta (GOMIDE *et al.*, 2001; TORRES *et al.*, 2001).

Nel bacino del Mediterraneo, la specie infesta altre solanacee sia coltivate (melanzana, peperone, patata e tabacco) che spontanee, come *Solanum nigrum* L., *S. lyratum* Thunberg, *Lycopersicon hirsutum* L., *Datura stramonium* L. e *Lycium chinense* Mill.; danni occasionali sono stati riportati anche su fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) e uciuva o ribes del Capo (*Physalis peruviana* L.) (TROPEA GARZIA *et al.*, 2012).

La disponibilità di piante ospiti alternative è un elemento importante della dinamica di popolazione della specie, che ne consente la permanenza per l'intero anno anche in assenza di colture di pomodoro; questa capacità deve essere considerata

con attenzione quando si predispongono strategie di controllo integrato.

Nell'area di origine, la specie è considerata il fitofago-chiave del pomodoro a causa degli ingenti danni economici che può indurre se non adeguatamente contenuta (SILVA *et al.*, 2011); in questi Paesi, la strategia di controllo di *T. absoluta* è basata tuttora sul controllo chimico. Tuttavia, gli insetticidi non hanno sempre piena efficacia sia a causa del comportamento endofitico degli stadi larvali sia per la tendenza della specie alla rapida selezione di popolazioni resistenti (SIQUEIRA *et al.*, 2000a, b; LIETTI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011; HADDI *et al.*, 2012).

Anche in Italia, il contenimento delle infestazioni di *T. absoluta* è ancora in gran parte affidato agli insetticidi (SANNINO & ESPINOSA, 2010) ed è crescente la preoccupazione tra gli addetti al settore che questo approccio possa andare a detrimento dei piani di controllo integrato messi a punto efficacemente nel corso degli ultimi decenni.

Diverse sono le tecniche e le strategie di controllo eco-sostenibili applicate ovvero in corso di valutazione in Europa nelle aree di recente introduzione. Infatti, una crescente importanza stanno assumendo le applicazioni di controllo biologico e l'uso di feromoni (BATALLA-CARRERA *et al.*, 2010; DESNEUX *et al.*, 2010; MOLLÁ *et al.*, 2011; ZAPPALÀ *et al.*, 2012a, b, c; COCCO *et al.*, 2012b).

In questo lavoro si passano in rassegna le strategie di controllo integrato più promettenti applicate nel bacino del Mediterraneo e in Italia per il contenimento della Tignola del pomodoro, *T. absoluta*, e si delineano anche nuove prospettive applicative.

IMPORTANZA ECONOMICA

A causa dell'invasione della Tignola del pomodoro, nel corso degli ultimi anni, in tutti i Paesi di nuova introduzione, il costo di produzione del pomodoro si è sensibilmente innalzato per la necessità di sviluppare e applicare nuove strategie di protezione e provvedere a un attento monitoraggio del fitofago sia in campo che in post-raccolta (SANNINO & ESPINOSA, 2010; DESNEUX *et al.*, 2011; USDA, 2011).

Il pomodoro è la pianta ospite preferita per *T. absoluta* pur se con diversa suscettibilità varietale. L'attività trofica larvale riduce la capacità di fotosintesi delle piante, il loro normale sviluppo e quindi la produttività. La pianta è suscettibile all'attacco in tutte le fasi di sviluppo e allorché le larve si sviluppano all'interno del fusto principale di giovani piantine in semenzaio, le lesioni prodotte

possono causarne il totale disseccamento (PEREYRA & SÁNCHEZ, 2006; TROPEA GARZIA *et al.*, 2012).

Le larve danneggiano i frutti con intensità direttamente correlata al livello d'infestazione e possono causare il fallimento economico dell'intera coltura (DESNEUX *et al.*, 2010). Visto che la penetrazione delle larve nei frutti avviene in genere attraverso piccoli fori spesso occultati dai sepali, il rilevamento delle prime infestazioni può essere incerto o sottostimato. Per questo motivo, nei centri di stoccaggio e commercializzazione, si può verificare il declassamento commerciale di interi lotti di pomodoro. Questa fase rappresenta un punto cruciale per l'industria del pomodoro e l'intero processo di distribuzione sul mercato (USDA, 2011). Inoltre, la commercializzazione di pomodori accidentalmente infestati è una tra le ipotesi più plausibili della diffusione di questo fitofago a livello globale (DESNEUX *et al.*, 2011).

STRATEGIE DI DIFESA INTEGRATA

L'applicazione di razionali strategie di difesa integrata è considerata ormai una scelta non più derogabile in ambito europeo; la ben nota direttiva 2009/128/CE infatti "(...) *istituisce un quadro per realizzare un uso sostenibile dei pesticidi riducendone i rischi e gli impatti sulla salute umana e sull'ambiente e promuovendo l'uso della difesa integrata e di approcci o tecniche alternativi, quali le alternative non chimiche ai pesticidi.*" Secondo quanto previsto da questa normativa, tutti gli stati membri sono obbligati ad attuare piani d'azione nazionali entro l'1 gennaio 2014.

Gli stessi principi fondanti della Difesa Integrata delle Colture, universalmente nota come *Integrated Pest Management* (IPM), nonostante pongano le loro basi scientifiche su studi condotti ormai diversi decenni orsono (STERN *et al.*, 1959) e che hanno inizialmente definito l'insieme di queste tecniche come un "*metodo di controllo dei parassiti che combina e integra il controllo biologico e chimico (...)*", rimangono tuttora validi.

In seguito è stata ridefinita come una strategia che prevede "*l'uso di tutti i mezzi economicamente, ecologicamente e tossicologicamente giustificabili per mantenere i parassiti sotto la soglia economica, con enfasi sull'uso di forme di controllo biologico naturale e misure preventive*" (Definizione EPP0, in DEHNE, H.W. & SCHÖNBECK F., 1994). Il concetto è stato anche più recentemente ripreso e ampliato, includendo la difesa integrata nel più comprensivo concetto di Produzione Integrata (*Integrated Production*) che identifica un "*Sistema di coltivazione che produce alimenti e altri prodotti*

di alta qualità mediante l'uso di risorse naturali e di meccanismi di regolazione per sostituire gli agenti inquinanti e assicurare coltivazioni sostenibili" (BOLLER *et al.*, 2011).

In un contesto di agricoltura sostenibile, tali tecniche si concretizzano innanzitutto nell'applicazione di *strumenti di prevenzione* delle infestazioni attraverso strategie di protezione indiretta delle piante, quali: l'uso ottimale delle risorse naturali disponibili mediante razionali scelte agronomiche e gestionali della coltura e la limitazione di quelle tecniche colturali a forte impatto ambientale; la protezione e il potenziamento attraverso strategie di lotta biologica conservativa (nota anche come *habitat management*) delle componenti biocenotiche antagoniste naturalmente presenti all'interno delle colture e nelle sue immediate vicinanze. Inoltre è indispensabile dotarsi di validi *sistemi di monitoraggio e previsione* quali strumenti decisionali per l'adozione di razionali *misure di protezione* diretta delle piante. Queste ultime dovrebbero privilegiare l'uso di antagonisti biologici (entomofagi/entomopatogeni), garantendo il minor ricorso possibile alla lotta chimica che comunque dovrebbe considerare prodotti fitosanitari quanto più possibile selettivi nei confronti degli organismi *non target*.

Nonostante siano basate su un consolidato background scientifico (VAN LENTEREN & WOETS, 1988), da più parti si giudica che tali strategie non siano adeguatamente diffuse e che notevoli progressi devono esser fatti per una loro applicazione su ampia scala; infatti, molto spesso piuttosto si assiste all'applicazione di una versione "*semplificata*" di IPM, che in pratica si traduce in *Integrated Pesticides Management* (EHLER, 2006).

Nel caso di *T. absoluta*, le suddette strategie si concretizzano in una serie di misure di controllo che vengono di seguito sinteticamente illustrate.

MISURE PREVENTIVE

La conoscenza delle componenti antagoniste indigene e in particolare dei potenziali entomofagi e le strategie per la loro conservazione, devono essere considerati come una priorità in attuazione della difesa di un fitofago esotico (VAN LENTEREN & WOETS, 1988). Diversi parassitoidi e predatori indigeni sono stati segnalati su *T. absoluta* nel bacino del Mediterraneo (DESNEUX *et al.*, 2010; GABARRA & ARNÒ, 2010; MOLLÁ *et al.*, 2010; LONI *et al.*, 2011; FERRACINI *et al.*, 2012; URBANEJA *et al.*, 2012; ZAPPALÀ *et al.*, 2012a). Questi limitatori naturali si sono rapidamente adattati al nuovo parassita e potenzialmente hanno un ruolo centra-

le come fattori di limitazione nei confronti della Tignola del pomodoro. Le specie di parassitoidi riscontrati possono anche svilupparsi a spese di ospiti alternativi che vivono sulla flora spontanea. I dati fin qui raccolti indicano che tendenzialmente la loro abbondanza è correlata alla presenza di flora spontanea e colture sempreverdi che costituiscono un elemento fondamentale della biodiversità funzionale (LANDIS *et al.*, 2000; ALTIERI & NICHOLS, 2004).

In tale ambito, andrebbe approfondito il ruolo ecologico che rivestono alcune piante spontanee diffuse nei nostri ambienti e già segnalate come piante ospiti di fitofagi alternativi. Tra le diverse essenze segnalate, si pone l'attenzione in particolare su *S. nigrum* L., *Parietaria officinalis* L., *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. Ai fini applicativi sarebbe interessante verificare la costituzione di possibili reti trofiche funzionali in prossimità e all'interno delle colture per agevolare la permanenza in ambiente di componenti antagoniste utili al contenimento non solo di *T. absoluta* ma anche di altri importanti fitofagi quali aleirodi, afidi e acari.

Sebbene resti da chiarire l'effettivo ruolo rivestito dalla biodiversità funzionale e dalle tecniche di gestione dell'*habitat*, è comunque plausibile che le popolazioni del fitofago possano essere significativamente ridotte dall'azione di contenimento svolta dalla comunità dei nemici naturali indigeni (GARDINER *et al.*, 2009). Pertanto, sono auspicabili indagini per migliorare le conoscenze sulle biocenosi antagoniste indigene ottimizzando la loro attività attraverso una gestione razionale dell'*habitat* all'interno e all'esterno della coltura (LANDIS *et al.*, 2000; PERDIKIS *et al.*, 2007, 2011). In tal senso, una precoce installazione e mantenimento della comunità antagonista, o di alcuni suoi componenti, all'interno dell'ambiente coltivato può essere artificialmente ottenuto anche con l'uso di cosiddette *banker plants*. Queste costituiscono un sistema tri-trofico di piante non produttive artificialmente infestate da un fitofago, che funge da ospite alternativo per l'entomofago di cui si voglia agevolare l'insediamento (FRANK, 2010).

Nell'ambito delle misure preventive di tipo più prettamente agronomico, sono da considerare la rimozione tempestiva dei resti della coltura antecedente e la loro distruzione, al fine di ridurre la permanenza in campo di materiale infestato, che rappresenta un'importante fonte d'inoculo per le future coltivazioni. Inoltre, nel rispetto delle più elementari buone pratiche agricole (GAP - *Good Agricultural Practices*) è indispensabile adottare adeguate rotazioni colturali con sufficienti intervalli temporali tra le varie coltivazioni di pomodoro e impiegare materiale di riproduzione indenne

da infestazioni. Nel caso di colture protette, in fase di pre-impianto, considerata la possibile permanenza nel terreno di crisalidi di *T. absoluta* derivanti dalla precedente coltura, un intervento di solarizzazione del terreno può costituire un valido strumento di contenimento del fitofago. Mentre, l'installazione preventiva di trappole cromotropiche gialle per la cattura di adulti eventualmente presenti nella serra si è dimostrata efficace nel ridurre i livelli d'infestazione ad inizio ciclo colturale in coltura protetta. Tra le strategie di controllo preventivo è da considerare l'adozione di tutti gli accorgimenti volti a limitare l'accidentale introduzione di adulti dall'esterno quali, la corretta applicazione di *reti escludi insetto* alle aperture e di doppie porte agli ingressi principali delle serre (MONSERRAT DELGADO, 2009; SANNINO & ESPINOSA, 2010).

Uno strumento che ha sicuramente portato soddisfacenti risultati nella prevenzione di molti fitofagi e patogeni del pomodoro è l'impiego di varietà resistenti o meno suscettibili, ma nel caso di *T. absoluta*, nulle sono state le applicazioni in questa direzione. Infatti, malgrado siano state individuate alcune varietà brasiliane in grado di sintetizzare metaboliti secondari che ostacolano lo sviluppo di questo fitofago (GILARDON *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2009), attualmente non sono disponibili varietà commerciali di pomodoro resistenti e/o tolleranti a *T. absoluta*.

SISTEMI DI MONITORAGGIO E SOGLIE ECONOMICHE

Diversi studi hanno accertato che sussiste una diretta relazione tra il livello di produzione, l'entità d'infestazione di *T. absoluta* e le catture di maschi registrate alle trappole a feromone sessuale (BENVENGA *et al.*, 2007; DESNEUX *et al.*, 2010); di conseguenza i principali schemi di monitoraggio e soglie d'intervento chimico per il controllo della Tignola del pomodoro sono fondamentalmente basati sull'uso di trappole a feromone sessuale, a cui deve tuttavia accompagnarsi un attento monitoraggio visivo su pianta.

Considerata la biologia della specie, è auspicabile seguire fin dal trapianto l'andamento dei voli e l'infestazione sulla coltura. Quest'ultima si differenzia in funzione dello sviluppo della coltura ed è quindi opportuno osservare l'intera pianta fino a 50-70cm di sviluppo, la metà superiore fino a 150cm e solo il terzo superiore oltre 150cm (TORRES *et al.*, 2001). Le osservazioni devono riguardare soltanto l'infestazione attiva, considerando cioè le mine e le erosioni con larve vive presenti sul 2% delle piante. Il campione può essere sensibilmente ridotto per col-

ture in pien'aria, applicando in questo caso il campionamento su appezzamenti omogenei.

Per il monitoraggio dei voli dei maschi s'impiegano trappole al feromone sessuale di tipo Traptest in misura di una trappola fino a 3.500 m² e di 2-4 trappole/ha per superfici superiori, badando bene di collocarle ad un'altezza di 40-120 cm dal suolo (in funzione dello sviluppo della coltura), in modo tale da intercettare il volo del maggior numero possibile di adulti (TROPEA GARZIA *et al.*, 2012). Anche se al momento non sono state definite a livello sperimentale delle soglie economiche d'intervento per la Tignola del pomodoro in Italia, nelle aree d'origine del fitofago e in Spagna sono state adottate soglie economiche d'intervento che prendono in considerazione diversi parametri. Nelle coltivazioni serri-cole spagnole e argentine si considera ad esempio l'entità delle catture settimanali di maschi per trappola, valutando un generico livello di rischio per coltura variabile da basso (catture inferiori a 3), a moderato (catture inferiori a 30) ed elevato (catture superiori a 30) mentre in Cile la soglia considerata è di 70 catture giornaliere. In Brasile, invece, per le coltivazioni in pieno campo, si fa riferimento ad una soglia economica d'intervento orientativa di 45 catture giornaliere per trappole. A parte l'entità e l'andamento delle catture di maschi, in Sud America viene anche considerata una soglia d'infestazione di 2 foglioline con mine attive; mentre in Colombia la soglia economica d'intervento viene fissata alla presenza di 26 larve (mine) per pianta, ovvero l'8% di defogliazione (ESTAY, 2000; BENVENGA *et al.*, 2007; MONSERRAT DELGADO, 2009; DESNEUX *et al.*, 2010; VERCHER *et al.*, 2010).

MISURE DI CONTROLLO

Confusione/disorientamento sessuale

Il feromone sessuale di *T. absoluta* è stato identificato chimicamente come una miscela 90:10 (3E,8Z,11Z)-tetradecatrien-1-yl acetate and (3E,8Z)-tetradecadien-1-yl acetate e il suo potere attrattivo è stato positivamente testato in Paesi extraeuropei sia in serra che in pieno campo (FILHO *et al.*, 2000). Tuttavia, sperimentazioni preliminari di applicazioni di *disturbo dell'accoppiamento* condotte sia in pieno campo sia in coltura protetta hanno fornito risultati controversi. Successive prove, condotte in Spagna e in Italia utilizzando varie tipologie di diffusori (NAVARRO LOPIS *et al.*, 2010; MARTÌ MARTÌ *et al.*, 2010; VACAS *et al.*, 2011; COCCO *et al.*, 2012b), hanno evidenziato un soddisfacente livello di contenimento ma se applicate in serre adeguatamente isolate al fine di prevenire o almeno limitare accidentali introduzioni di

adulti dall'esterno; resta tuttavia da definire la sostenibilità economica della tecnica.

Recenti studi hanno rivelato la capacità di esemplari di *T. absoluta* allevati in laboratorio di riprodursi per partenogenesi accidentale (CAPARROS MEGIDO *et al.*, 2012); l'origine di questo fenomeno non è stato ancora chiarito e sebbene non sia stata ancora evidenziata la presenza di popolazioni partenogenetiche in natura, questo ritrovamento potrebbe avere sostanziali implicazioni sull'efficacia di queste tecniche.

Cattura massale

Ai fini della cattura massale degli adulti, possono essere impiegate trappole basate su tre sistemi attrattivi: feromonico, luminoso e misto. Anche queste trappole devono essere collocate fin dal trapianto della coltura a non più di 80 cm da terra e in ragione di 2-3/1000m² di serra. Sono disponibili in commercio varie tipologie, anche se molte varianti di fattura artigianale sono utilizzate in campo. Le trappole innescate con il feromone sessuale sono costituite da un recipiente di circa 40 cm di diametro e 20 cm di altezza contenente acqua miscelata a un blando tensioattivo (olio e/o detergente) per impedire ai maschi caduti nell'acqua di sfuggire; il dispenser è collocato poco al disopra del livello dell'acqua.

Diverse tipologie di trappole luminose sono adottate, prevalentemente su base empirica. Le differenze riguardano sia la fonte luminosa che il funzionamento; si usano in genere lampade fluorescenti ovvero fonti di luce ultravioletta, queste ultime in genere sono abbinate a griglie elettrificate o aspiratori per l'eliminazione degli adulti attratti dalla trappola. Queste trappole vengono attivate normalmente durante la notte e, sfruttando la fototassi positiva degli adulti di entrambi i sessi di *T. absoluta*, ne consentono una massiccia eliminazione. Prove sperimentali condotte per valutare l'efficacia di queste trappole nel contenimento delle infestazioni in campo hanno fornito risultati variabili in funzione di fattori ambientali e colturali (COCCO *et al.*, 2012a). Le trappole a feromoni hanno dimostrato di poter garantire un sufficiente livello di protezione della coltura. Tuttavia, l'aumento della loro densità pur causando un aumento del numero di maschi catturati per trappola, non riduce significativamente la presenza di femmine fecondate e quindi le infestazioni; ciò viene attribuito alla capacità da parte dei maschi di accoppiamenti multipli.

Diversamente, le trappole luminose catturano anche un'alta percentuale di femmine e risultano in genere più efficaci. A bassa/moderata densità di popolazione (ciclo colturale estivo-vernino), le

trappole luminose sono efficaci nel ridurre il numero di mine fogliari mentre, con livelli di densità medi/alti (cicli colturali invernali/estivi) anche le trappole luminose sono da sole inefficaci nel controllare le infestazioni (COCCO *et al.*, 2012a). Molto più diffuse sono invece le trappole a funzionamento "misto" ovvero feromoni/luce che vengono collocate sia all'interno che all'esterno delle serre e, in virtù delle maggiori capacità di cattura, sono anche più apprezzate dagli operatori. Infatti, l'associazione della fonte luminosa e del feromone assicura la cattura di entrambi i sessi consentendo maggiori livelli di protezione della coltura. In campo si possono riscontrare diverse tipologie di trappole miste molto spesso di fattura artigianale ma ultimamente in commercio sono disponibili anche modelli a funzionamento automatico e alimentati ad energia solare. Queste trappole, pur se dotate di una fonte luminosa a led a bassa intensità, permettono di ottenere elevati livelli di cattura all'interno della serra. Prove comparative condotte in ambienti serricoli siciliani (SISCARO, dati non pubblicati) hanno dimostrato una maggiore efficacia di queste trappole rispetto a quelle con lampade elettriche tradizionali, nonostante il ridotto periodo di attivazione. Inoltre, considerata la ridotta intensità luminosa, si riducono i rischi di attrazione di adulti dall'esterno della serra, cosa che in genere ne scoraggia la collocazione all'interno degli apprestamenti protetti.

L'efficacia di questi dispositivi in ambiente protetto è comunque strettamente vincolata alle condizioni d'isolamento della serra in modo da ridurre l'accesso di adulti dall'esterno della struttura (MONSERRAT DELGADO, 2009).

Più di recente sono stati messi a punto altri dispositivi per la cattura massale che utilizzano non solo l'attrattivo feromonico ma anche la componente cromoattrattiva; si tratta di fasce collanti di colore giallo innescate con il feromone sessuale di *T. absoluta*, larghe circa 40 cm e che possono essere collocate all'interno delle serre per diversa lunghezza. Queste trappole, in virtù della loro colorazione, possono essere utilmente impiegate anche per la cattura massale di altri fitofagi, quali aleirodi e ditteri fillominatori. Per evitare la cattura di entomofagi eventualmente rilasciati, è possibile ricorrere a fasce collanti sempre attivate con il feromone ma trasparenti (AL-ZAIDI, 2011).

Attract and kill

Nell'ambito delle strategie d'impiego dei feromoni, appare particolarmente interessante e innovativa la tecnica dell'*attract and kill* che si può realizzare mediante l'applicazione, all'interno di serre ben isolate, di pannelli gialli ricoperti da un'emul-

sione cerosa impregnata di piretroide (cipermetrina) e innescati con il feromone sessuale della tignola (AL-ZAIDI, 2011). Considerata, anche in questo caso, la potenziale dannosità nei confronti di entomofagi, il loro utilizzo deve essere attentamente valutato nel caso di rilasci di entomofagi.

Controllo biologico

In Italia e in tutto il bacino del Mediterraneo, soprattutto nelle aree di più recente colonizzazione, la strategia di contenimento più comunemente adottata nei confronti di *T. absoluta* permane il controllo chimico, nonostante le corpose evidenze scientifiche che ne documentano i rischi tossicologici per gli operatori, l'impatto negativo sull'ambiente in generale e, in particolare, sull'entomofauna utile nonché il rischio connesso all'insorgenza di ceppi resistenti (URBANEJA *et al.*, 2012). In questo contesto, lo sviluppo di tecniche di controllo biologico rappresenta uno dei più promettenti strumenti per la gestione sostenibile di questo fitofago stante anche il fatto che, come già premesso, sin dalle prime fasi della sua introduzione in Italia, diversi antagonisti naturali indigeni si sono rapidamente adattati a vivere a spese del fitofago esotico e che diversi agenti microbiologici sono risultati particolarmente efficaci nei suoi confronti.

Agenti microbiologici – Anche a causa della mancanza di dati sperimentali attendibili, inizialmente i formulati commerciali microbiologici sono stati utilizzati solo nei casi di bassi livelli d'infestazione di *T. absoluta*. Le numerose sperimentazioni di campo e gli studi scientifici hanno successivamente dimostrato la notevole patogenicità di diversi isolati microbiologici nei confronti del fitofago tale da divenire una valida alternativa agli insetticidi di sintesi. Diversi agenti entomopatogeni sono riconosciuti efficaci per il contenimento delle infestazioni della Tignola del pomodoro quali funghi, nematodi e in particolare batteri.

Tra i funghi, formulati a base di *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metharbizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin sono ritenuti efficaci soprattutto nei confronti delle uova a carico delle quali in laboratorio possono indurre mortalità variabili dal 60 all'80% (RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

In prove condotte in Spagna con i nematodi entomopatogeni *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Nematoda: Steinernematidae), *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae), sia in condizioni di laboratorio che in campo (BATALLA-CARRERA *et al.*, 2010), sono stati osservati livelli di mortalità larvale fino al 100% con tassi di parassitizzazione a carico di larve endofitiche di *T. absoluta* variabili dal 77 al 92%; questi

dati hanno dimostrato che questo approccio microbiologico è in grado di proteggere in modo soddisfacente la coltura, riducendo l'infestazione dell'87-95%. In altri saggi di valutazione di efficacia è stato anche osservato che il trattamento con nematodi entomopatogeni non solo ha un'efficacia paragonabile a quella di un bioinsetticida usato anche in agricoltura biologica, quale lo spinosad, ma si è anche stimato che i costi di trattamento sono stati simili per nematodi e spinosad (JACOBSON & MARTIN, 2011).

Altri esperimenti condotti per valutare la compatibilità di questi nematodi con alcuni insetticidi comunemente impiegati nel bacino del Mediterraneo contro *T. absoluta* (flubendiamide, chlorantraniliprole e metaflumizone) hanno evidenziato un maggiore suscettibilità di *H. bacteriophora* mentre *S. feltiae* e *S. carpocapsae* hanno dimostrato di essere tolleranti ai trattamenti chimici facendo registrare tassi di sopravvivenza variabili dall'85,3 al 100% (GARCIA DEL PINO *et al.*, 2011). Nel complesso, questi dati indicano che è possibile integrare efficacemente l'impiego di nematodi entomopatogeni con altre strategie di controllo.

Tra gli agenti entomopatogeni utilizzabili nella lotta contro *T. absoluta*, particolare significato applicativo assume il batterio *Bacillus thuringiensis* Berliner (Firmicutes: Bacillaceae) (GIUSTOLIN *et al.*, 2001; NIEDMANN & MEZA-BASSO, 2006; GONZÁLEZ-CABRERA *et al.*, 2011, ZAPPALÀ *et al.*, 2012b). Formulazioni insetticide a base di questo agente microbico sono state utilizzate da decenni per controllare insetti, perché sono considerati ecosostenibili, innocui per gli esseri umani e altri vertebrati e altamente compatibili con l'uso di antagonisti naturali (SCHNEPF *et al.*, 1998; MOLLÁ *et al.*, 2011; BIONDI *et al.*, 2012a, 2012b).

Come è ben noto, si tratta di batteri sporigeni che agiscono solo per ingestione nei confronti delle larve di diversi fitofagi, principalmente lepidotteri, provocandone la morte nel giro di 3-4 giorni a seguito del disfacimento della parete intestinale provocata dal rilascio di specifiche endotossine (Δ -endotossine). Questi insetticidi, non avendo citotropicità ed essendo fotodegradabili, devono essere tempestivamente irrorati sulla coltura contro i primi stadi larvali del fitofago. Inoltre, considerato il loro meccanismo d'azione selettivo e la loro rapida degradazione, sono consigliati in trattamenti pre-raccolta e per mitigare l'insorgenza di fenomeni di resistenza. In Italia, sono attualmente disponibili formulati commerciali a base delle sottospecie *aizawai* (ceppo GC91) e *kurstaki* (ceppo SA-12) autorizzati per trattamenti su coltura di pomodoro.

Nel caso di *T. absoluta*, queste formulazioni sono state inizialmente raccomandate nel bacino del Mediterraneo solo con modesti livelli di infes-

tazione. Prove condotte in laboratorio e su colture di pomodoro in serra e in pieno campo in Spagna hanno recentemente dimostrato che queste formulazioni sono molto efficaci sulle larve e soprattutto sulle prime età, con una riduzione del danno prossima al 90%. L'efficacia di questi formulati varia in funzione della varietà usata, del ceppo ma anche della concentrazione di spore presente nel prodotto commerciale. Applicazioni a intervalli settimanali ad una concentrazione di 90,4 MUI/L di formulato hanno consentito il contenimento della tignola per tutta la stagione senza alcun trattamento aggiuntivo, anche a livelli elevati d'infestazione; inoltre, i trattamenti sono risultati pienamente compatibili con l'attività di miridi predatori (GONZALEZ GABRERA *et al.*, 2011). Infatti, è stato visto che trattamenti precoci non hanno interferito con l'insediamento di *N. tenuis* che preferisce predare uova di *T. absoluta*; una volta che il miride si riproduce sulla coltura non sarebbero necessari altri trattamenti (MOLLÀ *et al.*, 2011; URBANEJA *et al.*, 2012).

In uno studio condotto in Italia, è stata valutata in condizioni di laboratorio e di laboratorio esteso l'efficacia (in termini di tossicità acuta e riduzione di attività di alimentazione) di ceppi di *B. thuringiensis* disponibili in commercio, somministrati sia per ingestione che per contatto a giovani larve di *T. absoluta* (ZAPPALÀ *et al.*, 2012b). In condizioni di laboratorio, la formulazione commerciale contenente il ceppo *kurstaki* SA12 è risultata la più efficace in termini di mortalità indotta e riduzione del danno. Questa tendenza è stata evidenziata anche nelle prove condotte in condizioni di laboratorio esteso; i dati ottenuti in queste prove trovano riscontro in studi condotti in Spagna (GONZÁLES CABRERA *et al.*, 2011) e validano l'inserimento di questi preparati commerciali nei programmi IPM anche in Italia.

Insetti entomofagi – Riguardo alle strategie di controllo biologico basate sull'impiego di predatori e parassitoidi, dettagliate informazioni possono essere reperite nei lavori specifici presenti in questo stesso volume. Sembra tuttavia utile fornire una visione d'insieme sulle attuali strategie di controllo biologico e le più promettenti prospettive applicative. Sulla base degli studi fin qui condotti e delle esperienze di campo maturate a 6 anni dall'invasione di *T. absoluta* nel bacino del Mediterraneo, si può affermare che i risultati più significativi sono stati raggiunti grazie all'applicazione di strategie aumentative e/o conservative di nemici naturali indigeni, anche coadiuvate da trattamenti larvicidi microbiologici.

Nel Mediterraneo sono state ad oggi segnalate un numero di specie antagoniste sensibilmente inferiore rispetto a quelle già riportate in Sud America,

che ammonterebbero a circa 50 parassitoidi e 40 predatori. Tuttavia è plausibile ipotizzare che la coorte degli antagonisti indigeni di *T. absoluta* aumenterà nei prossimi anni anche nelle aree di nuova colonizzazione. Qui, diversamente a quanto avviene in Sud America, dove i parassitoidi assumono maggiore significato, i predatori generalisti appaiono al momento gli entomofagi più diffusi, vista la loro grande capacità di adattamento alle cosiddette *specie aliene* (DESNEUX *et al.*, 2010; LUNA *et al.*, 2012; URBANEJA *et al.*, 2012).

Dai recenti rilievi condotti in diverse regioni italiane (LONI *et al.*, 2011; FERRACINI *et al.*, 2012; ZAPPALÀ *et al.*, 2012) si evidenzia che nell'ambito dei parassitoidi indigeni, diverse specie di Eulofidi, Ichneumonidi e Braconidi si sono prontamente adattate al nuovo ospite, sviluppandosi a carico delle larve. Appare interessante altresì rilevare che sono stati anche ritrovati rari Trichogrammatidi oofagi e sempre con un bassissima incidenza. Si ritiene che quest'aspetto meriti ulteriori approfondimenti e indagini in Italia, considerata l'importanza che può assumere tale fattore di mortalità nell'ambito della dinamica di popolazione. Di seguito si illustrano le strategie di lotta biologica a *T. absoluta* ritenute più promettenti, considerate anche le attuali possibilità applicative nel nostro Paese.

Nell'ambito del genere *Necremnus* sono state recentemente segnalate a carico di *T. absoluta* alcune specie ritenute promettenti nel controllo biologico nel mediterraneo e in Italia (MOLLÀ *et al.*, 2008, 2010; GABARRA & ARNÓ, 2010; BELDA *et al.*, 2011; DELVARE *et al.*, 2011; FERRACINI *et al.*, 2012; ZAPPALÀ *et al.*, 2012). Il genere, che include parassitoidi larvali ectofagi generalisti di diversi gruppi di fitofagi, è attualmente oggetto di revisione sistematica; inoltre sono tuttora scarse le informazioni relative alla biologia di questo gruppo di eulofidi.

Necremnus prope artynes (Walker) è fra i più diffusi parassitoidi larvali rivenuti nel corso di rilievi condotti in Liguria, Campania, Sardegna e Sicilia sia in pieno campo che in serra (FERRACINI *et al.*, 2012; ZAPPALÀ *et al.*, 2012); in Italia ne è stato preso in considerazione l'allevamento massale per effettuare rilasci inoculativi in colture protette dove può essere associato con l'impiego di miridi predatori e trattamenti microbiologici a base di *B. thuringiensis*, come già efficacemente applicato in Spagna (BELDA *et al.*, 2011; URBANEJA *et al.*, 2012). Prove di laboratorio hanno evidenziato che il parassitoide, grazie anche alla sua elevata attività di *host feeding*, può indurre mortalità a carico delle larve di prima e seconda età di *T. absoluta* superiori al 70% (FERRACINI *et al.*, 2012); questo parassitoide, sebbene con modesti livelli di parassitiz-

zazione, è stato spontaneamente ritrovato anche in serre di pomodoro sottoposte a trattamenti insetticidi (ZAPPALÀ *et al.*, 2012a).

Fra i braconidi presenti nel bacino del Mediterraneo, *Bracon nigricans* Szépligeti è stato ritrovato su *T. absoluta* in tre paesi: Spagna, Giordania e Italia (URBANEJA *et al.*, 2012). Questa specie, largamente diffusa nella regione Palearctica, è in grado di svilupparsi a carico di diverse specie di lepidotteri, tra cui il gelechiidae *Phthorimaea operculella* (Zell.), la Tignola della patata (ZAPPALÀ *et al.*, 2012a). La sua biologia e comportamento, sono stati recentemente descritti in laboratorio e questa specie ha dimostrato di essere un ectoparassitoide gregario di larve mature di *T. absoluta* e di utilizzare le larve dell'ospite sia come substrato di ovideposizione che come substrato di *host-feeding*. I risultati di questo studio sono stati presentati nel medesimo incontro da L. Zappalà e il contributo è pubblicato in questo stesso volume.

Per quanto riguarda i predatori, i miridi diciphini *Nesidiocoris tenuis* (Reuter), *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) e *Dyciphus errans* (Wolff) sono considerati gli antagonisti più efficaci e diffusi in tutta l'area di recente diffusione del bacino del Mediterraneo e del Medio Oriente. In particolare *N. tenuis* e *M. pygmaeus*, predatori generalisti già da diversi anni impiegati e commercializzati per il controllo di aleirodi in serra, sono stati positivamente adottati in programmi di lotta integrata e biologica contro *T. absoluta*, di cui predano attivamente preferibilmente uova e primi stadi larvali (HARPAZ *et al.*, 2011; KILIÇ, 2011; CALVO *et al.*, 2012; URBANEJA *et al.* 2012). Anche *D. errans* mostra un'elevata attività predatoria nei confronti di uova e larve di prima età di *T. absoluta* e, come per gli altri due miridi, dovrebbe essere introdotto precocemente in coltura per agevolarne il rapido insediamento. Anche in questo caso, si procede mediante la tecnica dei lanci inoculativi in ragione di 1-5 esemplari/m², che devono essere opportunamente rilasciati in siti selezionati della serra unitamente a substrato alimentare integrativo a base di uova di *Ephestia kuehniella* Zeller.

L'integrazione dei rilasci inoculativi di *N. tenuis* con trattamenti microbiologici a base di *B. thuringiensis* appare una strategia promettente, anche se occorre modulare l'intervento alle condizioni colturali. In cicli colturali autunno-vernini senza riscaldamento, il tasso di riproduzione del miride non è sufficiente a raggiungere densità di popolazione soddisfacenti. In questo caso, per favorire l'insediamento e la diffusione di *N. tenuis* nella coltura, risulta efficace l'inoculo precoce del predatore già in vivaio (*predator in first*). Questa tecnica, che prevede il rilascio di 0,5 esemplari/pianta,

si è sviluppata a seguito della positiva sperimentazione condotta in Spagna, ed è stata poi applicata anche in vari Paesi del Nord Africa e del Mediterraneo, compresa l'Italia (BELDA *et al.*, 2011; CALVO *et al.*, 2012). Esperimenti dimostrano che l'azione predatoria del miride in queste condizioni è in grado di proteggere la coltura senza bisogno di integrazione di ulteriori rilasci o trattamenti microbiologici (CALVO *et al.*, 2012).

Tuttavia, nelle serre fredde del mediterraneo si riportano frequentemente danni alla coltura di pomodoro da parte di *N. tenuis*, soprattutto a carico dei trapianti primaverili-estivi, allorché le popolazioni del miride raggiungono elevate densità anche a causa dell'accidentale introduzione dall'esterno della serra. A causa dell'attività trofica degli stadi preimmaginali del miride, si osserva la comparsa di imbrunimenti e anellature necrotiche che portano alla rottura del germoglio, con inevitabili ripercussioni sul normale sviluppo della pianta. Tale comportamento sembra indotto dalla necessità di reperimento di nutrienti in assenza di prede (CALVO *et al.*, 2009; CASTAÑE *et al.*, 2011). Di conseguenza la disponibilità di altre prede (aleirodi, acari, etc) nella coltura di pomodoro o nelle sue immediate vicinanze, l'aggiunta di substrati alimentari artificiali e di piante non coltivate altrettanto attrattive, sono condizioni necessarie per una corretta gestione di questi predatori zoo-fitofagi (CALVO *et al.*, 2012). In tal senso sarebbe interessante investigare l'installazione in serra di piccole *unità ecologiche funzionali*, costituite da piante opportunamente selezionate, che possano garantire da un lato un più rapido insediamento di questi antagonisti artificialmente inoculati e dall'altro la loro permanenza in caso di momentanea scarsità di ospiti o prede, riducendo nel contempo i temuti fenomeni di fitofagia sul pomodoro evidenziati nel caso di *N. tenuis*.

Controllo chimico

Come già detto, in Europa come anche nel nostro Paese il controllo di *T. absoluta* è in gran parte basato sull'uso di larvicidi (DESNEUX *et al.*, 2010; SANNINO & ESPINOSA, 2010). È evidente che quest'approccio rischia di interferire pesantemente con consolidate strategie IPM che efficacemente sono state adottate nel corso degli ultimi decenni nella protezione delle colture orticole. Tra gli insetticidi autorizzati in Italia per la Tignola del pomodoro, oltre ai formulati a base di *B. thuringiensis* precedentemente trattati, di seguito si riportano quelli con un profilo eco-tossicologico ritenuto più favorevole.

Azadiractina (azadiractina A e B - tetranortriterpenoide): ne è consentito l'impiego su pomodoro solo in fertirrigazione, preferibilmente già in fase

di trapianto della coltura, anche in regime di agricoltura biologica; chlorantraniliprole (noto anche come rynaxypyr - antranilammide): disponibile anche in miscela con il piretroide lamba-cialotrina, ma solo per trattamenti su coltura in pieno campo; emamectina benzoato (gruppo delle avermectine); indoxacarb (ossadiazine); metaflumizone (semi-carbazoni); spinosad (spinosoidi - spinosina A e D): ne è autorizzato l'uso anche in agricoltura biologica.

Resistenza – Sono note da diversi anni evidenze scientifiche dell'esistenza, di ceppi resistenti di *T. absoluta* a vari insetticidi sia in Sud America e, più di recente, anche nel bacino del Mediterraneo; la specie si è dimostrata in grado di selezionare ceppi capaci di detossificare principi attivi appartenenti a diversi gruppi chimici. Considerato l'interesse economico e tecnico che assume la questione, anche istituzioni scientifiche internazionali come l'IRAC (*Insecticide Resistance Action Committee*) si sono interessate al problema, pubblicando specifica documentazione scientifica e tecnica, definendo l'entità del problema e fornendo strumenti e linee d'indirizzo per gestire efficacemente il fenomeno della resistenza (SANNINO & ESPINOSA, 2010; IRAC, 2011).

Pertanto risulta essenziale un'attenta valutazione dell'efficacia degli insetticidi utilizzabili nelle aree di recente introduzione, prima di formulare raccomandazioni per il loro impiego in programmi di difesa integrata e procedere contestualmente all'attuazione di tutte le strategie disponibili per un'ideale prevenzione del fenomeno della resistenza. Questo rischio aumenta per fitofagi come *T. absoluta*, il cui controllo si basa quasi esclusivamente sull'uso di un ridotto numero di insetticidi. In genere, in queste condizioni, si assiste a un rapido aumento del numero degli interventi e della conseguente pressione selettiva.

Dai dati disponibili nella letteratura scientifica emerge che, sin dagli anni '80, nelle aree ritenute d'origine del fitofago, sono state riscontrate popolazioni di *T. absoluta* con livelli elevati di resistenza a vari insetticidi quali: fosfororganici (gruppo con modo d'azione IRAC – di seguito denominato MoA – 1 B ovvero inibitori dell'acetil-colinesterasi), piretroidi di sintesi (gruppo MoA 3 B, modulatori dei canali del sodio), benzoiluree (gruppo MoA 15, inibitori della biosintesi della chitina) e analoghi della nereistossina (gruppo MoA 14, bloccanti i canali dei recettori nicotinici dell'acetilcolina) (SIQUEIRA *et al.*, 2000a, b; SIQUEIRA *et al.*, 2001) e più di recente anche alle avermectine (gruppo MoA 5, attivatori del canale del cloro) e alle spinosine (gruppo MoA 5, modulatori allosterici dei recettori nicotinici di acetil-colinesterasi)

(REYES *et al.*, 2012). Com'era ipotizzabile, anche nelle aree mediterranee di recente introduzione sono state individuate popolazioni resistenti a diversi piretroidi mentre è stato riscontrato il potenziale rischio d'inefficacia per metaflumizone e clorpirifos (HADDI *et al.*, 2012; RODITAKIS *et al.*, 2012).

Come per altri fitofagi ritenuti ad alto rischio di resistenza, anche per *T. absoluta* la strategia di contenimento suggerita si inserisce nel più ampio quadro delle strategie di gestione integrata dei fitofagi e in particolare dell'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari. Nell'intento di evitare o almeno limitare l'insorgenza di fenomeni di resistenza agli insetticidi in questo momento disponibili in Italia, si deve innanzitutto ricorrere al controllo chimico solo se necessario e in funzione di soglie d'intervento definite a livello locale. La scelta degli insetticidi va fatta inoltre sulla base della loro documentata efficacia e selettività nei confronti dei principali antagonisti naturali. Appare sostanziale alternare opportunamente gli insetticidi in base al loro modo d'azione, al fine di evitare di intervenire con prodotti appartenenti allo stesso gruppo MoA su una stessa generazione. Infine, è indispensabile l'utilizzo di formulati registrati specificatamente per il controllo di *T. absoluta* su coltura e seguire scrupolosamente le istruzioni d'uso riportate sull'etichetta di ciascun prodotto.

Effetti collaterali sull'entomofauna antagonista – Come verificato nel caso di altri fitofagi esotici invasivi, il crescente aumento dei livelli d'infestazione di *T. absoluta* ha indotto ad un ampio ricorso all'uso di insetticidi, con inevitabili effetti indesiderati su organismi non bersaglio, quali gli antagonisti naturali e gli impollinatori oggi impiegati in colture di pomodoro (ARNÒ & GABARRA, 2011; BIONDI *et al.*, 2012a, c).

Per l'applicazione di strategie IPM efficaci e sostenibili in coltura protetta è prioritario ridurre quanto più possibile i rischi derivanti dall'uso di mezzi chimici di controllo nei confronti dell'entomofauna antagonista. È chiaro che per fare ciò appare indispensabile procedere a un'accurata valutazione dei potenziali effetti collaterali dei pesticidi sui nemici naturali (DESNEUX *et al.*, 2007; STARK *et al.*, 2007). Ciò appare sempre più importante anche in attuazione della recente Direttiva europea 2009/128/CE sull'uso sostenibile dei pesticidi, che impone a tutti gli Stati membri l'applicazione di strategie di protezione delle colture basate soltanto sui criteri IPM (CE, 2009).

Molti studi di laboratorio condotti in questo settore si basano quasi esclusivamente sulla valutazione degli effetti letali. Tuttavia, i pesticidi potrebbero indurre molteplici effetti subletali in indi-

vidui sopravvissuti all'esposizione a un determinato pesticida, e questi effetti potrebbero avere un impatto importante sulla dinamica di popolazione dei nemici naturali (STARK & BANKS, 2003).

È noto, infatti, che effetti subletali potrebbero alterare la fisiologia (neurofisiologia, sviluppo, longevità, fecondità e *sex-ratio*) e il comportamento (ad es. mobilità, orientamento, alimentazione, ricerca dell'ospite, deposizione e accoppiamento) di artropodi predatori e parassitoidi (DESNEUX *et al.*, 2007).

Per pervenire ad una più completa valutazione del potenziale impatto dei pesticidi sugli entomofagi, è quindi necessario studiare anche aspetti biologici particolari, come quelli comportamentali (DESNEUX *et al.*, 2004), utilizzando test biologici a più livelli, meglio noti come *multistep* (laboratorio - laboratorio esteso - campo) (DESNEUX *et al.*, 2006a, b). Come evidenziato da recenti studi, questi effetti collaterali indesiderati possono esseri indotti non solo da insetticidi di sintesi anche di nuova concezione, anche se ritenuti selettivi, ma anche da insetticidi di origine e/o di derivazione naturale, cosiddetti *bio-insetticidi*, molti dei quali impiegabili anche in agricoltura biologica (BIONDI *et al.*, 2012a, b, c).

Studi effettuati sulla valutazione di effetti tossici (letali e subletali) su entomofagi-chiave nelle colture protette, hanno evidenziato incompatibilità di indoxacarb e soprattutto di azadiractina e spinosad nei confronti del miride predatore *M. pygmaeus* (ARNÒ & GABARRA, 2011). Mentre, BIONDI *et al.* (2012a) hanno studiato in laboratorio l'impatto di numerosi insetticidi largamente utilizzati in coltura protetta di pomodoro sull'antocoride predatore *Orius laevis* (Fieber), definendo come compatibili i formulati a base di *B. thuringiensis*, azadiractina, chlorantraniliprole e incompatibili emamectina benzoato, metaflumizone, abamectina e spinosad. I prodotti a base di queste ultime due sostanze attive hanno manifestato effetti secondari sul predatore anche quando questi venivano esposti a residui di due settimane. Spinosad, in accordo con quanto osservato in una recente review sui suoi effetti secondari (BIONDI *et al.* 2012c), ha causato la morte di tutti gli esemplari di *B. nigriscans* esposti ai suoi residui su piante di pomodoro in laboratorio (BIONDI *et al.*, 2012b). Nello stesso esperimento, le due avermectine, abamectina ed emamectina benzoato, pur non avendo causato significativi livelli di mortalità nelle femmine esposte, ne hanno notevolmente ridotto la capacità di parassitizzazione e la fertilità. Degni di considerazione sono i risultati sin'ora ottenuti testando il più recentemente sviluppato chlorantraniliprole. Infatti, in prove di laboratorio, dosi massime di etichetta di questo agrofarmaco non hanno influenzato la sopravvivenza e la

capacità riproduttiva né di *O. laevis* (BIONDI *et al.*, 2012a), né quella di *B. nigriscans* (BIONDI *et al.*, in preparazione).

Infine, nell'ambito di prove condotte su possibili impieghi di varie formulazioni di zolfo in strategie eco-compatibili di lotta contro *T. absoluta* è stata riscontrata l'azione antideponente dello zolfo in polvere nei confronti del fitofago, tuttavia ne è stata anche osservata l'azione tossica nei confronti di *N. tenuis* (ZAPPALÀ *et al.*, 2012c).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Dall'analisi delle strategie e delle tecniche appena illustrate deriva una quadro d'insieme che indica chiaramente la disponibilità di molteplici opzioni di contenimento della Tignola del pomodoro in tutte le sue fasi di sviluppo. Alla luce delle esperienze fin qui condotte in Italia e confortati da quanto già ottenuto in altri Paesi del bacino del Mediterraneo, a sei anni dalla prima segnalazione del fitofago nel nostro Paese, è stata definita un'efficace strategia di lotta integrata in grado assicurare un adeguato livello di protezione delle colture di pomodoro sia in serra che in pieno campo.

A carico degli adulti, fatti salvi gli indispensabili strumenti di esclusione meccanica nel caso di colture protette, sono efficaci le applicazioni bio-tecniche mediante l'impiego della cattura massale, confusione sessuale e possibilmente di *attract and kill*. Sulle uova sono efficaci i miridi predatori e alcuni composti antideponenti come lo zolfo in polvere e l'azadiractina. Anche sulle larve giovani agiscono i miridi oltre che diversi bioinsetticidi; a carico delle larve mature e delle crisalidi sono da considerare i miridi, diversi parassitoidi e un'accurata gestione del suolo dove, come è noto, si localizzano con maggiore frequenza le crisalidi. Appare interessante rilevare che tre dei principi attivi disponibili in Italia per il controllo della Tignola del pomodoro (azadiractina, spinosad e *B. thuringiensis*) sono impiegabili in regime di agricoltura biologica e che, sempre più diffusamente, sono impiegati anche in contesti colturali di tipo *convenzionale*. Ciò appare un chiaro segnale del forte mutamento che sta avvenendo nel settore della protezione fitosanitaria delle colture che si sta sempre più orientando verso strategie eco-sostenibili a tutela dell'ambiente, dell'operatore e del consumatore. In quest'ottica, si ritiene utile rimarcare l'importanza della scelta di principi attivi secondo le loro caratteristiche di selettività, con particolare riguardo al loro profilo ecotossicologico nei riguardi di antagonisti naturali e impollinatori.

Discorso a parte va fatto per le cosiddette tecniche di *controllo biologico conservativo* tanto dibattute nel caso di *T. absoluta*. In effetti, è necessario fare un opportuno distinguo in merito per il diverso significato pratico di tali tecniche a seconda dei diversi contesti colturali nei quali il pomodoro è coltivato, ovvero in pieno campo destinato all'industria della lavorazione o al consumo fresco oppure in coltura protetta per consumo fresco, per produzioni autunno-vernine o primaverile-estive. Fermo restando l'indubbio beneficio che nel complesso dell'agrosistema può derivare dalla salvaguardia di tutte quelle componenti floristiche che possono veicolare l'azione dei nemici naturali in prossimità del campo coltivato, appare evidente che tale approccio può essere più direttamente *funzionale* nel caso di coltivazioni da pieno campo anziché nelle colture in serra.

Appare chiaro che le strategie sopra descritte devono intendersi in un contesto di razionale gestione agronomica e di buone pratiche agricole che sono presupposto imprescindibile per l'efficace applicazione di qualsiasi programma di difesa integrata.

Al di là delle comprensibili preoccupazioni derivanti dalla rapida invasione di questo fitofago esotico nelle coltivazioni di pomodoro, coltura di primario interesse economico per il nostro Paese, l'esperienza risulta a nostro avviso nel complesso positiva. Il suo arrivo infatti se da una parte ha fortemente modificato i programmi di difesa già efficacemente adottati, dall'altra ha indotto alla rapida diffusione di dinamiche strategie di difesa integrata e biologica e ha aperto opportunità di ricerca e sviluppo di nuove e più avanzate strategie di protezione rivolte verso una elevata sostenibilità sotto il profilo ecologico, economico e tossicologico.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato con il supporto finanziario del progetto PRIN "Biologia e controllo integrato di *Tuta absoluta* (Meyrick) in Italia".

RIASSUNTO

Nel lavoro s'illustrano le più significative strategie sostenibili di controllo della Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Dopo aver delineato l'importanza economica e le peculiarità biologiche del fitofago esotico, si espongono le tecniche di difesa integrata più promettenti. Nell'ambito delle strategie preventive si evidenziano: la biodiversità funzionale per la valorizzazione delle componenti antagoniste naturali attraverso la promozione di infrastrutture ecologiche; le pratiche agronomiche e le tecniche di esclusione, per mi-

gare le infestazioni nelle varie fasi di sviluppo della coltura. Si descrivono, quindi, le tecniche di monitoraggio basate sia sul campionamento su pianta sia sulla cattura degli adulti e i limiti applicativi di soglie economiche d'intervento. Inoltre sono discusse le potenzialità delle strategie di lotta biologica, con particolare riferimento all'impiego di agenti microbiologici, alle tecniche conservative e alla valorizzazione degli antagonisti indigeni più diffusi in Italia. Infine, si delinea una possibile strategia complessiva di difesa integrata per questo nuovo fitofago che, basandosi anche sull'impiego di insetticidi con più favorevole profilo eco-tossicologico, possa garantire un soddisfacente livello di protezione delle colture di pomodoro in Italia.

BIBLIOGRAFIA

- ALTIERI, M.A., NICHOLLS, C.I., 2004 – *Biodiversity and pest management in agroecosystems*, Second Ed. Hawthorn Press, New York.
- AL-ZAIDI S., 2011 – *History and current IPM strategies for the management of Tuta absoluta in the Mediterranean region*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (Tomato borer), Agadir, Morocco, November 16-18, 2011; Book of abstract: 41.
- ARNÓ J., GABARRA R., 2010 - *Controlling Tuta absoluta, a new invasive pest in Europe*. - ENDURE training in integrated pest management, no. 5, pp. 1-8. (http://www.endure-network.eu/about_endure/all_the_news/new_guide_tackling_tuta_absoluta).
- ARNÓ, J., GABARRA, R., 2011 – *Side effects of selected insecticides on the Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) predators Macrolophus pygmaeus and Nesidiocoris tenuis (Hemiptera: Miridae)*. - Journal of Pest Science, 84(4): 513-520.
- BATALLA CARRERA L., MORTON A., GARCÍA DEL PINO F., 2010 – *Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer Tuta absoluta in laboratory and greenhouse conditions*. - BioControl, 55: 523-530.
- BELDA J.E., GIMÉNEZ A., JAVIER CALVO F., 2011 – *Success and extension of biological control strategies for managing Tuta absoluta (Meyrick) (Lep. Gelechiidae) populations in the Mediterranean area*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (Tomato borer). Agadir, Morocco, November 16-18, 2011; Book of abstract: 28.
- BENVENGA S.R., FERNANDES O.A., GRAVENA S., 2007 – *Decision making for integrated pest management of the South American tomato pinworm based on sexual pheromone traps*. - Horticultura Brasileira, 25: 164-169.
- BIONDI A., DESNEUX N., SISCARO G., ZAPPALÀ L., 2012a – *Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator Orius laevigatus*. - Chemosphere, 87 (7): 803-812.
- BIONDI A., DESNEUX N., SISCARO G., TROPEA GARZIA G., AMIENS-DESNEUX E., ZAPPALÀ L., 2012b – *Side effects of bioinsecticides used to control Tuta absoluta*. IOBC-WPRS Bulletin., 80: 211-216.
- BIONDI A., MOMMAERTS V., SMAGGHE G., VIÑUELA E., ZAPPALÀ L., DESNEUX N., 2012c – *The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods*. - Pest Management Science, 68(12): 1523-1536.
- BOLLER E. F., AVILLA J., JOERG E., MALAVOLTA C., WIJNANDS F. G., ESBJER P., 2011 – *IOBC Integrated Production: objectives, principles and technical guidelines*,

- 1-23. In: Baur, R., Wijnands, F. and Malavolta, C. (eds.): Integrated production - Objectives, Principles and Technical Guidelines. IOBC/WPRS Bulletin, Special Issue. 132 pp.
- CALVO J., BOLCKMANS K., STANSKY P.A., URBANEJA, A., 2009 – *Predation by Nesidiocoris tenuis on Bemisia tabaci and injury to tomato*. - BioControl, (54)2: 237-246.
- CALVO F.J., LORENTE M.J., STANSKY P.A., BELDA J.E., 2012 – *Preplant release of Nesidiocoris tenuis and supplementary tactics for control of Tuta absoluta and Bemisia tabaci in greenhouse tomato*. - Entomologia Experimentalis et Applicata, 143(2): 111-119.
- CASTAÑE C., ARNÓ J., GABARRA R., ALOMAR O., 2011 – *Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators*. - Biological Control, (59)1: 22-29.
- CAPARROS MEGIDO R., HAUBRUGE E., VERHEGGEN F.J., 2012 – *First evidence of deuterotokous parthenogenesis in the tomato leafminer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Journal of Pest Science, 85 (4): 409-412.
- CE, 2009 – *Direttiva 2009/128/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi*. - Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, del 24/11/2009.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2012a – *Potential of mass trapping for Tuta absoluta management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps*. - IOBC/WPRS Bulletin, 80: 319-324.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2012b – *Control of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique*. - Journal of Applied Entomology, DOI: 10.1111/j.1439-0418.2012.01735.x, pubblicazione on line.
- DEHNE H.W., SCHONBECK F., 1994 – *Crop protection - past and present* pp. 45-71 In: Crop production and crop protection, Oerke E.C., Dehne H.W., Schonbeck F., Weber A. (eds.), Elsevier, Amsterdam. Netherlands. 808 pp.
- DELVARE G., LACORDAIRE A.I., RAMEL J.M., 2011 – *Necremnus artynes (Walker, 1839) (Eulophidae), a potential beneficial for the biological control of Tuta absoluta (Meyrick, 1917)*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (Tomato borer). Agadir, Morocco, November 16-18, 2011; Book of abstract: 28.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., FAUVERGUE X., PRIVET S., KAISER L., 2004 – *Sublethal effects of a neurotoxic insecticide on the oviposition behaviour and the patchtime allocation in two aphid parasitoids, Diaeretiella rapae and Aphidius matricariae*. - Entomologia Experimentalis et Applicata, 112: 227-235.
- DESNEUX N., DENOYELLE R., KAISER L., 2006a – *A multi-step bioassay to assess the effect of the deltamethrin on the parasitic wasp Aphidius ervi*. - Chemosphere, 65: 1697-1706.
- DESNEUX N., RAMIREZ-ROMERO R., KAISER L., 2006b – *Multistep bioassay to predict recolonization potential of emerging parasitoids after a pesticide treatment*. - Environmental Toxicology and Chemistry, 25(10): 2675-2682.
- DESNEUX N., DECOURTYE A., DELPUECH J., 2007 – *The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods*. - Annual Review of Entomology, 52:81-106.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUYTS K.A.G., BURGIO G., ARPAIA S., NARVÁEZ-VASQUEZ C.A., GONZÁLEZ-CABRERA J., RUESCAS D.C., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: Ecology, geographic expansion and prospects for biological control*. Journal of Pest Science, 83(3): 197-215.
- DESNEUX N., LUNA M.G., GUILLEMAUD T., URBANEJA A., 2011 – *The invasive South American tomato pinworm, Tuta absoluta, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production*. - Journal of Pest Science, 84:403-408.
- EHLER L.E., 2006 – *Perspective - Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM*. - Pest Management Science, 62: 787-789.
- ESTAY P., 2000 – *Polilla del Tomate Tuta absoluta (Meyrick)* [documento on-line]: <http://alerce.inia.cl/docs/Informativos/Informativo09.pdf> (visionato Feb 2012).
- FERRACINI C., INGEGNO B.L., NAVONE P., FERRARI E., MOSTI M., TAVELLA L., ALMA A., 2012 – *Adaptation of indigenous larval parasitoids to Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy*. - Journal of Economic Entomology, 105(4): 1311-1319.
- FILHO M.M., VILELA E. F., ATTYGALLE A. B., MEINWALD J., SVATOŠ A., JHAM G. N., 2000 – *Field trapping of tomato moth, Tuta absoluta with pheromone traps*. - Journal of Chemical Ecology, 26 (4): 875- 881.
- FRANK S.D., 2010 – *Biological control of arthropod pests using banker plant systems: past progress and future directions*. - Biological Control, 52(1): 8-16.
- GABARRA R., ARNÓ J., 2010 – *Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña*. - Phytoma España, 217: 66-68.
- GARCIA DEL PINO F., ALABERN X., MORTON A., 2011 – *Efficacy of entomopathogenic nematodes against the larvae and adults of the tomato leafminer Tuta absoluta in soil treatments and their compatibility with the insecticides used against this insect*. - IOBC/WPRS Bulletin 66: 267-270.
- GARDINER M.M., LANDIS D.A., GRATTON C., DIFONZO C.D., O'NEAL M., CHACON J. M., WAYO M. T., SCHMIDT N. P., MUELLER E.E., HEIMPEL G.E., 2009 – *Landscape diversity enhances biological control of an introduced crop pest in the north-central USA*. - Ecological Applications, 19: 143-154.
- GILARDÓN E., POCOVÍ M., HERNÁNDEZ C., COLLAVINO G., OLSEN A., 2001 – *Role of 2-tridecanone and type VI glandular trichome on tomato resistance to Tuta absoluta*. - Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 36: 929-933.
- GIUSTOLIN T.A., VENDRAMIM J.D., ALVES S.B., VIEIRA S.A., PEREIRA R.M., 2001 – *Susceptibility of Tuta absoluta (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of Lycopersicon to Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. Journal of Applied Entomology, 125: 551-556.
- GOMIDE E.V.A., VILELA E.F., PÍCANÇO M., 2001 – *Comparação de procedimentos de amostragem de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro Estaqueado*. - Neotropical Entomology, 30, 697-705.
- GONZÁLES CABRERA J., MOLLÁ O., MONTÓN H., URBANEJA A., 2011 – *Efficacy of Bacillus thuringiensis (Berliner) in controlling the tomato borer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - BioControl, 56: 71-80.
- HADDI K., BERGER M., BIELZA P., CIFUENTES D., FIELD

- L.M., GORMAN K., RAPISARDA C., WILLIAMSON M.S., BASS C., 2012 – *Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (Tuta absoluta)*. - Insect biochemistry and molecular biology, 42(7): 506-513.
- HARPAZ L.S., GRAPH S., RIKI K., AZOLAY L., ROZENBERG T., YAKOV N., ALON T., ALUSH A., STINBERG S., GERLING D., 2011 – *IPM of Tuta absoluta in Israel*. - EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (Tomato borer). Agadir, Morocco, November 16-18, 2011; Book of abstracts: 32.
- JACOBSON R., MARTIN G., 2011 – *A potential role for entomopathogenic nematodes within IPM of Tuta absoluta (Meyrick) on organic tomato crops*. - IOBC/WPRS Bulletin, 68: 79-83.
- LANDIS D.A., WRATTEN S.D., GURR G.M., 2000 – *Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture*. - Annual Review of Entomology, 45: 175-201.
- LIETTI M.M.M., BOTTO E., ALZOGARAY R.A., 2005 – *Insecticide resistance in Argentine populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Neotropical Entomology, 34 (1): 113-119.
- LONI A., ROSSI E., VAN ACHTERBERG K., 2011 – *First report of Agathis fuscipennis in Europe as parasitoid of the tomato leafminer Tuta absoluta*. - Bulletin of Insectology, 64: 115-117.
- LUNA M.G., SÁNCHEZ N.E., PEREYRA P.C., NIEVES E., SAVINO V., LUFT E., VIRLA E., SPERANZA S., 2012 – *Biological control of Tuta absoluta in Argentina and Italy: evaluation of indigenous insects as natural enemies*. - EPPO Bulletin, 42: 260-267.
- MARTÍ MARTÍ S., MUÑOZ CELDRÁN, CASAGRANDE E., 2010 – *El uso de feromonas para el control de Tuta absoluta: primeras experiencias en campo*. - Phytoma España, 217: 35-40.
- MOLLÁ O., ALONSO M., MONTON H., BEITIA F., VERDÚ M.J., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2010 – *Control biológico de Tuta absoluta. Catalogación de enemigos naturales y potencial de los miridos depredadores como agentes de control*. - Phytoma España, 217: 42-46.
- MOLLÁ O., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A. 2011 – *The combined use of Bacillus thuringiensis and Nesidiocoris tenuis against the tomato borer Tuta absoluta*. - BioControl, 56: 883-891.
- MONSERRAT DELGADO A., 2009 – *La polilla del tomate "Tuta absoluta" en la Región de Murcia: bases para su control*. - Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Consejería de Agricultura y Agua - Serie Técnica y de Estudios, 34, 74 pp.
- NAVARRO LOPIS V., ALFARO C., VACAS S., PRIMO J., 2010 – *Application de la confusion sexual al control de la polilla del tomate Tuta absoluta Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Phytoma España, 217: 35-40.
- NIEDMANN L.L., MEZA-BASSO L., 2006 – *Evaluación de cepas nativas de Bacillus thuringiensis como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (Tuta absoluta Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile*. - Agricultura Técnica, 66: 235-246.
- OLIVEIRA F.A., DA SILVA D.J.H., LEITE G.L.D., JHAM G.N., PICANÇO M., 2009 – *Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of Lycopersicon esculentum and three cultivars to Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Scientia Horticulturae, 119: 182-187.
- PERDIKIS D., FAVAS C., LYKOURESSIS D., FANTINOU A., 2007 – *Ecological relationships between non-cultivated plants and insect predators in agroecosystems: the case of Dittrichia viscosa (Asteraceae) and Macrolophus melanotoma (Hemiptera: Miridae)*. - Acta Oecologica, 31 (3): 299-306.
- PERDIKIS D., FANTINOU A., LYKOURESSIS D., 2011 – *Enhancing pest control in annual crops by conservation of predatory Heteroptera*. - Biological Control, 59 (1): 13-21.
- PEREYRA P.C., SÁNCHEZ N.E., 2006 – *Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Neotropical Entomology, 35: 671-676.
- REYES M., ROCHA K., ALARCÓN L., SIEGWART M., SAUPHANOR B., 2012 – *Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad*. - Pesticide biochemistry and physiology, 102(1): 45-50.
- RODITAKIS E., SKARMOUTSOU C., STAUERAKI M., DEL ROSARIO MARTÍNEZ-AGUIRRE M., GARCÍA-VIDAL L., BIELZA P., HADDI K., RAPISARDA C., RISON J., BASSI A., TEIXEIRA L.A., 2012 – *Determination of baseline susceptibility of European populations of Tuta absoluta (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method*. - Pest Management Science, DOI: 10.1002/ps.3404, publicación on line.
- RODRIGUEZ M.S., GERDING M.P., FRANCE A.I., 2006 – *Entomopathogenic fungi isolates selection for egg control of tomato moth Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) eggs*. - Agricultura Técnica, 66:151-158.
- SANNINO L., ESPINOSA B., 2010 – *Tuta absoluta, guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa*. - L'Informatore Agrario, 66 (46) Supplemento 1: 1-113.
- SCHNEFF E., CRICKMORE N., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM, J., 1998 – *Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins*. - Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 775-806.
- SILVA G.A., PICANÇO M.C., BACCI L., CRESPO A.L.B., ROSADO J.F., GUEDES R. N. C., 2011 – *Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, Tuta absoluta*. - Pest Management Science, 67: 913-920.
- SIQUEIRA H.A.A., GUEDES R.N.C., PICANÇO M.C., 2000a – *Cartap resistance and synergism in populations of Tuta absoluta (Lep., Gelechiidae)*. - Journal of Applied Entomology, 124: 233-238.
- SIQUEIRA H.A.A., GUEDES R.N.C., PICANÇO M.C., 2000b – *Insecticide resistance in populations of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Agricultural and Forest Entomology, 2: 147-153.
- SIQUEIRA H.A.A., GUEDES R.N.C., FRAGOSO D.B., MAGALHAES L.C., 2001 – *Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - International Journal of Pest Management, 47(4): 247-251.
- STARK J.D., BANKS J.E., 2003 – *Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods*. - Annual Review of Entomology, 48: 505-519.
- STARK J.D., VARGAS R., BANKS J.E., 2007 – *Incorporating ecologically relevant measures of pesticide effect for estimating the compatibility of pesticides and biocontrol agents*. - Journal of Economic Entomology, 100 (4): 1027-1032.
- STERN V.M., SMITH R.F., VAN DEN BOSCH R., HAGEN K.S., 1959 – *The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept*. - Hilgardia, 29: 81-101.

- TORRES J.B., FARIA C.A., EVANGELISTA JR W.S., PRATISSOLI D., 2001 – *Within-plant distribution of the leaf miner Tuta absoluta (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology*. - International Journal of Pest Management, 47: 173-178.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., COLOMBO A., CAMPO G., 2009 – *Rinvenuta in Sicilia Tuta absoluta*. - L'Informatore Agrario, 65 (4): 71.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., BIONDI A., ZAPPALÀ L., 2012 – *Tuta absoluta, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage*. - EPPO Bulletin, 42 (2): 205-210.
- URBANEJA A., VERCHER R., NAVARRO V., PORCUNA J.L., GARCIA-MARÍ F., 2007 – *La polilla del tomate, Tuta absoluta*. - Phytoma España, 194: 16-24.
- URBANEJA A., GONZÁLEZ-CABRERA J., ARNÓ J., GABARRA R., 2012 – *Prospects for the biological control of Tuta absoluta in tomatoes of the Mediterranean basin*. - Pest Management Science, 68: 1215-1222.
- USDA, 2011 – *New pest response Guidelines: Tomato Leaf-miner (Tuta absoluta)*. http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/emergency/downloads/Tuta-absoluta.pdf (visitato in febbraio 2012).
- VAN LENTEREN J.C., WOETS J., 1988 – *Biological and integrated pest control in greenhouses*. Annual Review of Entomology, 33: 239-269.
- VERCHER R., CALABUIG A., FELIPE C., 2010 – *Ecología, muestreos y umbrales de Tuta absoluta (Meyrick)*. - Phytoma España, 217: 23-26.
- VIGGIANI G., FILELLA F., DELRIO G., RAMASSINI W., FOXI C., 2009 – *Tuta absoluta, nuovo lepidottero segnalato anche in Italia*. - L'Informatore Agrario, 65(2): 66-68.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P., RAPISARDA C., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012a – *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta in Southern Italy*. - Bulletin of Insectology, 65(1): 51-61.
- ZAPPALÀ L., BIONDI A., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012b – *Efficacy of commercial strains of Bacillus thuringiensis in controlling Tuta absoluta: laboratory tests*. - IOBC/WPRS Bulletin, 80: 283-288.
- ZAPPALÀ L., SISCARO G., BIONDI A., MOLLÁ O., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2012c – *Efficacy of sulphur on Tuta absoluta and its side effects on the predator Nesidiocoris tenuis*. - Journal of Applied Entomology, 136 (6): 401-409.

HOLISTIC MANAGEMENT OF INVASIVE SPECIES: THE CASE STUDY OF *TUTA ABSOLUTA* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA, GELECHIIDAE)

LUIGI PONTI^{1,2} - ANDREW PAUL GUTIERREZ^{2,3} - MIGUEL A. ALTIERI^{3,4}

¹ Laboratorio Gestione Sostenibile degli Agro-ecosistemi (UTAGRI-ECO), Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA), Centro Ricerche Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Roma, Italy

² Center for the Analysis of Sustainable Agricultural Systems (CASAS), Kensington, CA 94707, USA (Website: <http://cnr.berkeley.edu/casas>)

³ Division of Ecosystem Science, Department of Environmental Science, Policy & Management, University of California, Berkeley, CA 94720, USA

⁴ College of Natural Resources, University of California, Berkeley, CA 94720, USA

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 18 febbraio 2012.

Holistic management of invasive species: the case study of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae)

The Mediterranean Basin is a climate change and biological invasion hotspot of global relevance where recent warming has likely facilitated the establishment and spread of invasive species. Projecting the potential geographic distribution and relative abundance of species that invade the Basin is pivotal to developing sound policy for their management, and the need for this capacity has increased dramatically in the region. The tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) recently invaded the Mediterranean Basin from South America and threatens to become a major global pest of tomato. Here the available biological data relevant to the development of a physiologically-based demographic model (PBDM) for *T. absoluta* are summarized, and the components of a prospective ecologically-based management program for the pest are reviewed to lay the ground for assessing the relative importance of the different components at a regional level. We propose that the PBDM approach can be used in a GIS context to develop and implement a holistic analysis of this pest. The complex interactions that underpin scientifically-sound management of invasive species including *T. absoluta* can be captured quantitatively, and the resulting interdisciplinary synthesis can then be used within the conceptual framework of agroecology to help design ecologically-based pest management strategies suited to specific resource and socioeconomic realities.

KEY WORDS: physiologically-based weather-driven demographic models, geographic information systems (GIS), climate change effects, ecologically-based pest management, holistic analysis.

THE MEDITERRANEAN BASIN AS A GLOBAL HOTSPOT FOR BIOLOGICAL INVASION

The Mediterranean Basin is a biodiversity (MYERS *et al.*, 2000) and climate change hotspot (GIORGI, 2006) that is also challenged by biological invasions of exotic species (DRAKE & LODGE, 2004; TATEM, 2009). The area's status as a climate change hotspot is based on a consensus of projections (GIORGI, 2006; DIFFENBAUGH & GIORGI, 2012) across forcing scenarios, future time periods, and a range of global and regional climate models (GIORGI & LIONELLO, 2008; LIONELLO *et al.*, 2012). The Mediterranean Basin and other areas of Europe are at increased risk of exotic species introduction (e.g., pests) because of the high density of airports with high-volume incoming traffic from many regions with similar climates. This combination of factors is anticipated to increase invasive species establishment (TATEM, 2009). In Europe, approaches to pest risk analysis usually follow a

conventional paradigm that involves assessing probability of introduction, probability of establishment, potential economic impact, and options to prevent establishment/economic impact (GIOLLI & BAUMGÄRTNER, 2009; VAN DER STRATEN *et al.*, 2011).

The recent arrival and establishment of several tropical insect species illustrates how the recent warming observed in the Basin is likely to facilitate the establishment and spread of invasive alien species (ROBINET & ROQUES, 2010). Climate mismatches would appear to be the only natural barrier still effective against the global spread of invasive species, as major geographical barriers have been made mostly ineffective by global air and other kinds of commercial traffic (TATEM & HAY, 2007; TATEM, 2009). Invasive species may be of any taxa and cause yearly an estimated trillion US dollars worldwide damage (OERKE & DEHNE, 2004). This figure is nearly an order of magnitude higher than losses to natural disasters (see RICCIARDI *et al.*,

2011). The accidental introductions of exotic insects has resulted in a high number of established species with considerable negative economic impact (PYŠEK *et al.*, 2008). Plants are another major group of invasive organisms, but their introduction has mostly been intentional (PIMENTEL *et al.*, 2005). About one-third of insect pests are alien species (WARD & MASTERS, 2007), whose potential geographic distribution and relative abundance (i.e., measures of invasiveness) are mostly poorly understood, even after costly and long-standing management/eradication programs (GUTIERREZ & PONTI, in press).

The field of agroecology (ALTIERI, 1995; ALTIERI *et al.*, 2003) is a holistic vision of the study and implementation of the agricultural sustainability problem, but the gap between this concept and our capacity to analyze agroecosystems is large. Holistic analyses are often advocated (ZVALETA *et al.*, 2001; HULME, 2006; SUTHERST & BOURNE, 2009; GILMAN *et al.*, 2010), but rarely implemented – there are simply too many factors, and the best we can currently do is to examine sub sets of the agroecosystem. But even this requires projecting regionally the population dynamics of the sub system as driven by weather and constrained by interactions with other species and all elements of the abiotic environment (GUTIERREZ, 1996). Focusing on invasive species, key issues include predicting their potential distribution and relative abundance, the effects of natural enemies, and assessment of available control methods, with the effects of future climate change being an additional layer of complexity.

In this paper, we summarize available biological data relevant to the development of a physiologically-based demographic model (PBDM) for *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae), and review the components of a prospective ecologically-based management program for the pest to lay the ground for assessing the relative importance of the different components at a regional level. The PBDM approach circumvents long-standing shortcomings of mainstream approaches commonly used to assess exotic species invasiveness, and when used in a holistic interdisciplinary framework may help increase system sustainability and resilience in the face of social, cultural, economic and pending climate change.

PREDICTING THE GEOGRAPHIC DISTRIBUTION AND RELATIVE ABUNDANCE OF PEST SPECIES

Pivotal to developing sound policy for eradication, or control and management of invasive species is the capacity to predict their potential geographic

distribution and relative abundance (i.e., their invasiveness) under current and climate change scenarios (GUTIERREZ *et al.*, 2011). Climate is a highly important determinant of species distribution and abundance (ANDREWARTHA & BIRCH, 1954), and is a major barrier against the global spread of invasive species (TATEM & HAY, 2007; TATEM, 2009). However, predicting the geographic distribution and dynamics of invasive species in time and space has been a difficult recurring problem (see review by GILIOLI & BAUMGÄRTNER, 2009), that may only increase with global climate and environmental change (see TYLIANAKIS *et al.*, 2008). Common methods used to predict the geographic distribution of invasive species fall under the ambit of *climate envelope* approaches (i.e., ecological niche models; ENMs hereafter). Distribution records of the species are used to develop ENMs for assessing the species' potential geographic distribution by characterizing climatically the ecological niche of the species. ENMs may be statistical (see ESTRADA-PÉÑA, 2008), physiological indices (e.g., CLIMEX; SUTHERST *et al.*, 2007), methods based on information theory (Maxent; PHILLIPS *et al.*, 2006; PHILLIPS & DUDIK, 2008) and other methods reviewed by ELITH & LEATHWICK (2009). ENMs assume the current geographic distribution of a species is the best indicator of its climatic requirements, that the distribution is in equilibrium with current climate, and climate niche conservatism is maintained in both space and time (BEAUMONT *et al.*, 2009). However, because of the correlative nature of ENMs, a number of problems may occur (see also Fig. 1): the difficulty of incorporating trophic interactions (DAVIS *et al.*, 1998a; DAVIS *et al.*, 1998b; VAN DER PUTTEN *et al.*, 2010), the assumed native range may be in error as the records may be of presence in ephemeral habitats or the species may have been misidentified (SOBERÓN & PETERSON, 2011; WARREN, 2012), aggregate weather data is often used that miss important short-term weather effects (see Fig. 2), different ENM approaches give different results (LAWLER *et al.*, 2006), and other factors (see LOZIER *et al.*, 2009). These models make implicit ecological and mathematical assumptions that lack mechanistic underpinnings (SOBERÓN & NAKAMURA, 2009). These shortcomings were recognized by the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC AR4) summarized as including the “inability to account for species interactions, lack of a physiological mechanism, and inability to account for population processes” (FISCHLIN *et al.*, 2007) (Fig. 1).

However, while ENMs are often good at fitting current ranges of species, they are not as good at projecting range shifts due to climate change or the

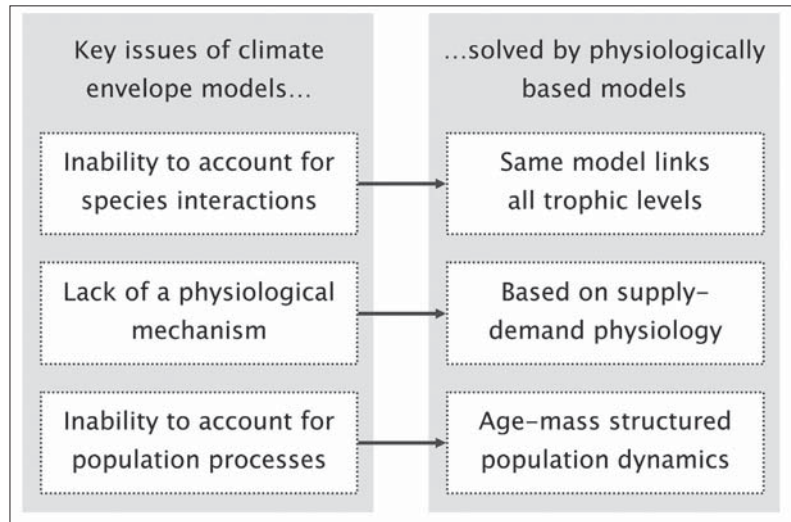


Fig. 1
Limitations of climate envelope models that were acknowledged in the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change and how these limitations are addressed by physiologically-based demographic models.

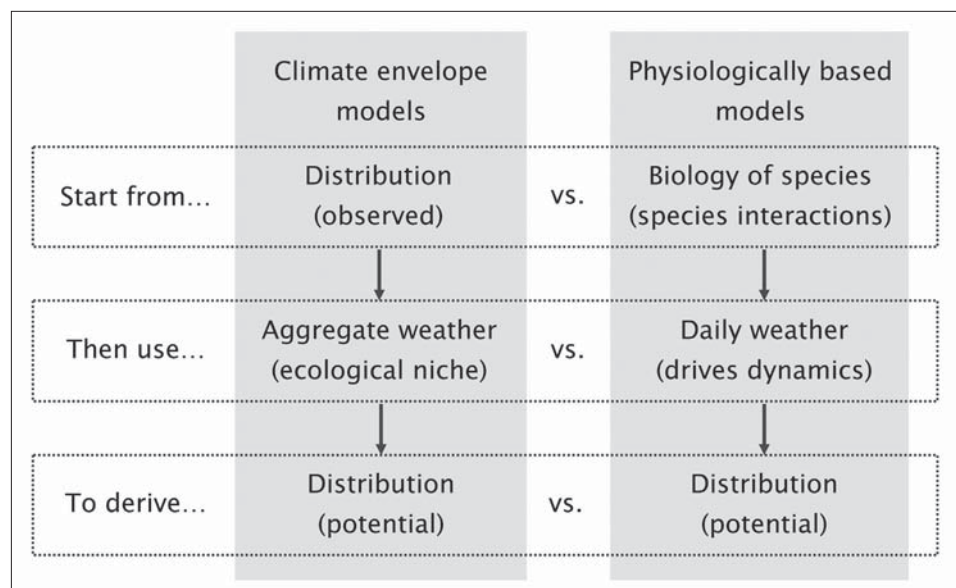


Fig. 2
Comparison of the climate envelope approach and the physiologically-based demographic modeling approach.

spread of invaders (JESCHKE & STRAYER, 2008; WIENS *et al.*, 2009; SINCLAIR *et al.*, 2010; BARVE *et al.*, 2011; VELOZ *et al.*, 2012). Despite shortcomings, ENMs are in many cases the only available methods for estimating the ecological niche (WARREN, 2012), and may provide a useful first approximation if the results are interpreted with due consideration of the limitations of the models (PEARSON & DAWSON, 2003).

PBDMs address these shortcomings by explicitly capturing the mechanistic weather-driven biology of the species and of relevant interacting species in its food chain or web. (The physiological basis of the approach has early roots in the work of DE WIT & GOUDRIAAN, 1978.) Instead of beginning with the assumed native range of an invasive species, PBDMs model the biology of the target species and other species in the same food chain or web (i.e., the system) (Fig. 2), and when the

model is driven by weather predict the phenology, dynamics and distribution of the interacting species across wide geographic areas independent of distribution records (GUTIERREZ *et al.*, 2008; GUTIERREZ & PONTI, in press) (Fig. 1). PBDMs of herbivores may include bottom-up effects of plant growth and development and in some cases the top-down action of natural enemies (see GUTIERREZ & BAUMGÄRTNER, 1984; GUTIERREZ *et al.*, 1994). Because the biology is modeled, the PBDM system can easily deal with the effects of climate change on the species.

The underlying idea of PBDMs is that all organisms are consumers and have similar resource acquisition (inputs) and allocation (outputs) priorities (GUTIERREZ, 1996) (Fig. 3), and the dynamics of all species can be captured using the same resource acquisition and same shape birth-death rates sub-models imbedded in an age-mass struc-

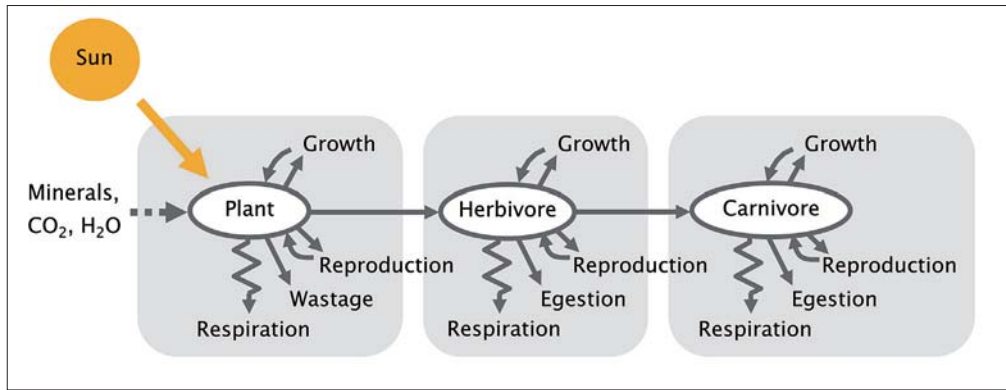


Fig. 3

All organisms show a common pattern of energy acquisition (supply) and allocation (demand) that allows to use the same model to describe the biology of the species in all trophic levels including the economic one (see GUTIERREZ, 1996).

tured population model that capture sub processes such as developmental rates on temperature, age-specific fecundity and mortality as modified by temperature and other factors, diapause and the interaction with resource species and with natural enemies (GUTIERREZ, 1996). The model can be scaled to the individual, population, area or regional level (Fig. 4). Resource acquisition (i.e. the supply, S) is a search process driven by organism demand (D), while allocation occurs in priority order to egestion, conversion costs, respiration, and reproduction, growth, and reserves. The ratio $0 \leq S/D < 1$ is due to imperfect consumer search, and in the PBDM scales maximal growth rates of species in a time-place varying manner. PBDMs simulate the age-mass structured population dynamics of plant subunits and of pest and preda-

tor/parasitoid numbers. Weather is used to drive the population dynamics of the interacting species and may include, as required, daily maximum and minimum temperatures, solar radiation, precipitation, relative humidity, and wind, and may be derived from ground observations, satellite remote sensing, or climate model simulations (e.g., GUTIERREZ *et al.*, 2005; PONTI *et al.*, 2009). The results of the PBDM analyses can be mapped using GIS at various levels of spatial and temporal resolution (e.g., using GRASS GIS, <http://grass.osgeo.org/>). Most important, the results of the modeling/GIS analyses can be compared to field data. The main drawback is that the development of PBDM analyses requires a minimum level of biological information. Here we review the adequacy of the available information for *T. absoluta*.

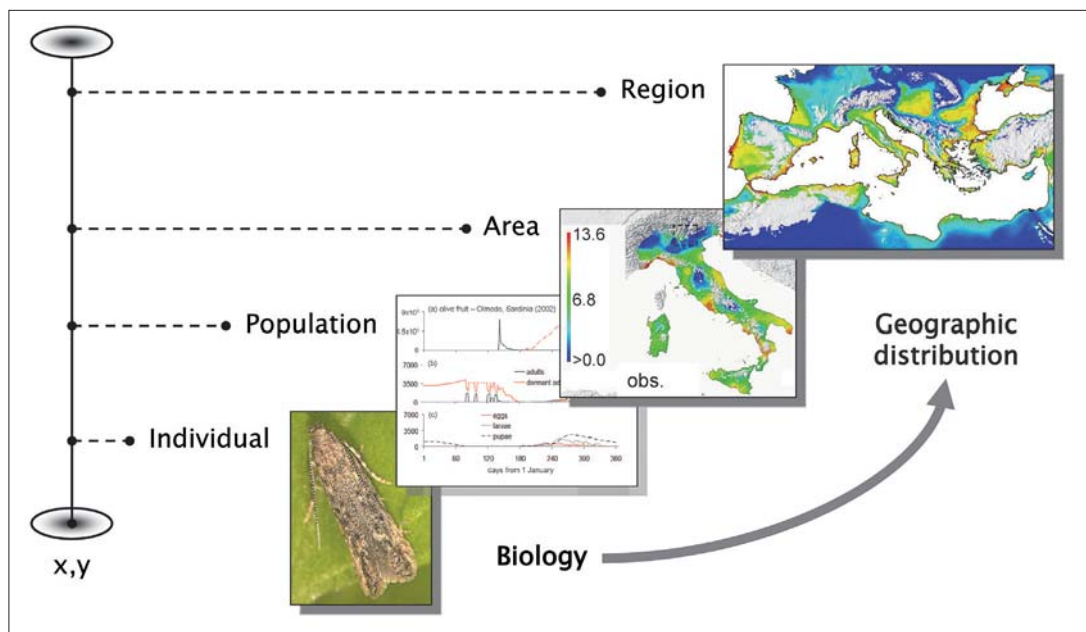


Fig. 4

Levels of physiologically-based models: individual, population, across ecological zones and across large geographic regions (modified from GUTIERREZ *et al.*, 2010).

THE RANGE OF *TUTA ABSOLUTA*

The oligophagous leaf miner *T. absoluta* and its primary tomato host are native to South America. The pest also develops on other solanaceous crops such as potato and eggplant (DESNEUX *et al.*, 2010). This leaf miner was identified as a potentially serious problem for the Mediterranean tomato industry before it invaded the region (EPPO, 2005). The first Mediterranean Basin record is from Spain in 2006 (URBANEJA *et al.*, 2007), and two years later it was also found in Italy (TROPEA GARZIA *et al.*, 2009; VIGGIANI *et al.*, 2009). Population genetics studies suggest that a single genetically-uniform invasive population spread to the Mediterranean Basin (CIFUENTES *et al.*, 2011). Invasion of the Mediterranean Basin was rapid, as *Tuta* traveled about 4,000 km in five years (TROPEA GARZIA *et al.*, 2012) and has now become a major threat to tomato production (DESNEUX *et al.*, 2011) in three continents (Europe, Africa, and Asia). Its range extends North-South from The Netherlands to Sudan, and West-East from Portugal to Iran (TROPEA GARZIA *et al.*, 2012). The invasion history of *T. absoluta* suggests it is able to spread and rapidly colonize new areas even without human mediation, and hence it is unlikely that current management/quarantine programs will slow or prevent further spread (DESNEUX *et al.*, 2011).

In the Mediterranean Basin, recent climate warming has been concentrated in summer (MARIOTTI & DELL'AQUILA, 2011) especially during the last decade of the twentieth century (BARTOLINI *et al.*, 2012). This recent warming is consistent with climate change projections for the region (BARKHORDARIAN *et al.*, 2011) and stands out from long-term temperature variability spanning the last millennium (GUIOT, 2012; JOËL, 2012). Summer warming was particularly intense in the decade ending with the first two years (2007 and 2008) of recorded invasion of *T. absoluta* in the Basin (decade 1998-2007, Fig. 5), and this may in part explain *T. absoluta* rapid spread.

REVIEW OF *T. ABSOLUTA* BIOLOGY RELEVANT TO PBDM DEVELOPMENT

A mechanistic model for tomato growth and development that includes dry matter assimilation and partitioning is reported in the literature (HEUVELINK, 1999), and may serve as basis for developing a PBDM for the tomato plant to provide the bottom-up dynamics on *T. absoluta*.

T. absoluta is a multivoltine species with high reproductive potential (TROPEA GARZIA *et al.*, 2012). Studies on the moth's development (BARRIENTOS *et al.*, 1998) estimated the lower thermal

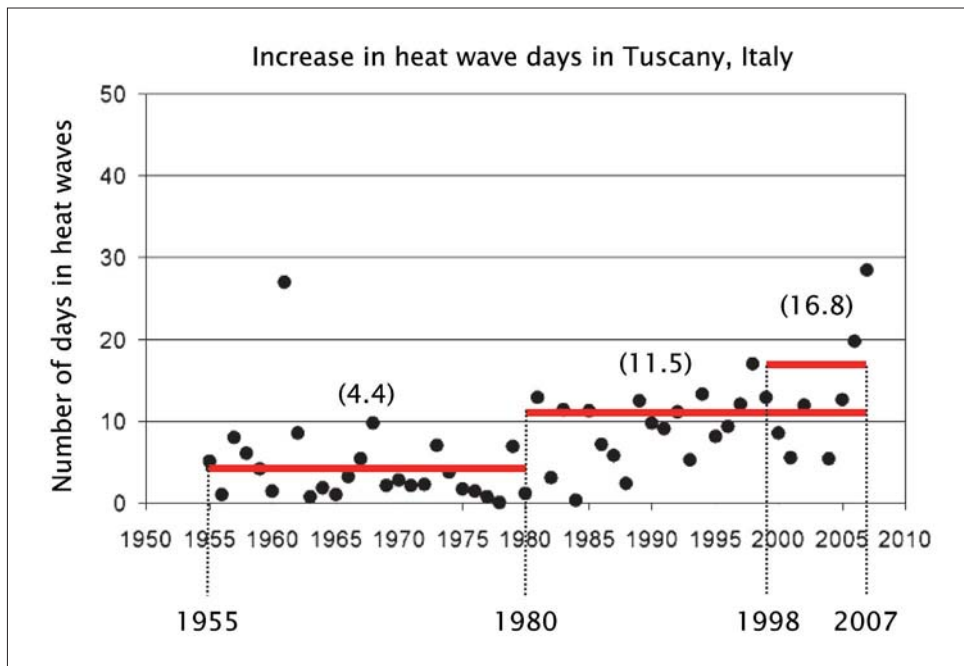


Fig. 5

Mean annual count of Warm Spell Duration Index (WSDI; count of days with at least six consecutive days when maximum temperature exceeds the 90th percentile) days in the period 1955-2007. Red horizontal lines spanning 1955-1980, 1981-2007, and 1998-2007 indicate average values for respective periods (numeric values in parentheses). Modified from BARTOLINI *et al.* (2012).

threshold and the duration of the life stages in degree-days (*dd*): eggs (103,8 *dd* above 6.9 °C), larvae (238.5 *dd* above 7.6 °C), and pupae (117.3 *dd* above 9.2 °C). Other data provided by BARRIENTOS *et al.* (1998) could provide information for estimating sub-models for temperature-dependent rate of development (Tab. 1) and for mortality. SANNINO & ESPINOSA (2010) monitored field populations year-round and estimated the duration of life stages in physiological time units (*dd*). These observations may be used as field estimates for inclusion in the developmental rate sub-model. Data from PEREYRA & SÁNCHEZ (2006) on age-specific survivorship and fecundity profiles, net reproductive rate, and intrinsic rate of increase at 25 °C (on both tomato and potato), and data from MEDEIROS *et al.* (2009b) on age-specific survivorship at 25 °C on tomato plants grown in conventional vs. organic systems could be used to develop sub-models for mortality and fecundity.

SANNINO & ESPINOSA (2010) found that adults can live up to six weeks at 15 °C but only a few days (4-5) at 35 °C, information that could help model the effect of temperature on adult longevity. The preoviposition period is about two days with eggs being laid singly or in batches of 2 -5. Total fecundity varies considerably (40-262 eggs per female) in the literature reviewed (SANNINO & ESPINOSA, 2010).

Tuta continues development as food and weather allow (up to 12 generations in the warmer reaches of its native range). It appears not to have a diapause stage, and yet SANNINO & ESPINOSA (2010) at Scafati found that overwintering pupae take 65.1 days on average to complete development with one third of the pupae formed in the first half of November developing to adults by the first half of December (17.9 days on average). The remaining pupae are quiescent during cold months and emerge the following year between January and February. This could indicate that insufficient thermal units accrue or some other factors delay development. For example, termination of diapause in *Anarsia lineatella* (Lepidoptera, Gelechiidae) requires chilling and its larvae complete diapause development in late January-early February

(DAMOS & SAVO-POULOU-SOULTANI, 2010) as occurred for some *Tuta* pupae. This aspect of the biology requires further examination. In Mediterranean climes, adults are found throughout the year (VERCHER *et al.*, 2010).

Other biological and behavioral traits include: adults are nocturnal and usually hide during the day in the canopy; females lay eggs on aerial parts of their host plants, and four larval instars develop; pupation may take place in the soil, on the leaf surface, or within mines (EPPO, 2005; see also SANNINO & ESPINOSA, 2010).

PROSPECTIVE MANAGEMENT OF *T. ABSOLUTA*

An array of management options exist that may be considered as part of a prospective management strategy for *T. absoluta* and include chemical insecticides, habitat management, pheromones, biological control, host plant resistance (HPR) and other methods.

Chemical control

Chemical insecticides use should be considered with care as resistance in *T. absoluta* to common insecticides is widespread in South America (LIETTI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011), and the speed at which insecticide resistance evolved in this species is of major concern (CIFUENTES *et al.*, 2011). The invasive population has been shown to have a narrow genetic basis expressing a high potential for insecticide resistance (CIFUENTES *et al.*, 2011) making it substantially unconstrained by quarantine measures (DESNEUX *et al.*, 2011). Specifically, the high frequency of mutations associated with pyrethroid resistance in *T. absoluta* populations occurs across much of its range and suggests pyrethroids are likely ineffective as means of control, and further supports the hypothesis that insecticide resistance facilitated the rapid expansion of its invasive range (HADDI *et al.*, 2012). Hence, insecticides are unlikely to be viable components of management programs for *T. absoluta* in the Mediterranean Basin.

Table 1 – Summary of data on the thermal biology of *Tuta absoluta* provided by BARRIENTOS *et al.* (1998).

	Average duration in days (Survivorship %)					
	14.0 °C		19.7 °C		27.1 °C	
Eggs	14.1	(86.3)	7.9	(93.6)	5.1	(92.1)
Larvae	38.0	(79.0)	19.9	(71.0)	12.2	(52.7)
Pupae	24.2	(90.8)	12.1	(91.4)	6.5	(91.2)
Total	76.3	(61.9)	39.8	(60.7)	23.8	(44.3)

Non chemical control

First and foremost, ecologically-based pest management should design the agroecosystems to foster pest regulation with low dependence on external inputs (ALTIERI, 1999). Among these options are habitat management above-ground (i.e., crop diversification; see LANDIS *et al.*, 2000; ALTIERI *et al.*, 2003; PONTI *et al.*, 2005; ALTIERI *et al.*, 2009) and below-ground (i.e., organic soil enhancement; see ALTIERI & NICHOLLS, 2003; ALTIERI *et al.*, 2005) and their synergistic interactions (PONTI *et al.*, 2007; ALTIERI *et al.*, 2011) as well as biological and natural control and augmentative releases (VAN DEN BOSCH *et al.*, 1982), HPR (KOGAN, 1994; MALUF *et al.*, 2010b), and mating disruption (WITZGALL *et al.*, 2010).

Habitat management

There is evidence that habitat management is a viable option for regulating *T. absoluta* in tomato cropping systems under Mediterranean conditions. For example, in a comparison of organic vs. conventional tomato agroecosystems in commercial farms in California (USA), DRINKWATER *et al.* (1995) and LETOURNEAU & GOLDSTEIN (2001) could not distinguish between the two production systems based on fruit yields and arthropod pest damage levels, but observed higher levels of associated biodiversity (*sensu* VANDERMEER & PERFECTO, 1995) of natural enemies that by providing biological control of insect pests would act as a source of biological compensation for the lack of chemical control. Similarly in Brazil, MEDEIROS *et al.* (2009a) observed greater abundance and diversity of predators and reduced density of *T. absoluta* larvae in organic vs. conventional tomato crops, and further that intercropping tomato with coriander (*Coriandrum sativum*, Apiaceae) and gallant soldier (*Galinsoga parviflora*, Asteraceae) had an additional positive effect on reducing pest density and enhancing natural enemies (see PONTI *et al.*, 2007). In another experiment, MEDEIROS *et al.* (2009b) found that tomato plants potted in soil from organic farming systems had half the number of *T. absoluta* eggs when compared to tomato plants grown in soil from conventional systems. MEDEIROS *et al.* (2011) also observed higher *T. absoluta* egg mortality by parasitoids and generalist predators in organic vs. conventional tomato crops (see PONTI *et al.*, 2007). A similar trend was observed in Ohio (USA) by PHELAN *et al.* (1995) in studies of the European corn borer. Implementation of habitat management and/or organic farming may be hindered in intense greenhouse tomato cultivation systems or control may not be sufficient to regulate the pest below economic levels.

Biological and natural control and augmentative releases

Information on biological control of *T. absoluta* in its native range is not comprehensive, and lacks the biology and ecology of natural enemies that would be critical for selecting candidate bio-control agents (DESNEUX *et al.*, 2010). Classical biological control would be a long-term sustainable management strategy for *T. absoluta*, and introduction of exotic natural enemies carries low risk of unintended effects on non-target organisms (e.g., risk of extinction of non target species; see VAN LENTEREN *et al.*, 2006) that must however be weighed against the prospective benefits (see MESSING & WRIGHT, 2006; DESNEUX *et al.*, 2010; BIONDI *et al.*, 2012).

Several species of predators and parasitoids have adapted to *T. absoluta* since its introduction to the Mediterranean Basin (natural control), and this has probably contributed to the observed decline in pest severity 2-3 years after first invasion (TROPEA GARZIA *et al.*, 2012; URBANEJA *et al.*, 2012). Field survey of native parasitoids recruited to *T. absoluta* in southern Italy (ZAPPALÀ *et al.*, 2012a) highlights the need to conserve indigenous natural enemies (e.g., via habitat management) that could be important components of management strategies for the tomato borer in the Mediterranean region. Laboratory assessment of the impact of native parasitoids on larval populations of *T. absoluta* were carried out in several Italian tomato fields located on the North-South gradient (FERRACINI *et al.*, 2012), and found that two species of the genus *Necremnus* were potential candidates for mass production and augmentative release. These findings emphasize the importance of the rich and variegated biodiversity found in the Mediterranean that may result in efficacious new associations of natural enemies with invasive species (see NICOLI & BURGIO, 1997).

The implementation of augmentative releases of natural enemies for control of *T. absoluta* in the Mediterranean Basin was initially constrained by the extensive insecticide use following the introduction of the pest (NANNINI *et al.*, 2012; URBANEJA *et al.*, 2012). However, successful augmentative control programs have been implemented for *T. absoluta* using native generalist predators (Miridae) that at the same time help manage other major tomato pests such as whiteflies. This development led to a substantial increase in the tomato crop area under augmentative biological control, especially in greenhouses of south-eastern Europe and Morocco (URBANEJA *et al.*, 2012). In Spain, control using egg predators such as the

native Mirid *Nesidiocoris tenuis* and application of the insecticidal bacterium *Bacillus thuringiensis* was shown to be highly effective in controlling the tomato borer in the greenhouse (GONZÁLEZ-CABRERA *et al.*, 2011; MOLLÁ *et al.*, 2011). Working at the same Spanish location, ZAPPALÀ *et al.* (2012b) showed that control of *T. absoluta* by *N. tenuis* can also be integrated with careful applications of sulphur (still widely used in organic tomato crops) that is effective on the moth but only moderately to non toxic to the Mirid.

Host plant resistance

Adding HPR would provide plant bottom-up effects to the top-down regulation by natural enemies, thereby increasing the likelihood of regulating pest populations at acceptable low levels in an ecologically sound manner. Commercial tomato hybrids resistant to *T. absoluta* are thought to be easily developed (MALUF *et al.*, 2010b). In Brazil, tomato breeding programs have shown that it is possible to introgress resistance from wild taxa of tomato and related *Solanum* spp. into commercial cultivars to produce allelochemicals such as acyl-sugars that confer resistance to a broad range of tomato pests including whiteflies, aphids, spider mites, as well as *T. absoluta* and other lepidopteran pests (MALUF *et al.*, 2010a, 2010b; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Genes lost during the domestication of tomato were principally related to pest and disease resistance, and this may explain the current wide susceptibility of current cultivars to pathogens and pests (OLIVEIRA *et al.*, 2012), and the resulting high pesticide use that ultimately leads to resistance and adverse environmental impacts.

Pheromones

Pheromone-mediated mating disruption is emerging as an important component of management programs for major insect pests (WITZGALL *et al.*, 2010). The pheromone technology initially used against *T. absoluta* was immature, and was used because no alternatives were available to control the insecticide resistant invading populations. The exceptionally rapid invasion and lack of efficient chemical or biological control methods boosted the demand for monitoring lures initially employed for mass trapping (WITZGALL *et al.*, 2010) and that later evolved as a mating disruption technique. In a study carried out in southwestern Sardinia, COCCO *et al.* (2012) showed that mating disruption is an efficient strategy to control *T. absoluta* in greenhouse tomato crops. Mating disruption, however, can only be implemented in high-containment greenhouses that prevent immigration of mated females from surrounding habitats (VACAS *et al.*, 2011).

Sterile insect technology

The sterile insect technology (SIT) is also being considered as prospective mean of control. CAGNOTTI *et al.* (2012) studied the effects of X-rays on *T. absoluta* as a first step to assess the viability of implementing SIT as a control technique for this species, but no information is available on potential effectiveness. Likely, SIT is not a viable option because of the wide range of the pest, multiple hosts and the pest's apparent high vagility, and the high costs of such a program.

CONCLUDING REMARKS

In the Mediterranean Basin, recent warming (BARTOLINI *et al.*, 2012) consistent with climate change projections for the region (BARKHORDARIAN *et al.*, 2011; DIFFENBAUGH & GIORGI, 2012) has likely facilitated the establishment and spread of invasive species (ROBINET & ROQUES, 2010) including *T. absoluta*. High resistance to insecticides removed constraints of normal quarantine measures (CIFUENTES *et al.*, 2011; DESNEUX *et al.*, 2011) and appears to have enhanced *T. absoluta* rapid invasion of wide geographic areas (CIFUENTES *et al.*, 2011). This species is likely to become a major global pest of tomato and it will have to be managed using mainly ecologically-based approaches over the large geographic areas it has or will invade. This makes the capacity to predict the potential geographic distribution and relative abundance (i.e., the invasiveness) of *T. absoluta* pivotal to developing sound policy for managing this (or any other) invasive species (GUTIERREZ *et al.*, 2011). PBDMs are physiologically-based weather-driven geospatial modeling tools that can be harnessed to gauge accurately the invasiveness of pests such as *T. absoluta*, while circumventing many of the deficiencies of mainstream assessment methods based on essentially correlative, climate envelope approaches (ENMs). PBDM analyses are able to capture the complexity of tomato agroecosystems and produce an interdisciplinary synthesis for *T. absoluta* that fits nicely into the conceptual framework of agroecology. A sound scientific basis for understanding *T. absoluta* dynamics will increase our ability to improve system stability and resilience in the face of the varied complexities of agriculture that occurs across the pest's geographic range.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. M. Neteler (Fondazione Edmund Mach - Centro Ricerca e Innovazione,

Trento, Italy, <http://gis.fem-environment.eu/>) and an international network of co-developers for maintaining the Geographic Resources Analysis Support System (GRASS) software, and making it available to the scientific community. This research was supported by the Center for the Analysis of Sustainable Agricultural Systems (<http://cnr.berkeley.edu/casas/>) and by a Marie Curie International Reintegration Grant within the 7th European Community Framework Program (project number: 224091; acronym: GlobalChangeBiology).

RIASSUNTO

APPROCCIO OLISTICO ALLA GESTIONE DI SPECIE INVASIVE: IL CASO DI TUTA ABSOLUTA (MEYRICK)

Il Bacino del Mediterraneo è una regione del nostro pianeta particolarmente soggetta a cambiamenti climatici ed invasioni biologiche, nella quale un recente aumento della temperatura ha probabilmente facilitato l'insediamento e la diffusione di specie invasive. Stimare distribuzione geografica ed abbondanza relativa delle specie invasive è fondamentale per approntare politiche utili alla loro gestione, e pertanto la necessità di ottenere tali stime è aumentata sensibilmente nel Bacino del Mediterraneo. La tignola del pomodoro *Tuta absoluta* (Meyrick) ha di recente invaso il Bacino del Mediterraneo dall'America del Sud e minaccia di divenire un fitofago chiave del pomodoro a livello mondiale. Il presente contributo riassume informazioni sulla biologia di *T. absoluta* utili allo sviluppo di un modello demografico con base fisiologica (PBDM, "physiologically-based demographic model"), e passa in rassegna le componenti di un possibile programma di gestione della tignola su base ecologica, con ciò preparando il terreno per una valutazione dell'importanza relativa delle diverse componenti a livello territoriale. L'approccio ai modelli demografici basato sulla fisiologia può infatti essere utilizzato nel contesto di un GIS per sviluppare e realizzare un'analisi olistica di questa specie. Le analisi PBDM consentono di cogliere in maniera quantitativa interazioni complesse che sono imprescindibili per gestire su base scientifica le specie invasive, *T. absoluta* compresa. La sintesi interdisciplinare che da queste analisi deriva può contribuire nel quadro concettuale dell'agroecologia alla messa a punto di strategie di gestione adatte a risorse e realtà socioeconomiche specifiche.

BIBLIOGRAFIA

- ALTIERI M.A., 1995 – *Agroecology: the science of sustainable agriculture*. - Westview Press, Boulder, USA, 446 pp.
- ALTIERI M.A., 1999 – *The ecological role of biodiversity in agroecosystems*. - Agric., Ecosyst. Environ., 74: 19-31.
- ALTIERI M.A., NICHOLLS C.I., 2003 – *Soil fertility management and insect pests: harmonizing soil and plant health in agroecosystems*. - Soil Tillage Res., 72: 203-211.
- ALTIERI M.A., NICHOLLS C.I., PONTI L., 2003 – *Biodiversità e controllo dei fitofagi negli agroecosistemi*. - Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Florence, Italy, 223 pp.
- ALTIERI M.A., NICHOLLS C.I., PONTI L., 2009 – Crop

- diversification strategies for pest regulation in IPM systems. In: E.B. Radcliffe, W.D. Hutchinson & R.E. Cancelado (eds.), *Integrated pest management*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 116-130.
- ALTIERI M.A., PONTI L., NICHOLLS C., 2005 – *Enhanced pest management through soil health: towards a belowground habitat management strategy*. - Biodynamics, 253: 33-40.
- ALTIERI M.A., PONTI L., NICHOLLS C.I., 2011 – Soil fertility, biodiversity and pest management. In: G.M. Gurr, S.D. Wratten & B.E. Snyder (eds.), *Biodiversity and insect pests: key issues for sustainable management*. Wiley Blackwell, New York, USA, pp. (in press).
- ANDREWARTHA H.G., BIRCH L.C., 1954 – *The Distribution and Abundance of Animals*. - The University of Chicago Press, Chicago, 782 pp.
- BARKHORDARIAN A., BHEND J., VON STORCH H., 2011 – *Consistency of observed near surface temperature trends with climate change projections over the Mediterranean region*. - Clim. Dynam.: DOI 10.1007/s00382-00011-01060-y.
- BARRIENTOS Z.R., APABLAZA H.J., NORERO S.A., ESTAY P.P., 1998 – *Temperatura base y constante termica de desarrollo de la polilla del tomate, Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Cienc. Investig. Agrar., 25: 133-137.
- BARTOLINI G., DI STEFANO V., MARACCHI G., ORLANDINI S., 2012 – *Mediterranean warming is especially due to summer season*. - Theor. and Appl. Climatol., 107: 279-295.
- BARVE N., BARVE V., JIMÉNEZ-VALVERDE A., LIRA-NORIEGA A., MAHER S.P., PETERSON A.T., SOBERÓN J., VILLALOBOS F., 2011 – *The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling*. - Ecol. Model., 222: 1810-1819.
- BEAUMONT L.J., GALLAGHER R.V., THUILLER W., DOWNEY P.O., LEISHMAN M.R., HUGHES L., 2009 – *Different climatic envelopes among invasive populations may lead to underestimations of current and future biological invasions*. - Divers. Distrib., 15: 409-420.
- BIONDI A., MOMMAERTS V., SMAGGHE G., VIÑUELA E., ZAPPALÀ L., DESNEUX N., 2012 – *The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods*. - Pest Manag. Sci.: DOI: 10.1002/ps.3396.
- CAGNOTTI C.L., VISCARRET M.M., RIQUELME M.B., BOTTO E.N., CARABAJAL L.Z., SEGURA D.F., LÓPEZ S.N., 2012 – *Effects of X-rays on Tuta absoluta for use in inherited sterility programmes*. - J. Pest Sci.: DOI 10.1007/s10340-10012-10455-10349.
- CIFUENTES D., CHYNOWETH R., BIELZA P., 2011 – *Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer Tuta absoluta (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers*. - Pest Manag. Sci., 67: 1155-1162.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2012 – *Control of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique*. - J. Appl. Entomol.: DOI 10.1111/j.1439-0418.2012.01735.x.
- DAMOS P.T., SAVOPOULOU-SOULTANI M., 2010 – *Synchronized diapause termination of the peach twig borer Anarsia lineatella (Lepidoptera: Gelechiidae): Brownian motion with drift?* - Physiol. Entomol., 35: 64-75.
- DAVIS A.J., JENKINSON L.S., LAWTON J.H., SHORROCKS B.,

- WOOD S., 1998a – *Making mistakes when predicting shifts in species range in response to global warming*. - *Nature*, 391: 783-786.
- DAVIS A.J., LAWTON J.H., SHORROCKS B., JENKINSON L.S., 1998b – *Individualistic species responses invalidate simple physiological models of community dynamics under global environmental change*. - *J. Anim. Ecol.*, 67: 600-612.
- DE WIT C.T., GOUDRIAAN J., 1978 – *Simulation of ecological processes*, 2nd edn. - PUDOC Publishers, The Netherlands, pp.
- DESNEUX N., LUNA M., GUILLEMAUD T., URBANEJA A., 2011 – *The invasive South American tomato pinworm, Tuta absoluta, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production*. - *J. Pest Sci.*, 84: 403-408.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUIS K., BURGIO G., ARPAIA S., NARVÁEZ-VASQUEZ C., GONZÁLEZ-CABRERA J., CATALÁN RUESCAS D., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., URBANEJA A., 2010 – *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control*. - *J. Pest Sci.*, 83: 197-215.
- DIFFENBAUGH N., GIORGI F., 2012 – *Climate change hotspots in the CMIP5 global climate model ensemble*. - *Climatic Change*, 114: 813-822.
- DRAKE J.M., LODGE D.M., 2004 – *Global hot spots of biological invasions: Evaluating options for ballast-water management*. - *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci.*, 271: 575-580.
- DRINKWATER L.E., LETOURNEAU D.K., WORKNEH F., VAN BRUGGEN A.H.C., SHENNAN C., 1995 – *Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California*. - *Ecol. Appl.*: 1098-1112.
- ELITH J., LEATHWICK J.R., 2009 – *Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time*. - *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40: 677-697.
- EPPO, EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION, 2005 – *Data sheets on quarantine pests: Tuta absoluta*. - *EPPO Bull.*, 35: 434-435.
- ESTRADA-PEÑA A., 2008 – *Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them*. - *Parasitol. Res.*, 103: 87-95.
- FERRACINI C., INGEGNO B.L., NAVONE P., FERRARI E., MOSTI M., TAVELLA L., ALMA A., 2012 – *Adaptation of indigenous larval parasitoids to Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy*. - *J. Econ. Entomol.*, 105: 1311-1319.
- FISCHLIN A., MIDGLEY G.F., PRICE J.T., LEEMANS R., GOPAL B., TURLEY C., ROUNSEVELL M.D.A., DUBE O.P., TARAZONA J., VELICHKO A.A., 2007 – *Ecosystems, their properties, goods, and services*. In: M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden & C.E. Hanson (eds.), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 211-272.
- GILIOLI G., BAUMGÄRTNER J., 2009 – *Strumenti quantitativi per lo studio e la gestione di specie invasive*. - *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, Anno LVII: 35-47.
- GILMAN S.E., URBAN M.C., TEWKSBURY J., GILCHRIST G.W., HOLT R.D., 2010 – *A framework for community interactions under climate change*. - *Trends Ecol. Evol.*, 25: 325-331.
- GIORGI F., 2006 – *Climate change hot-spots*. - *Geophys. Res. Lett.*, 33: L08707.
- GIORGI F., LIONELLO P., 2008 – *Climate change projections for the Mediterranean region*. - *Global Planet. Change*, 63: 90-104.
- GONZÁLEZ-CABRERA J., MOLLÁ O., MONTÓN H., URBANEJA A., 2011 – *Efficacy of Bacillus thuringiensis (Berliner) in controlling the tomato borer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - *BioControl*, 56: 71-80.
- GUIOT J., 2012 – *A robust spatial reconstruction of April to September temperature in Europe: Comparisons between the medieval period and the recent warming with a focus on extreme values*. - *Global Planet. Change*, 84-85: 14-22.
- GUTIERREZ A.P., 1996 – *Applied population ecology: a supply-demand approach*. - John Wiley and Sons, New York, USA, 300 pp.
- GUTIERREZ A.P., BAUMGÄRTNER J.U., 1984 – *Multitrophic level models of predator-prey energetics: II. A realistic model of plant-herbivore-parasitoid-predator interactions*. - *Can. Entomol.*, 116: 933-949.
- GUTIERREZ A.P., MILLS N.J., SCHREIBER S.J., ELLIS C.K., 1994 – *A physiologically based tritrophic perspective on bottom-up-top-down regulation of populations*. - *Ecology*, 75: 2227-2242.
- GUTIERREZ A.P., PITCAIRN M.J., ELLIS C.K., CARRUTHERS N., GHEZELBASH R., 2005 – *Evaluating biological control of yellow starthistle (Centaurea solstitialis) in California: A GIS based supply-demand demographic model*. - *Biol. Control*, 34: 115-131.
- GUTIERREZ A.P., PONTI L., in press – *Analysis of invasive plants and insects: links to climate change*. In: L.H. Ziska & J.S. Dukes (eds.), *Invasive Species and Climate Change*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp.
- GUTIERREZ A.P., PONTI L., D'OULTREMONT T., ELLIS C.K., 2008 – *Climate change effects on poikilotherm tritrophic interactions*. - *Climatic Change*, 87: S167-S192.
- GUTIERREZ A.P., PONTI L., GILIOLI G., 2010 – *Climate change effects on plant-pest-natural enemy interactions*. In: D. Hillel & C. Rosenzweig (eds.), *Handbook of climate change and agroecosystems: impacts, adaptation, and mitigation*. Imperial College Press, London, UK, pp. 209-237.
- GUTIERREZ A.P., PONTI L., HODDLE M., ALMEIDA R.P.P., IRVIN N.A., 2011 – *Geographic distribution and relative abundance of the invasive glassy-winged sharpshooter: effects of temperature and egg parasitoids (FORUM ARTICLE)*. - *Environ. Entomol.*, 40: 755-769.
- HADDI K., BERGER M., BIELZA P., CIFUENTES D., FIELD L.M., GORMAN K., RAPISARDA C., WILLIAMSON M.S., BASS C., 2012 – *Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (Tuta absoluta)*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42: 506-513.
- HEUVELINK E., 1999 – *Evaluation of a dynamic simulation model for tomato crop growth and development*. - *Ann. Bot.*, 83: 413.
- HULME P.E., 2006 – *Beyond control: wider implications for the management of biological invasions*. - *J. Appl. Ecol.*, 43: 835-847.
- JESCHKE J.M., STRAYER D.L., 2008 – *Usefulness of bioclimatic models for studying climate change and invasive species*. - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1134: 1-24.
- JOËL G., 2012 – *A robust spatial reconstruction of April to September temperature in Europe: Comparisons between the medieval period and the recent warming with a focus on extreme values*. - *Global Planet. Change*, 84-85: 14-22.
- KOGAN M., 1994 – *Plant resistance in pest management*.

- In: R.L. Metcalf & W.H. Luckmann (eds.), *Introduction to insect pest management*. John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 73-128.
- LANDIS D.A., WRATTEN S.D., GURR G.M., 2000 – *Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture*. – *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 175-201.
- LAWLER J.J., WHITE D., NEILSON R.P., BLAUSTEIN A.R., 2006 – *Predicting climate-induced range shifts: model differences and model reliability*. – *Global Change Biol.*, 12: 1568-1584.
- LETOURNEAU D.K., GOLDSTEIN B., 2001 – *Pest damage and arthropod community structure in organic vs. conventional tomato production in California*. – *J. Appl. Ecol.*, 38: 557-570.
- LIETTI M.M.M., BOTTO E., ALZOGARAY R.A., 2005 – *Insecticide resistance in argentine populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. – *Neotrop. Entomol.*, 34: 113-119.
- LIONELLO P., GACIC M., GOMIS D., GARCIA-HERRERA R., GIORGI F., PLANTON S., TRIGO R., THEOCHARIS A., TSIMPLIS M.N., ULBRICH U., XOPLAKI E., 2012 – *Program focuses on climate of the Mediterranean region*. – *EOS Trans. Am. Geophys. Union*, 93: 105-116.
- LOZIER J.D., ANIELLO P., HICKERSON M.J., 2009 – *Predicting the distribution of Sasquatch in western North America: anything goes with ecological niche modelling*. – *J. Biogeogr.*, 36: 1623-1627.
- MALUF W., DE FÁTIMA SILVA V., DAS GRAÇAS CARDOSO M., GOMES L., NETO Á., MACIEL G., NÍZIO D., 2010a – *Resistance to the South American tomato pinworm Tuta absoluta in high acylsugar and/or high zingiberene tomato genotypes*. – *Euphytica*, 176: 113-123.
- MALUF W.R., MACIEL G.M., GOMES L.A.A., CARDOSO M.G., GONÇALVES L.D., DA SILVA E.C., KNAPP M., 2010b – *Broad-spectrum arthropod resistance in hybrids between high-and low-acylsugar tomato lines*. – *Crop Sci.*, 50: 439-450.
- MARIOTTI A., DELL'AQUILA A., 2011 – *Decadal climate variability in the Mediterranean region: roles of large-scale forcings and regional processes*. – *Clim. Dynam.*: DOI 10.1007/s00382-00011-01056-00387.
- MEDeiros M.A., SUJII E.R., DE MORAIS H.C., 2011 – *Fatores de mortalidade na fase de ovo de Tuta absoluta em sistemas de produção orgânica e convencional de tomate*. – *Bragantia*, 70: 72-80.
- MEDeiros M.A., SUJII E.R., MORAIS H.C., 2009a – *Effect of plant diversification on abundance of South American tomato pinworm and predators in two cropping systems*. – *Hortic. Bras.*, 27: 300-306.
- MEDeiros M.A.D., SUJII E.R., RASI G.C., LIZ R.S., MORAIS H.C.D., 2009b – *Padrão de oviposição e tabela de vida da traça-do-tomateiro Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae)*. – *Rev. Bras. Entomol.*, 53: 452-456.
- MESSING R.H., WRIGHT M.G., 2006 – *Biological control of invasive species: solution or pollution?* – *Front. Ecol. Environ.*, 4: 132-140.
- MOLLÁ O., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2011 – *The combined use of Bacillus thuringiensis and Nesidiocoris tenuis against the tomato borer Tuta absoluta*. – *BioControl*, 56: 883-891.
- MYERS N., MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER C.G., DA FONSECA G.A.B., KENT J., 2000 – *Biodiversity hotspots for conservation priorities*. – *Nature*, 403: 853-858.
- NANNINI M., ATZORI F., MURGIA G., PISCI R., SANNA F., 2012 – *Use of predatory mirids for control of the tomato borer Tuta absoluta (Meyrick) in Sardinian greenhouse tomatoes*. – *EPPO Bull.*, 42: 255-259.
- NICOLI G., BURGIO G., 1997 – *Mediterranean biodiversity as source of new entomophagous species for biological control in protected crops*. – *IOBC/wprs Bull.*, 20: 27-38.
- OERKE E.C., DEHNE H.W., 2004 – *Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection*. – *Crop Protect.*, 23: 275-285.
- OLIVEIRA C.M.D., ANDRADE JÚNIOR V.C.D., MALUF W.R., NEIVA I.P., MACIEL G.M., 2012 – *Resistance of tomato strains to the moth Tuta absoluta imparted by allelochemicals and trichome density*. – *Ciênc. Agrotec.*, 36: 45-52.
- PEARSON R.G., DAWSON T.P., 2003 – *Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful?* – *Global Ecol. Biogeogr.*, 12: 361-371.
- PEREYRA P.C., SÁNCHEZ N.E., 2006 – *Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. – *Neotrop. Entomol.*, 35: 671-676.
- PHELAN P.L., MASON J.F., STINNER B.R., 1995 – *Soil-fertility management and host preference by European corn borer, Ostrinia nubilalis (Hübner), on Zea mays L.: a comparison of organic and conventional chemical farming*. – *Agric., Ecosyst. Environ.*, 56: 1-8.
- PHILLIPS S.J., ANDERSON R.P., SCHAPIRE R.E., 2006 – *Maximum entropy modeling of species geographic distributions*. – *Ecol. Model.*, 190: 231-259.
- PHILLIPS S.J., DUDIK M., 2008 – *Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation*. – *Ecography*, 31: 161-175.
- PIMENTEL D., ZUNIGA R., MORRISON D., 2005 – *Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States*. – *Ecol. Econ.*, 52: 273-288.
- PONTI L., ALTIERI M.A., GUTIERREZ A.P., 2007 – *Effects of crop diversification levels and fertilization regimes on abundance of Brevicoryne brassicae (L.) and its parasitization by Diaeretiella rapae (M'Intosh) in broccoli*. – *Agric. For. Entomol.*, 9: 209-214.
- PONTI L., GUTIERREZ A.P., RUTI P.M., 2009 – *The olive-Bactrocera oleae (Diptera Tephritidae) system in the Mediterranean Basin: a physiologically based analysis driven by the ERA-40 climate data*. – *Notiziario sulla Protezione delle Piante - III Serie*, 1: 113-128.
- PONTI L., RICCI C., VERONESI F., TORRICELLI R., 2005 – *Natural hedges as an element of functional biodiversity in agroecosystems: the case of a Central Italy vineyard*. – *Bull. Insectol.*, 58: 19-23.
- PYŠEK P., RICHARDSON D.M., PERGL J., JAROŠÍK V., SIXTOVÁ Z., WEBER E., 2008 – *Geographical and taxonomic biases in invasion ecology*. – *Trends Ecol. Evol.*, 23: 237-244.
- RICCIARDI A., PALMER M.E., YAN N.D., 2011 – *Should biological invasions be managed as natural disasters?* – *Bioscience*, 61: 312-317.
- ROBINET C., ROQUES A., 2010 – *Direct impacts of recent climate warming on insect populations*. – *Integr. Zool.*, 5: 132-142.
- SANNINO L., ESPINOSA B. (eds.), 2010 – *Tuta absoluta: guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa*. – Edizioni L'Informatore Agrario, Verona, Italy, 113 pp.
- SILVA G.A., PICANÇO M.C., BACCI L., CRESPO A.L.B., ROSADO J.F., GUEDES R.N.C., 2011 – *Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, Tuta absoluta*. – *Pest Manag. Sci.*, 67: 913-920.

- SINCLAIR S.J., WHITE M.D., NEWELL G.R., 2010 – *How useful are species distribution models for managing biodiversity under future climates?* - Ecology and Society, 15: 8. <http://www.ecologyandsociety.org/vol15/iss11/art18/>.
- SOBERÓN J., NAKAMURA M., 2009 – *Niches and distributional areas: Concepts, methods, and assumptions*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 19644-19650.
- SOBERÓN J., PETERSON A.T., 2011 – *Ecological niche shifts and environmental space anisotropy: a cautionary note*. - Rev. Mex. Biodivers., 82: 1384-1355.
- SUTHERST R., BOURNE A., 2009 – *Modelling non-equilibrium distributions of invasive species: a tale of two modelling paradigms*. - Biol. Invasions, 11: 1231-1237.
- SUTHERST R.W., MAYWALD G.F., BOURNE A.S., 2007 – *Including species interactions in risk assessments for global change*. - Global Change Biol., 13: 1843-1859.
- TATEM A.J., 2009 – *The worldwide airline network and the dispersal of exotic species: 2007–2010*. - Ecography, 32: 94-102.
- TATEM A.J., HAY S.I., 2007 – *Climatic similarity and biological exchange in the worldwide airline transportation network*. - Proc. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci., 274: 1489.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., BIONDI A., ZAPPALÀ L., 2012 – *Tuta absoluta, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage*. - EPPO Bull., 42: 205-210.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., COLOMBO A., CAMPO G., 2009 – *Rinvenuta in Sicilia Tuta absoluta*. - Informatore Agrario, 65: 71.
- TYLIANAKIS J.M., DIDHAM R.K., BASCOMPTE J., WARDLE D.A., 2008 – *Global change and species interactions in terrestrial ecosystems*. - Ecol. Lett., 11: 1351-1363.
- URBANEJA A., GONZÁLEZ-CABRERA J., ARNÓ J., GABARRA R., 2012 – *Prospects for the biological control of Tuta absoluta in tomatoes of the Mediterranean basin*. - Pest Manag. Sci., 68: 1215-1222.
- URBANEJA A., VERCHER R., NAVARRO LLOPIS V., GARCÍA MARÍ F., PORCUNA J.L., 2007 – *La polilla del tomate, Tuta absoluta*. - Phytoma Espana, 194: 16-23.
- VACAS S., ALFARO C., PRIMO J., NAVARRO-LLOPIS V., 2011 – *Studies on the development of a mating disruption system to control the tomato leafminer, Tuta absoluta Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)*. - Pest Manag. Sci., 67: 1473-1480.
- VAN DEN BOSCH R., MESSENGER P.S., GUTIERREZ A.P., 1982 – *An introduction to biological control*. - Plenum Press, New York, USA, 247 pp.
- VAN DER PUTTEN W.H., MACEL M., VISSER M.E., 2010 – *Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels*. - Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365: 2025-2034.
- VAN DER STRATEN M.J., POTTING R.P.J., VAN DER LINDEN A., 2011 – *Introduction of the tomato leafminer Tuta absoluta into Europe*. - Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet., 22: 23-30.
- VAN LENTEREN J.C., BALE J., BIGLER F., HOKKANEN H.M.T., LOOMANS A.J.M., 2006 – *Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests*. - Annu. Rev. Entomol., 51: 609.
- VANDERMEER J., PERFECTO I., 1995 – *Breakfast of biodiversity: the truth about rain forest destruction*. - Institute for Food and Development Policy, Oakland, USA, pp.
- VELOZ S.D., WILLIAMS J.W., BLOIS J.L., HE F., OTTOBLIESNER B., LIU Z., 2012 – *No-analog climates and shifting realized niches during the late quaternary: implications for 21st-century predictions by species distribution models*. - Global Change Biol., 18: 1698-1713.
- VERCHER R., CALABUIG A., FELIPE C., 2010 – *Ecología, muestreos y umbrales de Tuta absoluta (Meyrick)*. - Phytoma España, 217: 23-26.
- VIGGIANI G., FILELLA F., DELRIO G., RAMASSINI W., FOXI C., 2009 – *Tuta absoluta, a new Lepidoptera now reported in Italy*. - Informatore Agrario, 65: 66-68.
- WARD N.L., MASTERS G.J., 2007 – *Linking climate change and species invasion: an illustration using insect herbivores*. - Global Change Biol., 13: 1605-1615.
- WARREN D.L., 2012 – *In defense of 'niche modeling'*. - Trends Ecol. Evol., 27: 497-500.
- WIENS J.A., STRALBERG D., JONGSOMJIT D., HOWELL C.A., SNYDER M.A., 2009 – *Niches, models, and climate change: Assessing the assumptions and uncertainties*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 19729-19736.
- WITZGALL P., KIRSCH P., CORK A., 2010 – *Sex pheromones and their impact on pest management*. - J. Chem. Ecol., 36: 80-100.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P., RAPISARDA C., GARZIA G.T., 2012a – *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta in Southern Italy*. - Bull. Insectol., 65: 51-61.
- ZAPPALÀ L., SISCARO G., BIONDI A., MOLLÁ O., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2012b – *Efficacy of sulphur on Tuta absoluta and its side effects on the predator Nesidiocoris tenuis*. - J. Appl. Entomol., 136: 401-409.
- ZAVALETA E.S., HOBBS R.J., MOONEY H.A., 2001 – *Viewing invasive species removal in a whole-ecosystem context*. - Trends Ecol. Evol., 16: 454-459.

INSECT PEST MANAGEMENT IN THE AGROECOSYSTEMS OF THE FUTURE

MIGUEL A. ALTIERI (*)

(*) *Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California-Berkeley, U.S.A.; agroeco3@berkeley.edu*
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Meyrick)". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 9 giugno 2012.

Insect pest management in the agroecosystems of the future

The assumptions of cheap energy, stable climate and that humans can control nature under which industrial agriculture was launched, are no longer valid. With global warming many pest species will expand their range, increase their developmental times and number of generations per year, challenging the effectiveness of conventional pest management tools that only address the symptoms and not the causes of pest outbreaks. Biodiversification of agroecosystems is the only strategy that can improve resilience by engendering a greater ability to suppress pest outbreaks which may worsen under future climate scenarios, and by buffering crop production from the effects of greater climate variability and extreme events.

KEY WORDS: agroecology, ecologically based pest management, climate change, resilience, biodiversity.

INTRODUCTION

The industrial agricultural model was launched under the assumptions that abundant water and cheap energy to fuel modern agriculture would always be available and that climate would be stable and not change. As we enter the second decade of the XXI century, these assumptions have proven to be erroneous. Agrochemicals, fuel based mechanization and irrigation operations are derived entirely from dwindling and ever more expensive fossil fuels. Climate extremes are becoming more frequent and violent and threaten genetically homogeneous modern monocultures now covering 80% of the 1500 million hectares of global arable land. Moreover industrial agriculture contributes with about 25-30% of GHG emissions, further altering weather patterns thus compromising the world's capacity to produce food in the future (ROSENZWEIG & HILLEL, 2008).

It was also assumed that nature processes could be controlled by humans without flashbacks to achieve agricultural goals. Due to lack of ecological regulation mechanisms, industrial monocultures are heavily dependent on pesticides. In the past 50 years the use of pesticides has increased dramatically worldwide and now amounts to some 2,6 million tons of pesticides per year with an annual value in the global market of more than US\$ 25 billion. This control strategy has failed, as 540 species of arthropods have developed resistance against more than 1000 different types of

pesticides, which have been rendered useless to control such pests chemically. In the USA, pests losses account for 20-30% for most crops despite the increased use of pesticides (PIMENTEL & LEHMAN, 1993). The ecological consequences and technological treadmills associated with monocultures have been well documented (Fig. 1).

Genetically based approaches to pest control have not provided the expected results. Independent analysis of data on GM crop performance have shown that *Bt* corn provides a marginal operational yield advantage of 3 to 4 percent over typical conventional practices. Since *Bt* corn became commercially available in 1996, its yield advantage averages out to a 0.2 to 0.3 percent yield increase per year. Moreover, GM crops have increased (not reduced as predicted) overall pesticide use by 183 million kgs during the period 1996-2011. This means an additional 0.28 kg/ha of active ingredient for every GM trait acre (GURIAN-SHERMAN, 2009).

To complicate matters even more, future climate change and associated increases in temperature have a number of implications for the management of temperature-dependent insect pests in mid-latitude regions. Changes in climate may result in changes in geographical distribution, increased overwintering, changes in population growth rates, increases in the number of generations, extension of the development season, changes in crop-pest synchrony, changes in interspecific interactions and increased risk of invasion by migrant pests (PORTER *et al.*, 1991). Effects can be problematic for pest

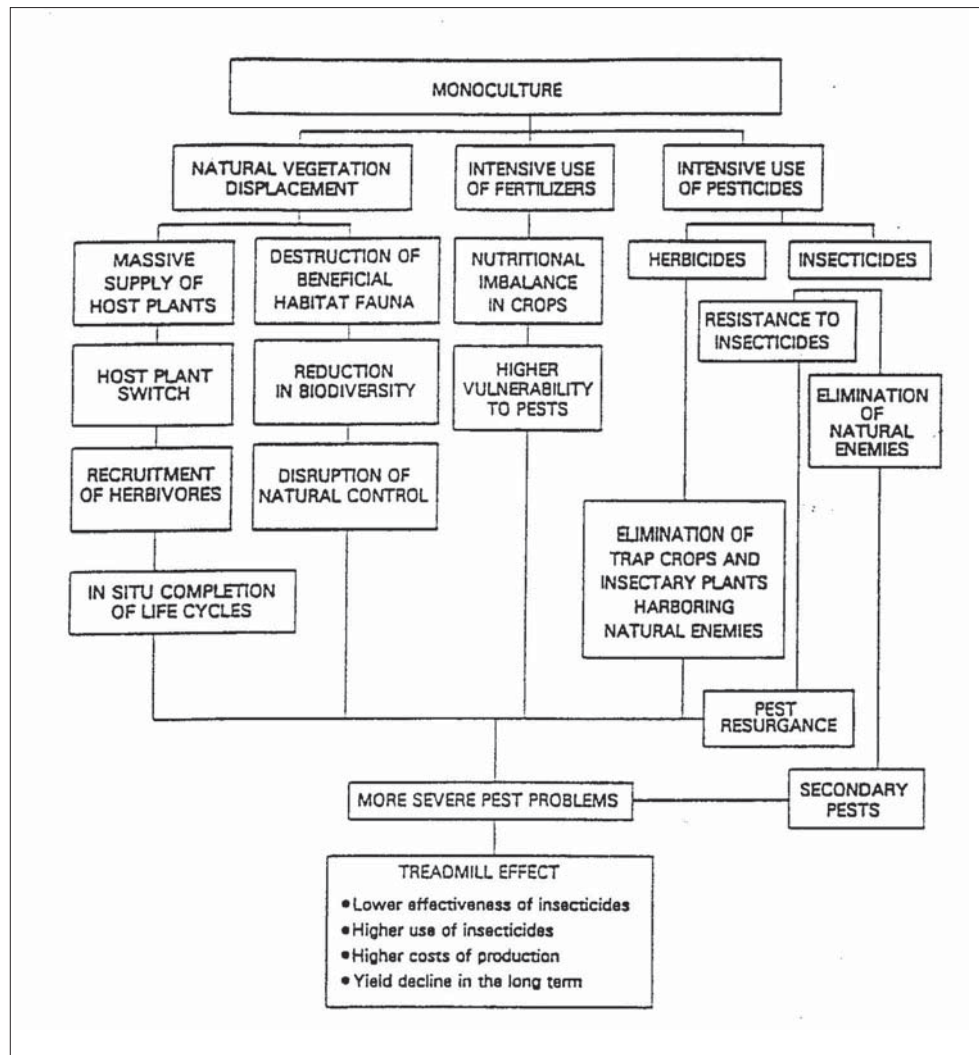


Fig. 1

The ecological consequences of monoculture with special references to pest problems and the agrochemical treadmill.

species that may exhibit faster development times and additional generations within a year. Even more problematic will be many pest species that will expand their geographical ranges to higher latitudes and altitudes, as has already been observed in a number of common butterfly species (CAMMELL & KNIGHT, 2002).

There is no doubt that industrial agriculture is at a crossroads in a world with a shrinking arable land base (which is also being diverted to produce biofuels), with less and more expensive petroleum, increasingly limited supplies of water and nitrogen and within a scenario of a rapidly changing climate, social unrest and economic uncertainty (DE SCHUTTER, 2010). There is therefore an urgent need to transform industrial agricultural production so that it not only produces abundant food but also becomes a major contributor to global biodiversity

conservation and a continuing source of redistributive ecosystem and socio-economic services. This is unquestionably a key endeavour for both scientists and farmers in the second decade of the 21st century (KOOHAFKAN *et al.*, 2011). To achieve this, agroecological research will have to focus on the design and management of diversified agroecosystems that increase the efficiency of resource use while building in resilience in agroecosystems in the face of increasing climate-related hazards, biotic stresses and economic shocks. In the agriculture of the future, IPM strategies cannot continue been dominated by quests for “silver bullet” products or tactics to control pest outbreaks. IPM will have to evolve to Ecologically Based Pest Management (EBPM) addressing the ecological root causes of pest problems in modern agriculture and adopt a more adaptive and preventive approach. Overall

EBPM strategies should include using practices that:

- a) grow healthy plants with good defense capabilities in organically and biologically rich soils;
- b) stress pests by breaking their life cycles or exploiting their biological weaknesses and
- c) enhance populations of beneficial organisms via habitat management approaches.

In other words, ecological concepts are utilized to favor natural processes and biological interactions that optimize synergies so that diversified farms are able to sponsor their own soil fertility, crop protection, and productivity through the activation of soil biology, the recycling of nutrients, the enhancement of beneficial arthropods and antagonists. Based on these principles, agroecologists involved in pest management developed a framework to achieve crop health through agroecosystem diversification and soil quality enhancement, key pillars of agroecosystem health. The main goal is to enhance the *immunity* of the agroecosystem (i.e. natural pest control mechanisms) and regulatory processes (i.e. nutrient cycling and population regulation) through management practices and agroecological designs that enhance plant species and genetic diversity in time and space, and the enhancement of organic matter accumulation and biological activity of the soil (NICHOLLS & ALTIERI, 2007) .

Given climate change scenarios and the negative impacts of extreme events on agricultural production, all strategies will have to be directed at building resilience into agroecosystems. This will require agronomically acceptable and ecologically sound crop diversification strategies that foster biological diversity which in turn enhances the resilience of desirable ecosystem states required to secure the production and essential ecosystem services. Biodiversity provides an insurance, or a buffer, against environmental fluctuations because different species respond differently to change, leading to more predictable aggregate community or ecosystem properties. Such diversity insures the maintenance of a system's functional capacity against potential human management failure that may result from an incomplete understanding of the effects of environmental change (ELMQVIST *et al.*, 2003).

Agroecology capitalizes on the key role of biological diversity in providing capacity for renewal and reorganization of desirable ecosystem states following change, and preventing shifts to undesirable ecosystem states. Sustaining desirable states of an agroecosystem in the face of compounded perturbations requires enhancement

and/or maintenance functional groups of species (predators, parasitoids, pollinators, decomposers, etc) achieved by eliminating agrochemicals and by breaking the monoculture nature of industrial agriculture (ALTIERI, 1995).

Given the new climate change scenarios, the search for practical steps to break the monoculture nature of modern agroecosystems and thus reduce their ecological vulnerability is an imperative. As traditional farmers have demonstrated with farming systems that stood the test of time, restoring agricultural biodiversity at the field and landscape level is key to enhance resiliency. The most obvious advantage of diversification is a reduced risk of total crop failure due to invasions by unwanted species and/or climatic variability as larger numbers of species reduce temporal variability in ecosystem processes in changing environments (LOREAU *et al.*, 2001).

PLANT DIVERSITY AND INSECT PEST INCIDENCE

The challenges of pest suppression may intensify in the future as changes in climate affect pest ranges and potentially bring new pests into agricultural systems. It is expected that insect pests will generally become more abundant as temperatures rise as a result of range extensions and phenological changes. This abundance will be accompanied by higher rates of population development, growth, migration, and overwintering against which the main line of defense involves increasing plant species richness and diversity in spatial and temporal distribution of crops. Such diversified agroecosystems mimic more natural systems and promote natural enemy abundance (ALTIERI & NICHOLLS, 2004). In addition the presence of a more diverse flora within the agroecosystem has direct negative effects on the ability of insect pests to find and utilize host plants and also to remain in the crop habitat (GURR *et al.*, 2004).

A recent review of 45 articles published over the last 10 years testing if plant diversification schemes reduce herbivores and/or increase the natural enemies of herbivores corroborated the associational resistance hypotheses, the enemies hypothesis, and attraction and repellency model applications offered by insect ecologists for the last 30 years to explain insect regulation in diversified systems. LETOURNEAU *et al.* (2011) found extensive support for agroecological models using intercropping schemes, inclusion of flowering plants, and use of plants that repel herbivores or attract them away from the crop. Overall, herbivore suppression, enemy enhancement, and crop damage suppression

effects were significantly stronger on diversified crops than on crops with none or fewer associated plant species.

The degree of complexity involved in increasing biodiversity to enhance pest management ranges from merely diversifying plant species within a monoculture in the form of intercropping to the opposite extreme of landscape level diversification including non-crop and perennial vegetation (GURR *et al.*, 2003, Table 1).

SYNERGISTIC EFFECTS OF SOIL FERTILITY

Emergent ecological properties develop in diversified agroecosystems allowing biodiversity to thrive and establish complex food webs and interactions. Several entomologists recognized early on that biodiversity is integral to the maintenance pest stable agroecoystems and pointed to the utility of crop diversification as an important resilience strategy for pest management (LANDIS *et al.*, 2000). New evidence suggests that biodiversification must be accompanied by improvement of soil quality, as the link between healthy soils and healthy plants is fundamental to truly ecologically based IPM (Figure 2). The integrity of the agroecosystem relies on synergies of plant diversity and the continuing function of the soil microbial community, and its relationship with organic matter. Results from many studies conducted on

organic farming systems provide interesting evidence to support the view that the long-term joint management of plant diversity and soil organic matter can lead to better plant resistance against insect pests (ALTIERI & NICHOLLS, 2003).

Studies in tropical Asian irrigated rice agroecosystems by SETTLE *et al.* (1996) showed that by increasing organic matter in test plots, researchers could boost populations of detritivores and plankton-feeders, and in turn significantly boost the abundance of generalist predators. Surprisingly, organic matter management proved to be a key mechanism in the support of high levels of natural biological control. Organically managed soils usually exhibit a richer community of natural enemies that feed on alternative prey found above or within the soil. Collembolla have been shown to be an important prey group for generalist predators, such as the ground beetle *Bembidion lapros* and linyphiid spiders in arable fields, helping to sustain and retain these predators as pest control agents within the crop.

In reviewing 50 years of research relating to crop nutrition and insect attack, SCRIBER (1984) found 135 studies showing increased damage and/or growth of leaf-chewing insects or mites in N-fertilized crops, versus fewer than 50 studies in which herbivore damage was reduced by normal fertilization regimens. In aggregate, these results suggest a hypothesis with implications for fertilizer use patterns in agriculture, namely that high N inputs can precipitate high levels of herbivore

Table 1 – Examples of levels of agroecosystem complexity via biodiversity enhancement benefiting pest management (after GURR *et al.*, 2003)

Level of complexity	Nature of diversification	Example
Diversification within A monoculture	Make crop structurally more diverse	Alternate harvesting of lucerne strips to preserve habitat for beneficial insects
Relax a monoculture	Grow mixture of varieties	Mixed variety plantings to reduce herbivore numbers and damage
Allow non-crop vegetation within monoculture	Tolerable levels of weed growth in crop	weed strips to enhance natural enemies
Diversifying borders of Monoculture	Sow non-crop vegetation in field margins	Phacelia borders around wheat fields to enhance syrphids
Break monoculture	Grow two or more crops at same time and space	strip or intercropping
Diversify vegetation beyond field margin	enrich fallow fields	allow fallow fields adjacent to crops
Farmscaping	Agroforestry integrating crops and animals	diversify with perennials to increase habitat for natural enemies
Diversify the matrix around crops	Landscapes with corridors and forest islands	Complex landscapes providing regional refugia to natural enemies

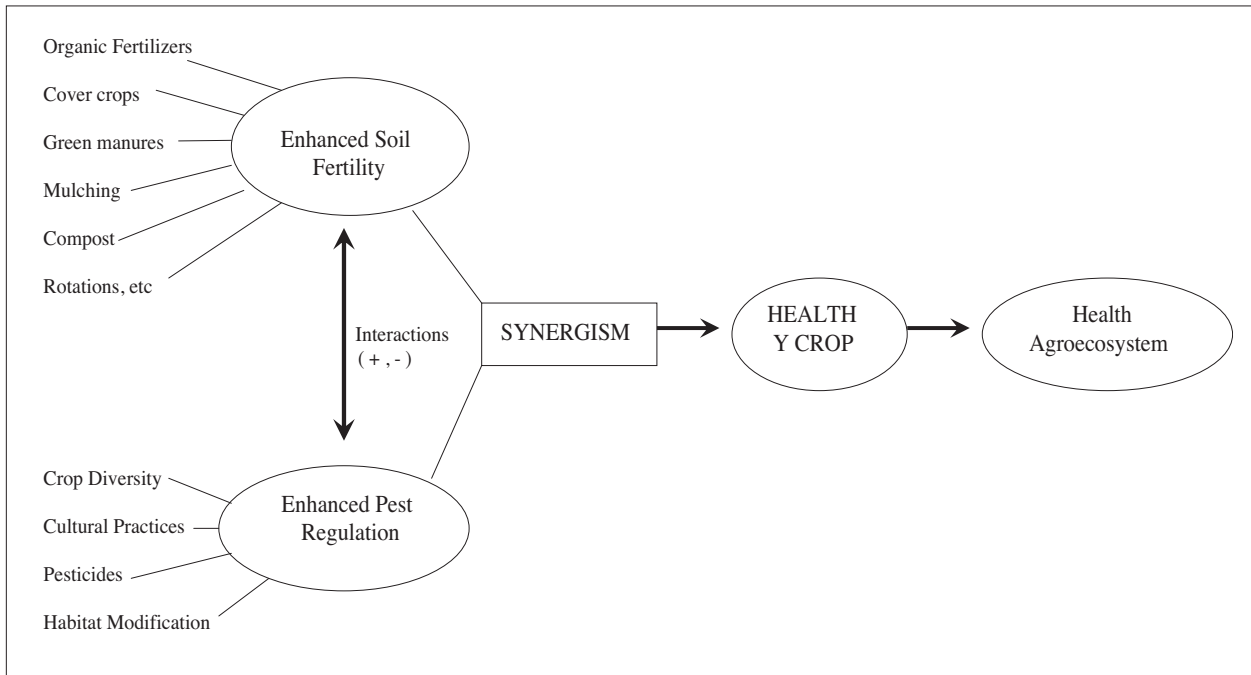


Fig. 2
The potential synergism between soil fertility management and IPM.

damage in crops. As a corollary, crop plants would be expected to be less prone to insect pests and diseases if organic soil amendments are used, these generally resulting in lower N concentrations in the plant tissue. Researchers documenting lower abundance of several insect herbivores in low-input systems have partly attributed such reductions to the lower nitrogen content in organically farmed crops (LAMPKIN, 1990).

AGROBIODIVERSITY AND RESILIENCE TO CLIMATE CHANGE

Detailed analyses of agricultural performance after extreme climatic events have revealed that resilience to climate disasters is closely linked to the level of on-farm biodiversity. A survey conducted in Central American hillsides after Hurricane Mitch showed that farmers using diversification practices (such as cover crops, intercropping and agroforestry) suffered less damage than their conventional monoculture neighbours. A survey of more than 1,800 neighbouring “sustainable” and “conventional” farms in Nicaragua, Honduras and Guatemala, found that the “sustainable” plots had between 20 to 40% more topsoil, greater soil moisture and less erosion, and also experienced lower economic losses than their conventional neighbours (HOLT-GIMENEZ, 2001). Similarly, those coffee farms in Mexico which exhibit high levels of

complexity and plant diversity suffered less damage from Hurricane Stan (LIN, 2011). Forty days after Hurricane Ike hit Cuba in 2008, researchers found that diversified farms exhibited losses of 50%, compared to 90 or 100% in neighbouring monocultures. Likewise, agro-ecologically managed farms showed a faster recovery in their production than monoculture farms (ROSSET *et al.*, 2011).

These are only a few examples that show how complex agro-ecosystems are able to adapt and resist the effects of climate change. Agroforestry systems have been shown to buffer crops from large fluctuations in temperature, thereby keeping the crops closer to their optimum conditions. More shaded coffee systems have shown to protect crops from low precipitation and reduced soil water availability. This is because the overstory reduces soil evaporation and the roots increase soil water infiltration. At the same time, intercropping enables farmers to produce various crops simultaneously and minimize risk. Polycultures exhibit greater yield stability and less productivity declines during drought. A study of the effect of drought on polycultures showed that intercropping is enormously successful. Quite interestingly, the rate of overyielding actually increased with water stress, showing that the relative differences in productivity between monocultures and polycultures increase with greater stress (NATARAJAN & WILLEY, 1986).

Another example is that of the intensive silvo-

pastoral systems (ISS), which combine fodder shrubs planted at high densities, trees, palms, and pastures. High stocking levels are achieved through rotational grazing, which allows for the natural production of milk and meat in these systems. At the El Hatico farm, in Cauca, Colombia, a five story ISS composed of a layer of grasses, *Leucaena* shrubs, medium-sized trees and a canopy of large trees has, over the past 18 years, increased its stocking rates to 4.3 dairy cows/ha and its milk production by 130%, as well as completely eliminating the use of chemical fertilizers. 2009 was the driest year in El Hatico's 40-year record, and the farmers saw a reduction of 25% in pasture biomass, yet the production of fodder remained constant throughout the year, neutralizing the negative effects of drought on the whole system. In response to the extreme weather, the farm had to adjust its stocking rates. In spite of this, the farm's milk production for 2009 was the highest on record, with a surprising 10% increase compared to the previous four years. Meanwhile, farmers in other parts of the country reported severe animal weight loss and high mortality rates due to starvation and thirst (MURGUEITIO *et al.*, 2011). The combined benefits of water regulation, a favorable microclimate, biodiversity, and carbon stocks in such diversified farming systems, not only provide environmental goods and services for producers, but also greater resilience to climate change (ALTIERI & NICHOLLS, 2012).

IMPROVING ENERGY EFFICIENCY OF AGROECOSYSTEMS

Given the rising costs of energy a key of agroecology is to augment ecological processes that foster plant nutrition and pest regulation, eliminating agrochemicals and reducing other external inputs to improve the energy efficiency of cropping systems. Diversification strategies discussed above have important implication for energy use in agriculture, as they can significantly reduce external inputs in production and also improve several aspects of agriculture's environmental and economic performance. Studies conducted in the US midwest have shown that fossil energy inputs in organic corn production were 31 percent lower than conventional corn production, and the energy inputs for organic soybean production were 17 percent lower than conventional soybean production (PIMENTEL *et al.*, 2008). A long term evaluation spanning from 1981 through 2002 was conducted at the Rodale Institute in Pennsylvania, comparing a conventional

maize and soybean system with animal manure and legume-based organic systems. Researchers found that the energy inputs for the organic animal and organic legume systems were 28% and 32% less than those of the conventional system, respectively. Commercial fertilizers for the conventional system were produced employing fossil energy, whereas the nitrogen nutrients for the organic systems were obtained from legumes or cattle manure, or both. (PIMENTEL *et al.*, 2005).

DIVERSIFICATION OF MODERN, LARGE SCALE SYSTEMS

Contemporary notions of modern mechanized farming connotes the necessity of monocultures. There is little question however that given sufficient motivation appropriate technology could be developed to mechanize multiple cropping systems (HORWITH, 1985). Simpler diversification schemes based on 2-3 plant species may be more amenable for large scale farmers and can be managed using modern equipment. One of such schemes is strip intercropping which consists in the production of more than one crop in strips that are narrow enough for the crops to interact, yet wide enough to permit independent cultivation. Agronomically beneficial strip intercropping systems have usually included corn or sorghum, which readily respond to higher light intensities. Studies with corn and soybean strips four to 12 rows wide have demonstrated increased corn yields (+5 to +26%) and decreased soybean yields (-8.5 to -33%) as strips get narrower. Alternating corn and alfalfa strips provided greater gross returns than sole crops. Twenty-foot wide strips were most advantageous, with returns between \$17 and \$29/acre over the sole crops depending on the year (WEST & GRIFFITH, 1992).

Legumes intercropped with cereals is a key diversification strategy not only because of the provision of nitrogen, but because the mixtures enhance soil cover, smother weeds and increase soil microbial diversity such as vesicular arbuscular mycorrhizae (VAM) which facilitate P transfer and the availability of K, Ca and Mg (MACHADO, 2009). In the case of adverse weather conditions like delay in the onset of rains and/or failure of rains for few days to weeks some time during the crop period, an intercropping system provides advantages as at least one crop will survive to give economic yields, thereby providing for the necessary insurance against unpredictable weather. Polycultures exhibit greater yield stability and less productivity declines during a drought than in the

case of monocultures. This was well demonstrated by NATARAJAN & WILLEY (1986) who examined the effect of drought on enhanced yields with polycultures by manipulating water stress on intercrops of sorghum (*Sorghum bicolor*) and peanut (*Arachis* spp.), millet (*Panicum* spp.) and peanut, and sorghum and millet. All the intercrops overyielded consistently at five levels of moisture availability, ranging from 297 to 584 mm of water applied over the cropping season. Quite interestingly, the rate of overyielding actually increased with water stress, such that the relative differences in productivity between monocultures and polycultures became more accentuated as stress increased.

No-till row crop production also is promising given its soil conservation and improvement potential. Although these systems are highly dependent on herbicides, there are some organic farmers who practice it without synthetic herbicides. A breakthrough occurred with the discovery that certain winter annual cover crops, notably cereal rye and hairy vetch, can be killed by mowing at a sufficiently late stage in their development and cut close to the ground. These plants generally do not regrow significantly, and the clippings form an *in situ* mulch through which vegetables can be transplanted with no or minimal tillage. The mulch hinders weed seed germination and seedling emergence, often for several weeks. As they decompose many cover crop residues can release allelopathic compounds that may suppress the weed growth. This inhibition is caused by phytotoxic substances that are passively liberated through decomposition of plant residues. There is a long list of green manure species that have phytotoxic effects (ALTIERI *et al.*, 2011). This effect is usually sufficient to delay the onset of weed growth until after the crop's minimum weed-free period, which makes postplant cultivation, herbicides, or hand weeding unnecessary, yet exhibiting acceptable crop yields. Tomato and some late-spring brassica plantings perform especially well, and some large-seeded crops such as maize and beans can be successfully direct-sown into cover crop residues. Not only can cover crops planted in no-till fields fix nitrogen in the short term, they can also reduce soil erosion and mitigate the effects of drought in the long term, as the mulch conserves soil moisture. Cover crops build vertical soil structure as they promote deep macropores in the soil, which allow more water to penetrate during the winter months and thus improve soil water storage.

Cover crops can also be used in perennial crops such as orchards and vineyards. These plant mixtures play several roles such as erosion control,

improved soil structure and organic content, nitrogen fixation, and habitat for beneficial insects. Maintenance of floral diversity by organic farmers throughout the growing season in northern California vineyards, in the form of summer cover crops of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and sunflower (*Helianthus annuus*), had a substantial impact on the abundance of western grape leafhopper, *Erythroneura elegantula* (Homoptera: Cicadellidae), and western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), and associated natural enemies. During two consecutive years, vineyard systems with flowering cover crops were characterized by lower densities of leafhoppers and thrips, and larger populations and more species of general predators, including spiders. Although *Anagrus epos* (Hymenoptera: Mymaridae), the most important parasitoid, achieved high numbers and inflicted noticeable mortality of grape leafhopper eggs, no differences in egg parasitism rates were observed between cover cropped and monoculture systems. Mowing of cover crops forces movement of *Anagrus* and predators to adjacent vines resulting in the lowering of leafhopper densities in such vines. Results indicated that habitat diversification using summer cover crops that bloom most of the growing season, supports large numbers of predators and parasitoids thereby favoring enhanced biological control of leafhoppers and thrips in vineyards (NICHOLLS *et al.*, 2000).

CONCLUSIONS

Long term solutions to pest problems arising in the future planetary scenarios dominated by climate change and escalating energy costs can be only achieved by restructuring and managing agricultural systems in ways that will enhance their overall energy efficiency, diversity and resilience. Crop diversification can improve resilience in a variety of ways: by engendering a greater ability to suppress pest outbreaks which may worsen under future climate scenarios, as well as by buffering crop production from the effects of greater climate variability and extreme events. Such benefits point toward the obvious value of adopting crop diversification to improve resilience. In the future, pest managers will have to increasingly utilize ecological concepts to favor natural processes and biological interactions that optimize synergies so that diversified farms are able to sponsor their own soil fertility, crop protection, and productivity through the activation of soil biology, the recycling of nutrients, the enhancement of beneficial

arthropods and antagonists. EBPM will pay a major role in the design of pest stable agroecosystems within an adaptive strategy to deal with climatic extremes.

REFERENCES

- ALTIERI M.A., 1995 – *Agroecology: the science of sustainable agriculture*. Westview Press, Boulder, Colorado, 433 pp.
- ALTIERI M.A., NICHOLLS C.I., 2003 – *Soil fertility management and insect pests: harmonizing soil and plant health in agroecosystems*. - Soil and Tillage Research, 72: 203-211.
- ALTIERI M.A., NICHOLLS C.I., 2004 – *Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems*. - Haworth Press, New York, 236 pp.
- ALTIERI M.A., LANA M., BITTENCOURT H., KIELING A., COMIN J., LOVATO P., 2011 – *Enhancing Crop Productivity via Weed Suppression in Organic No-Till Cropping Systems in Santa Catarina, Brazil*. - Journal of Sustainable Agriculture, 35 (8): 855-869.
- ALTIERI M.A., NICHOLLS C.I., 2012 – *Agro-ecological approaches to enhance resilience to climate change*. - Farming Matters, 28: 14-19.
- CAMMELL M.E., KNIGHT J.D., 2002 – *Effects of climatic change on the population dynamics of crop pests*. - Advances in Ecological Research, 22: 117-162.
- DE SCHUTTER O., 2010 – *Report Submitted by the Special Rapporteur on the Right to Food, UN General Assembly*. Human Rights Council Sixteenth Session, Agenda item 3 A/ HRC/16/49.
- ELMQVIST T., FOLKE C., NYSTRÖM M., PETERSON G., BENGTSOON J., WALKER B., NORBERG J., 2003 – *Response diversity, ecosystem change, and resilience*. - Frontiers in Ecology and the Environment, 1: 488-494.
- GURIAN-SHERMAN D., 2009 – *Failure to yield: evaluating the performance of genetically engineered crops*. Union of Concerned Scientists, Cambridge, Mass, 59 pp.
- GURR G.M., WRATTEN S.D., ALTIERI M.A., 2004 – *Ecological engineering for pest management*. CABI Publishing, Wallingford, 225 pp.
- GURR G.M., WRATTEN S.D., LUNA J.M., 2003 – *Multi-function agricultural biodiversity: Pest management and other benefits*. - Basic and Applied Ecology, 4: 107-116.
- HOLT-GIMENEZ E., 2001 – *Measuring farms agroecological resistance to Hurricane Mitch*. - LEISA, 17: 18-20.
- HORWITH B., 1985 – *A role for intercropping in modern agriculture*. - BioScience 35: 286-291.
- KOOHAFKAN P., ALTIERI M. A., HOLT GIMENEZ E., 2011 - *Green Agriculture: foundations for biodiverse, resilient and productive agricultural systems*. - International Journal of Agricultural Sustainability, 10: 61-75.
- LAMPKIN N., 1990. *Organic Farming*. Farming Press Books, Ipswich, U.K, 701 pp.
- LANDIS D.A., WRATTEN S.D., GURR G.A., 2000 – *Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture*. - Annual Review of Entomology, 45: 175-201.
- LETOURNEAU DK., ARMBRECHT I., SALGUERO RIVERA B., MONTOYA LERMA J., JIMÉNEZ CARMONA E., DAZA M.C., ESCOBAR S., GALINDO V., GUTIÉRREZ C., DUQUE LÓPEZ S., LÓPEZ MEJÍA J., ACOSTA RANGEL A.M., 2011 – *Does plant diversity benefit agroecosystems? A synthetic review*. - Ecological Applications, 21: 9-21.
- LIN B., 2011 – *Resilience in Agriculture through Crop Diversification: Adaptive Management for Environmental Change*. - BioScience, 61: 183-193.
- LOREAU M., S Naeem, P Inchausti, J Bengtsson 2001 – *Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges*. - Science, 294: 804-808.
- MACHADO S., 2009 – *Does intercropping have a role in modern agriculture?* - Journal of Soil and Water Conservation, 64: 55A-57A.
- MURGUETIO E., CALLE Z., URIBE F., CALLE A., SOLORIO B., 2011 – *Native trees and shrubs for the productive rehabilitation of tropical cattle ranching lands*. - Forest Ecology and Management, 261: 1654-1663.
- NATARAJAN M., WILLEY R.W, 1986 – *The effects of water stress on yield advantages of intercropping systems*. - Field Crops Research, 13: 117-131.
- NICHOLLS C.I., ALTIERI M.A., 2007 – *Agroecology: contributions towards a renewed ecological foundation for pest management*. In: Ecological theory and integrated pest management, Kogan M. & Jepson P. Ed., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 431-468.
- NICHOLLS C.I., PARRELLA M.P., ALTIERI M.A., 2000 – *Reducing the abundance of leafhoppers and thrips in a northern California organic vineyard through maintenance of full season floral diversity with summer cover crops*. - Agricultural and Forest Entomology, 2: 107-113.
- PIMENTEL D., LEHMAN H., 1993 – *The pesticide question*. Chapman and Hall, New York, 431 pp.
- PIMENTEL D., HEPPERLY D., HANSON J., DOUDS D., SEIDEL R., 2005 – *Environmental, Energetic, and Economic Comparisons of Organic and Conventional Farming Systems*. - BioScience, 55: 573-582.
- PIMENTEL D., WILLIAMSON S., ALEXANDER C., GONZALEZ-PAGAN O., KONTAK C., MULKEY S., 2008 – *Reducing energy inputs in the US food system*. - Human Ecology, 36: 459-471.
- PORTER J.H., PARRY M.L., CARTER T.R., 1991 – *The potential effects of climatic change on agricultural insect pests*. - Agricultural and Forest Meteorology, 51: 221-240.
- ROSENZWEIG C., HILLEL D., 2008 – *Climate Change and the Global Harvest: Impacts of El Nino and Other Oscillations on Agroecosystems*. Oxford University Press, New York, 376 pp.
- ROSSET P.M., MACHÍN-SOSA B., ROQUE-JAIME A.M., AVILA-LOZANO D.R., 2011 – *The Campesino-to-Campesino agroecology movement of ANAP in Cuba*. Journal of Peasant Studies, 38 (1): 161-191.
- SCRIBER J.M., 1984 – *Nitrogen nutrition of plants and insect invasion*. In: Nitrogen in crop production, Hauck R.D. Ed., Madison, WI, American Society of Agronomy, pp. 441-460.
- SETTLE W., ARIAWAN H., TRI ASTUTI E., CAHYANA W., HAKIM A.L., HINDAYANA D., LESTARI A.S., PAJARNINGSIH, S., 1996 – *Managing Tropical Rice Pests Through Conservation of Generalist Natural Enemies and Alternative Prey*. - Ecology, 77: 1975-1988.
- WEST T.D., GRIFFITH D.R., 1992 – *Effect of strip-intercropping corn and soybean on yield and profit*. - Journal of Production Agriculture, 5: 107-110.

INTERAZIONI MULTITROFICHE DEGLI INSETTI E NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO

FRANCESCO PENNACCHIO (*) - BARBARA GIORDANA (**)

(*) Dipartimento di Agraria, Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay", Università di Napoli "Federico II", 80055 Portici (NA), Italy; f.pennacchio@unina.it

(**) DiPSA, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano, Italy

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbiotici e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

Insect multitrophic interactions and innovative control strategies

The astonishing biodiversity of parasitic Hymenoptera and the large variety of strategies they use to colonize and exploit their insect hosts offer a wealth of molecular tools that can be profitably used for pest control. The virulence factors encoded by parasitic wasps and their associated symbionts are able to suppress the immune response of the host and to disrupt its physiological and reproductive processes. These molecules can directly target insect pests, and, by disrupting their immune response, they can also enhance the value of the ecological services offered by natural antagonists. The use of these natural bioinsecticides is highly dependent on the development of targeted delivery strategies, which have to be designed to enhance both the efficacy and safety. The fast expansion of molecular technologies opens new avenues of research and makes possible the development of innovative pest control technologies, based on the use of parasitoid-derived molecules and/or on strategies mimicking their effects on insect hosts.

KEY WORDS: virulence factors, host regulation, bioinsecticide, biological control, Hymenoptera, parasitic wasps, bioinsecticide delivery.

INTRODUZIONE

Gli insetti sono responsabili di notevoli perdite nelle colture in tutto il mondo (OERKE e DEHNE, 2004). La necessità di limitare il danno provocato da questi artropodi, a lungo perseguita tramite l'uso di insetticidi di sintesi (CASIDA e QUISTAD, 1998), è sempre stata di importanza primaria in agricoltura. Sfortunatamente, i benefici effetti immediati ottenuti con l'uso intensivo dei mezzi chimici di controllo sono stati ben presto superati dai notevoli problemi che questi pongono, quali lo sviluppo di resistenza negli insetti bersaglio, la contaminazione ambientale e la tossicità per gli insetti non-target. Questa consapevolezza ha portato alla ricerca e allo sfruttamento di alternative di origine biologica, da introdurre nell'ambito di strategie integrate di gestione degli insetti dannosi (IPM) (DENT, 1995).

Lo studio delle relazioni molecolari alla base delle interazioni tra gli insetti e i loro simbiotici, specialmente piante e microrganismi, ha permesso la scoperta di nuovi insetticidi di origine naturale (ROH *et al.*, 2007; BRAVO *et al.*, 2007; DAYAN *et al.*, 2009; KIRST, 2010). Il notevole impegno della ricerca in questo campo ha portato a una rapida espansione delle nostre conoscenze sulle tossine ad attività insetticida, che hanno ormai superato

quelle delle pur ben note tossine *Bt*, consentendo l'identificazione di numerosi antagonisti come fonti biologiche di nuove molecole insetticide (NICHOLSON, 2007).

Il gruppo di insetti antagonisti più ampio e diversificato è rappresentato dagli imenotteri parassitoidi, che utilizzano una ampia varietà di strategie e di molecole per uccidere e/o manipolare la fisiologia delle loro vittime (PENNACCHIO e STRAND, 2006). Entrambe costituiscono di fatto una preziosa fonte di biodiversità molecolare, finora non sfruttata, da cui è possibile attingere nuovi principi attivi da impiegare proficuamente per il controllo degli insetti dannosi.

In questa nota vengono sinteticamente riprese parte delle informazioni, estesamente discusse di recente da PENNACCHIO e MANCINI (2012) e PENNACCHIO *et al.* (2012), sulle potenziali ricadute applicative in agricoltura delle recentissime ricerche sui polidnavirus e il veleno dei parassitoidi. Il principale obiettivo di questo scritto è quello di fornire uno schema concettuale in cui inserire le numerose conoscenze in nostro possesso sulle interazioni molecolari tra i parassitoidi e i loro ospiti, e di esaminare come tali conoscenze possano condurre a ideare nuove tecnologie di controllo su base biologica più ecocompatibili. Questa

area di studio, decisamente agli esordi, si sta rapidamente espandendo e rappresenta la nuova frontiera circa lo sfruttamento della biodiversità naturale, al fine di sviluppare interventi sostenibili e innovativi in agricoltura.

DAL CONTROLLO BIOLOGICO AL CONTROLLO SU BASE BIOLOGICA

L'utilizzo di parassiti, di predatori e di patogeni per limitare la densità delle popolazioni di insetti dannosi è definito controllo biologico (DE BACH, 1964). L'uso di organismi utili è stato molto incoraggiato ed è incluso in molti programmi IPM (BALE *et al.*, 2008). Gli strumenti molecolari adottati da numerosi antagonisti naturali degli insetti per superare le barriere difensive dell'ospite sono ormai ben noti. In tal modo si rendono disponibili nuove conoscenze sui fattori di virulenza che, associate a quelle dei recettori nell'ospite, possono consentire la definizione di tecnologie innovative di controllo. Queste tecnologie, basate sull'uso di molecole e geni prodotti e rilasciati da nemici naturali, rientrano in una definizione più ampia di controllo biologico, che include quindi non solo l'uso dell'organismo vivente, ma anche delle molecole e dei geni che da esso derivano (TREMBLAY, 2003). Un brillante esempio è fornito dall'entomopatogeno *Bacillus thuringiensis*, che, dalla sua scoperta più di cento anni fa, è tuttora usato come fonte di nuove tossine e di geni per il controllo degli insetti (ROH *et al.*, 2007).

Gli Imenotteri parassitoidi sono efficaci antagonisti di numerosi tipi di insetti e la loro strategia di attacco e successivo sfruttamento dell'ospite si basano frequentemente sulle secrezioni riproduttive della femmina, che inducono una drastica riprogrammazione biochimico/fisiologica della vittima, in modo da aumentarne l'idoneità nutrizionale a vantaggio della propria progenie, massimizzandone le opportunità di sviluppo (VINSON *et al.*, 2001). Le secrezioni riproduttive sono costituite da una miscela complessa di veleno e fattori ovarici, talvolta associati a simbionti virali, che vengono rilasciati insieme con l'uovo al momento della parassitizzazione (QUICKE, 1997). Questa peculiare miscela di molecole è in grado di agire sulle principali attività fisiologiche e riproduttive degli insetti e, di conseguenza, i singoli componenti sono interessanti candidati per lo sviluppo di nuovi insetticidi naturali.

Lo straordinario processo di radiazione adattativa degli Imenotteri parassiti ha permesso loro la colonizzazione di un notevolissimo numero di nicchie ecologiche, grazie allo sviluppo di una enorme varietà di strategie di virulenza (PENNACCHIO e STRAND,

2006). Le componenti chiave del corredo ancestrale utilizzato dagli idiobionti (che bloccano lo sviluppo dell'ospite e lo uccidono rapidamente poco dopo l'ovideposizione) sono il veleno, di varia composizione e ricco in neurotossine in grado di determinare la paralisi e la morte dell'ospite, e fattori immunosoppressivi, necessari per prevenire gli effetti negativi della coagulazione e melanizzazione, che limiterebbero la capacità degli ectoparassiti di ingerire l'alimento (PENNACCHIO e STRAND, 2006).

La transizione dall'ectoparassitismo all'endoparassitismo, che si è manifestata diverse volte nel corso dell'evoluzione degli Imenotteri parassiti, ha determinato la comparsa di diverse forme di koinobiosi (sviluppo del parassitoide nell'ospite vivente), caratterizzate da profonde e complesse interazioni tra l'ospite e il parassitoide (WITHFIELD, 1998; 2003). Le drastiche alterazioni fisiologiche che si osservano nell'ospite parassitizzato sono accuratamente modulate sia nel tempo che nello spazio, e la complessa e prolungata regolazione è ottenuta grazie a singolari strategie di rilascio dei fattori di regolazione. Tra queste sono compresi i teratociti, un peculiare tipo cellulare di origine extraembrionale dotato di straordinaria capacità secretoria, e i virus simbionti associati al parassitoide, membri della famiglia dei Polydnaviridae, che sono in grado di coadiuvare ed espandere l'azione del veleno. (PENNACCHIO e STRAND, 2006; PENNACCHIO e MANCINI, 2012). Questi virus, associati ad alcuni icneumonidi e braconidi che parassitizzano larve di lepidotteri, sono stabilmente integrati nei genomi delle vespe come provirus: le particelle virali vengono prodotte esclusivamente nel calice ovarico della vespa e sono in grado di infettare i tessuti dell'ospite parassitizzato esprimendo, senza replicazione, potenti fattori di virulenza. Le principali patologie che si manifestano nelle larve parassitizzate in natura, sono del tutto o in parte indotte dall'infezione virale. I Polidnavirus (PDVs) sono, quindi, una fonte naturale di molecole altamente selettive con un elevato potenziale bioinsetticida.

I parassitoidi e i simbionti a essi associati, però, possono essere realisticamente considerati buoni candidati per il controllo biologico solo se viene integralmente compreso il meccanismo molecolare alla base dell'alterazione della fisiologia dell'ospite che essi mediano. La conoscenza di tale meccanismo offre la possibilità di sviluppare nuove tecnologie di controllo, in grado di sfruttare gli strumenti e di mimare le strategie utilizzate dai parassitoidi per uccidere il proprio ospite: per questa ragione simili strategie costituiscono una innovativa categoria di strumenti di controllo su base biologica.

IMENOTTERI PARASSITOIDI E CONTROLLO
SU BASE BIOLOGICA: ATTUALI CONOSCENZE
E PROSPETTIVE FUTURE

L'uso delle molecole codificate dagli imenotteri parassitoidi e dai loro simbionti virali è già stato sperimentato con risultati incoraggianti. Il primo caso-studio descritto in letteratura riguarda l'uso di una proteina secreta dai teratociti di *Microplitis croceipes* (TSP14), che induce numerose alterazioni patologiche nelle larve parassitizzate delle specie di *Heliothis/Helicoverpa* (JARLFORS *et al.*, 1997). La proteina è attiva per ingestione e quando è espressa in piante di tabacco transgeniche determina una riduzione della velocità di crescita larvale e un aumento della mortalità (MAITI *et al.*, 2003).

Un promettente livello di attività insetticida è stato osservato anche per diversi membri della famiglia genica Cys-motif dell'icnovirus di *Comptosia sonorensis* (CsIV), a dimostrazione che queste molecole codificate dal polidnavirus, con una significativa similarità di sequenza con TSP14, costituiscono una ulteriore fonte di promettenti candidati da studiare più a fondo (FATH-GOODIN *et al.*, 2006). Infatti piante transgeniche esprimenti le proteine Cys-motif presentano una riduzione significativa del danno fogliare in presenza delle larve (GILL *et al.*, 2006).

Queste sperimentazioni pionieristiche sono state accompagnate da studi analoghi svolti in parallelo nei nostri laboratori. Abbiamo prodotto piante di tabacco transgeniche esprimenti *TnBVank1*, uno dei membri della famiglia genica codificante per l'anchirina virale del bracovirus associato a *Toxoneuron nigriceps* (*TnBV*) (RAO *et al.*, dati non pubblicati; FALABELLA *et al.*, 2007). Il prodotto genico ha sia un impatto diretto sulla risposta immunitaria dell'ospite, che effetti pleiotropici su numerose funzioni fisiologiche, associate alla evidente alterazione della organizzazione citoscheletrica delle cellule (THOETKIATTIKUL *et al.*, 2005; FALABELLA *et al.*, 2007; DUCHI *et al.*, 2010; GARGIULO *et al.*, dati non pubblicati). L'alimentazione di larve con piante transgeniche esprimenti *TnBVank1* determina un ritardo significativo dello sviluppo e una maggiore mortalità (RAO *et al.*, dati non pubblicati). Un dato interessante è costituito dal fatto che *TnBVank1* altera il trascrittoma della pianta, causando *up-regulation* di alcuni geni coinvolti nella difesa contro agenti patogeni, cosicché la resistenza della pianta ad alcuni funghi patogeni viene effettivamente aumentata (RAO *et al.*, dati non pubblicati). Le basi funzionali che portano a queste risposte multiple di maggiore tolleranza o resistenza devono ancora essere caratterizzate, ma è

chiaro che le molecole codificate dai PDVs possono avere un ruolo inaspettato nel controllo dei patogeni delle piante.

Gli studi sperimentali qui riportati sono solo alcuni esempi dell'uso potenziale delle vespe parassite per un controllo innovativo degli insetti dannosi. È già disponibile una lista in continua crescita di nuove molecole e geni coinvolti nella complessa rete delle interazioni ospite-parassitoide, che richiedono di essere caratterizzate più a fondo per essere poi utilizzate. La comprensione dettagliata dei meccanismi molecolari alla base delle modalità di azione dei fattori di virulenza derivati dai parassitoidi ha permesso anche di identificare recettori bersaglio dell'ospite estremamente sensibili e di scoprire nuove importanti funzioni dei geni dell'immunità dell'ospite (FALABELLA *et al.*, 2012). Queste informazioni di primaria importanza in una prospettiva applicativa, consentono di identificare nuovi potenziali geni bersaglio da silenziare tramite RNA interference (RNAi), una tecnologia molto promettente già ora applicata con successo nel controllo degli insetti (PRICE e GATEHOUSE, 2008).

Gli effetti contenuti ma evidenti che le poche molecole derivate da parassitoidi e PDV finora considerate come potenziali bioinsetticidi esercitano sulle popolazioni di insetti, anche se non determinano elevata mortalità, possono senz'altro diminuire in modo significativo la fitness degli insetti bersaglio. Pertanto, questa categoria di molecole, così come qualsiasi altra sostanza con un analogo impatto sulle popolazioni degli insetti dannosi, sono particolarmente indicate per i piani IPM, che prevedono approcci diversificati e complementari. Infatti, la riduzione delle popolazioni di insetti dannosi piuttosto che la loro eradicazione permette una migliore salvaguardia degli equilibri ecologici e un più efficace impiego dell'attività degli insetti utili.

L'utilizzo dei fattori di virulenza, come tali o tramite silenziamento dei loro bersagli mediato da RNAi, richiede che vengano parallelamente affrontati ulteriori importanti aspetti, quali la modalità ottimale del loro rilascio in campo per agevolarne l'assunzione orale da parte dell'insetto bersaglio, la loro stabilità e sufficiente permanenza nell'ambiente fortemente ostile del lume intestinale e, infine, la conoscenza delle vie attraverso le quali esse possono raggiungere in quantità adeguate i loro recettori epiteliali o emocelici. Riguardo a quest'ultimo aspetto, i risultati più interessanti sul trasporto in cellula e transepiteliale di macromolecole sono stati analiticamente considerati in un recente lavoro (PENNACCHIO *et al.*, 2012) e sono ripresi in questa tavola rotonda in un successivo intervento.

VETTORI PER IL RILASCIO IN CAMPO

Diversi approcci biotecnologici sono attivamente al vaglio al riguardo e sono anche stati in parte sperimentati.

Tecnologie molto promettenti, anche se tuttora prevalentemente in fase di studio e con applicazione limitata, si basano sull'uso di nanosospensioni del principio attivo (CHIN *et al.*, 2011), oppure sul suo inserimento in microcapsule o in nanoparticelle di varia natura (YANG *et al.*, 2009; ELEK *et al.*, 2010; POPAT *et al.*, 2012).

Una tecnologia invece molto avanzata e ben conosciuta prevede l'utilizzo di virus della famiglia Baculoviridae, patogeni che già di per sé hanno un moderato effetto negativo sulla fitness dell'insetto. Baculovirus ricombinanti (rBAC) con geni codificanti per diversi ormoni di insetti, o per enzimi quali proteasi e JH esterasi, oppure per neurotossine di ragno o scorpione attive sugli insetti sono stati usati con risultati molto promettenti in laboratorio, in serra e anche in campo (KAMITA *et al.*, 2005; INCEGLOU *et al.*, 2006). Nonostante il suo elevato potenziale, l'applicazione è tuttora limitata perché la qualità, quantità e purezza dei prodotti è sottoposta a regolamentazioni molto stringenti per ottenere l'autorizzazione all'uso (ROLDÃO *et al.*, 2011).

Recentemente sono stati sperimentati anche batteri epifiti modificati con una tossina di Bt, ottenendo un buon successo nel controllo della processionaria del pino (ALBERGHINI *et al.*, 2006).

Infine, l'estrema efficacia dell'utilizzo di piante transgeniche è ampiamente documentata ed è rappresentata in modo paradigmatico dalle numerosissime piante, universalmente utilizzate, esprimenti diversi tipi di tossine di Bt.

INGESTIONE E DEGRADAZIONE ENZIMATICA

Una volta ingerite dall'insetto, le molecole permangono più o meno a lungo nell'ambiente sfavorevole costituito dal fluido presente nel lume intestinale, prima di arrivare ai siti di interazione o assorbimento. Il fluido intestinale presenta, a seconda della specie di insetto, un pH acido o basico, che spesso raggiunge valori estremi, ed un potenziale di ossido-riduzione molto variabile che determina in diversa misura condizioni ossidanti o riducenti; ma, soprattutto, in esso vengono riversate le diverse categorie di enzimi idrolitici necessari per la digestione, prodotti dalle ghiandole salivari e dall'epitelio intestinale.

Considerando che le nuove biomolecole proposte per il controllo sono peptidi e proteine, oppure

frammenti di acidi nucleici, è essenziale che venga evitata la loro degradazione enzimatica. Un approccio studiato da tempo e applicato con successo nella ricerca biomedica indirizzata alla somministrazione di farmaci (RYAN *et al.*, 2008; BAILON e WON, 2009; KANG *et al.*, 2009) consiste nel legare covalentemente il principio attivo che si vuole far assumere e un polimero formato da monomeri di polietilenglicole (PEG): il processo è chiamato "pegylazione" e permette di schermare i siti di legame enzimatici, riducendo sensibilmente "l'aggressione" alla molecola bioattiva. La possibilità di modulare le proprietà del polimero di PEG in modo da ottenere una catena lineare singola o doppia, oppure variamente ramificata, può conferire ulteriori vantaggi, mantenendo più a lungo integro il sito attivo della molecola di interesse sia nel lume intestinale che successivamente nei liquidi interni dell'organismo.

Questa tecnologia è stata recentemente applicata al decapeptide Trypsin Modulating Oostatic Factor (TMOF), ormone che può essere utilizzato con successo come insetticida. Il TMOF, rilasciato nell'emolinfa dall'ovario delle femmine di *Aedes aegypti* al termine della digestione del pasto di sangue, si lega a specifici recettori presenti nella membrana basale delle cellule epiteliali dell'intestino medio, inibendo il rilascio di tripsina nel lume intestinale. Il TMOF di *A. aegypti* somministrato oralmente alle larve della zanzara, ne determina la morte, ed è tossico anche per le larve dei lepidotteri *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea*. La "pegylazione" del peptide ne aumenta sensibilmente la resistenza alla degradazione enzimatica da parte delle aminopeptidasi intestinali (SHEN *et al.*, 2009) senza impedirne il passaggio attraverso l'epitelio, in modo da raggiungere il suo recettore sulla membrana basolaterale. Somministrato oralmente, il decapeptide "pegylato" aumenta l'efficacia larvicida *in vivo* in *A. aegypti* (JEFFERS *et al.*, 2012).

TRASFERIMENTO DELLE BIOMOLECOLE
AI RECETTORI EPITELIALI O EMOCELICI:
SUPERAMENTO DELLA MEMBRANA PERITROFICA (MP)
E AUMENTO DEL TEMPO DI CONTATTO
CON L'ORLETTO A SPAZZOLA.

La barriera intestinale è formata dalla MP e dall'epitelio intestinale, la cui membrana apicale, rivolta verso il lume, è organizzata a formare un fitto orletto a spazzola. Tra la MP e l'orletto a spazzola è interposto lo spazio ectoperitrofico, occupato dal fluido luminale in cui sono presenti le molecole che hanno attraversato la MP. Nella maggior parte degli insetti, questo fluido scorre

continuamente, muovendosi in direzione opposta rispetto al liquido presente nello spazio endoperitrofico all'interno della MP: questo movimento in controcorrente è responsabile della corretta e completa digestione degli alimenti (TERRA e FERREIRA, 2005). Lo scorrimento continuo del fluido intestinale tenderà, però, a rimuovere e allontanare il bioinsetticida dai siti di interazione con la membrana plasmatica apicale, sfavorendone il legame con i recettori e/o il passaggio transepiteliale.

Un approccio efficace per superare la barriera costituita dalla MP è dato dalla possibilità di aumentarne la permeabilità fisiologica alterando la maglia di fibrille di chitina, con “pori” di definita dimensione, tramite gli enzimi idrolitici chitinasi (RAO *et al.*, 2004), oppure destrutturando, tramite proteasi specifiche come l'enansina, l'impalcatura proteica legata alla chitina (PENG *et al.*, 1999). La maggiore pervietà della MP provocherà di per sé un'alterazione della ricircolazione degli enzimi e un aumento del passaggio verso la cellula di patogeni, ma determinerà anche una maggiore concentrazione del bioinsetticida nello spazio ectoperitrofico, favorendone l'interazione con i recettori presenti sull'orletto a spazzola, come nel caso di tossine Bt (REGEV *et al.*, 1996), o il passaggio transepiteliale attraverso le vie cellulare e/o paracellulare (PENNACCHIO *et al.*, 2012), facilitando l'accesso ai recettori emocelici (FIANDRA *et al.*, 2010).

Le membrane biologiche sono in genere scarsamente permeabili a macromolecole idrofile ed elettricamente cariche come i peptidi, le proteine e gli acidi nucleici. Si può agevolare l'assorbimento coniugando la molecola di interesse con sostanze che garantiscano il più a lungo possibile l'adesione alla superficie assorbente, promuovendo il diretto contatto con i microvilli intestinali, in modo da impedire che la molecola venga rapidamente allontanata dal fisiologico movimento del fluido ectoperitrofico. Anche a questo proposito gli studi in campo farmacologico sono di aiuto, poiché sono state individuate varie categorie di molecole bioadesive, per lo più contraddistinte dal fatto di essere polimeri le cui caratteristiche di adesione alle strutture biologiche sono determinate dalla lunghezza della catena, dalla capacità di formare legami crociati e dal loro numero, e dalla disposizione dei diversi gruppi funzionali (ANDREWS *et al.*, 2009).

Una importante categoria di molecole bioadesive è costituita dal chitosano e dai suoi derivati, particolarmente indicati per favorire l'adesione e il passaggio di DNA, siRNA e oligonucleotidi (MAO *et al.*, 2010) ma anche di proteine e peptidi (AMIDI *et al.*, 2010). Il chitosano è un polisaccari-

de lineare biodegradabile atossico, derivato per deacetilazione dalla chitina, che può variare in peso molecolare (da 3800 a 20000 Da), grado di deacetilazione e viscosità. Ogni subunità deacetilata porta un gruppo aminico primario protonato in soluzione acida, che interagisce con le cariche negative superficiali dei microvilli. Il legame con proteine, DNA, RNA è di tipo elettrostatico in ambiente acido, mentre a pH neutro o basico il legame è dovuto a ponti di idrogeno o a interazioni idrofobiche (MAO *et al.*, 2010). I gruppi funzionali aminici e carbonilici si prestano a manipolazioni chimiche di varia natura, che possono fornire derivati su misura, tali da aumentare la solubilità della molecola, l'adesione alla membrana e la permeazione attraverso l'epitelio (MAO *et al.*, 2010; AMIDI *et al.*, 2010).

Il chitosano e alcuni suoi derivati sono tossici per taluni lepidotteri e afidi (CASALS *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; RABEA *et al.*, 2005, 2006), ed è recente la proposta di un loro impiego per la sintesi di un co-polimero da usare come potenziale vettore di insetticidi (LI *et al.*, 2011). Poiché il chitosano non possiede proprietà anfifiliche e non forma nanomicelle, suoi frammenti di diversa lunghezza sono stati fatti reagire con D, L-lactide, un poliestere di origine naturale impiegato in diverse applicazioni biomediche. I prodotti di sintesi ottenuti sono anfifilici e formano nanomicelle di varie dimensioni: queste presentano sia gruppi idrofilici superficiali in grado di interagire con i substrati biologici, che gruppi idrofobici che possono legare pesticidi scarsamente idrosolubili. Gli autori (LI *et al.*, 2011) hanno valutato l'efficienza del co-polimero come potenziale sistema per veicolare e rilasciare al tessuto pesticidi, sperimentandone *in vitro* l'interazione con l'insetticida imidacloprid in funzione della dimensione, del numero e delle caratteristiche di superficie delle nanoparticelle.

Particolarmente interessanti nel caso degli insetti, nel cui intestino non viene secreto muco, sono le molecole che si legano al glicocalice, una struttura formata dalle glicoproteine, i glicolipidi e i proteoglicani della membrana plasmatica, particolarmente sviluppata nei microvilli degli epiteli intestinali. Delle numerose molecole che sono state sperimentate nella ricerca biomedica, le lectine sono una categoria di proteine nota da più di 100 anni per la capacità di agglutinare le cellule grazie alla formazione di legami con i residui glicidici (BIES *et al.*, 2004). Il loro possibile utilizzo come vettore di farmaci fu però proposto per la prima volta solo nel 1988 da WOODLEY e NAISBETT. La consapevolezza che i numerosi glicani presenti nelle membrane biologiche sono espressi con alta specificità nei diversi tipi cellulari, dato

che la combinazione di un numero relativamente piccolo di zuccheri può generare un vasto numero di strutture chimiche diverse, e il fatto che lectine diverse si legano a residui glicidici diversi, spiega perché queste proteine possono essere dei vettori di adesione altamente specifici (BIES *et al.*, 2004). La loro potenzialità come vettori di bioinsetticidi somministrati oralmente è stata già dimostrata anche in insetto: infatti la mannosio-lectina di *Galanthus nivalis* (GNAglutinin), somministrata come proteina di fusione in associazione con il neuropeptide allatostatina (FITCHES *et al.*, 2002), oppure con una tossina di veleno insetticida di ragno (FITCHES *et al.*, 2004; DOWN *et al.*, 2006), ha dato luogo a una tossicità superiore a quella ottenuta con la somministrazione delle singole molecole, sia in larve di lepidottero che nell'afide *Myzus persicae*, che nell'omottero *Nilaparvata lugens*.

Ulteriori approfondimenti e numerosissimi studi recenti hanno chiarito che sia le lectine che i chitosani, oltre ad agire come bioadesivi, favoriscono anche, con modalità diverse, il passaggio attraverso l'intero epitelio intestinale, veicolando le molecole ad essi associate dal lume ai fluidi interni (BIES *et al.*, 2004; DELI, 2009). Le lectine, come dimostrato anche dalla citata sperimentazione con proteine di fusione condotta su insetti dannosi, sono in grado di attraversare la cellula epiteliale intestinale per transitosi (BIES *et al.*, 2004), mentre i chitosani agiscono sulla permeabilità paracellulare, favorendo l'apertura delle giunzioni serrate in mammifero (DELI, 2009; AMIDI *et al.*, 2010) e delle giunzioni settate dell'intestino medio delle larve di lepidotteri (FIANDRA *et al.*, dati non pubblicati).

Accurati studi specifici sulla fisiologia dell'intestino di insetto e la caratterizzazione della sua interazione con queste due categorie di molecole potranno permettere un loro uso più mirato e specifico e suggerire nuovi approcci per aumentare l'effetto della somministrazione orale dei bioinsetticidi.

CONCLUSIONI

I parassitoidi e i PDV a essi associati sono una sorgente naturale di bioinsetticidi di incalcolabile valore. I molteplici fattori di virulenza e di regolazione che essi utilizzano, per sopprimere l'immunità dell'ospite e regolarne la fisiologia e la riproduzione, rappresentano una delle più ampie riserve di biodiversità molecolare che può essere sfruttata per un controllo ecocompatibile degli insetti dannosi. La completa conoscenza del meccani-

simo di azione di queste molecole è indispensabile per l'esatta valutazione sia dei potenziali benefici che dei problemi relativi al loro rilascio nell'ambiente, che deve essere mirato ed efficace. L'uso dei nemici naturali e loro simbiotici come fonte di nuove molecole bioinsetticide e di innovative tecnologie di controllo è certamente un obiettivo a lungo termine, che potrà espandere e rafforzare i benefici contributi forniti dagli agenti di controllo biologici.

RINGRAZIAMENTI

Le ricerche menzionate in questo articolo sono state sostenute dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR-PRIN, 2008FBJP8).

RIASSUNTO

La stupefacente biodiversità che caratterizza gli imenotteri parassiti e l'estrema varietà delle strategie da essi sviluppate nella colonizzazione e sfruttamento degli insetti ospiti offrono una grande abbondanza di strumenti molecolari che possono essere efficacemente utilizzati per il controllo degli insetti dannosi. I fattori di virulenza codificati dalle vespe parassite e dai loro simbiotici sono in grado di sopprimere la risposta immunitaria dell'ospite e di manipolare i suoi processi fisiologici e riproduttivi. Queste molecole agiscono in modo specifico sulle specie dannose bloccandone la risposta immunitaria, rafforzando in questo modo il potenziale ecologico offerto dagli antagonisti naturali. L'uso di questi bioinsetticidi naturali sarà tanto più efficace quanto maggiormente sviluppate e adeguate saranno le tecniche per il loro mirato rilascio in campo e per impedire la degradazione e rapida rimozione nel lume intestinale, in modo da garantire la massima interazione con i recettori epiteliali e/o emocelici e potenziandone l'assorbimento. La rapida crescita delle tecnologie molecolari apre nuove vie per la ricerca e rende possibile lo sviluppo di nuove tecniche di controllo basate sull'utilizzo di molecole derivate dai parassitoidi e/o su strategie che mimano il loro effetto nell'insetto ospite.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERGHINI S., FILIPPINI R., SHEVELEV A.B., SQUARTINI A., BATTISTI A., 2006 – *Extended plant protection by an epiphytic Pseudomonas sp. derivative carrying the cry9Aa gene from Bacillus thuringiensis galleriae against the pine processionary moth Thaumetopoea pityocampa*. - Biocontrol Sci. Technol., 16: 709-715.
- AMIDI M., MASTROBATTISTA E., JISKOOT W., HENNINK W.E., 2010 – *Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens*. - Adv. Drug Deliv. Rev., 62: 59-82.
- ANDREWS G.P., LAVERTY T.P., JONES D.S., 2008 – *Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery*. - Eur. J. Pharm. Biopharm., 71: 505-518.
- BAILON P., WON C.-Y., 2009 - *PEG-modified biopharmaceuticals*. - Expert Opin. Drug Deliv., 6: 1-16.

- BALE, J.S., VAN LENTEREN, J.C., BIGLER, F., 2008 – *Biological control and sustainable food production*. - Phil. Trans. Royal Soc. London B – Biol. Sciences, 363: 761-776.
- BIES C., LEHR C.-M., WOODLEY J.F., 2004 – *Lectin-mediated drug targeting: history and applications*. - Adv. Drug Deliv. Rev., 56: 425-435.
- BRAVO A., GILL S.S., SOBERÓN M., 2007 – *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. - Toxicon, 49: 423-435.
- CASALS P., CARDENAS G., GALVEZ G., VILLAR A., CABRERA G., 2002. – *Agricultural applications of chitosan and derivatives*. Proc 10th IUPAC Int. Congress Chem. Crop Prot., 1: 228.
- CASIDA J.E., QUISTAD G.B., 1998 – *Golden age of insecticide research: past, present, or future?* - Annu. Rev. Entomol., 43: 1-16.
- CHIN C.P., WU H.S., WANG S.S., 2011 – *New approach to pesticide delivery using nanosuspensions: research and applications*. - Ind. Eng. Chem. Res., 50: 7637-7643.
- DAYAN F.E., CANTRELL C.L., DUKE S.O., 2009 – *Natural products in crop protection*. - Bioorg. Med. Chem., 17: 4022-4034.
- DEBACH, P., 1964 – *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman and Hall, London, UK.
- DELI M.A., 2009 – *Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery*. - Biochim. Biophys. Acta, 1788: 892-910.
- DENT D.R. (ed.), 1995 – *Integrated Pest Management*. pp. 365, Chapman & Hall, London, UK.
- DOWN R.E., FITCHES E., WILES D.P., CORTI P., BELL H.A., GATEHOUSE J.A., EDWARDS J.P., 2006 – *Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, Nilaparvata lugens (HEMIPTERA:DELPHACIDAE)*. - Pest Manage. Sci., 62: 77-85.
- DUCHI S., CAVALIERE V., FAGNOCCHI L., GRIMALDI M.R., FALABELLA P., GRAZIANI F., GIGLIOTTI S., PENNACCHIO F., GARGIULO G., 2010 – *The impact on microtubule network of a bracovirus I B-like Protein*. - Cell. Mol. Life Sci., 67: 1699-1712.
- ELEK N., HOFFMAN R., RAVIV U., RESH R., ISHAAYA I., MAGDASSI S., 2010 – *Novaluron nanoparticles: Formation and potential use in controlling agricultural insect pests*. - Colloids Surface A Physicochem. Engin. Aspects, 372: 66-72.
- FALABELLA P., RIVIELLO L., PASCALE M., DI LELIO I., TETAMANTI G., GRIMALDI A., IANNONE C., MONTI M., PUCCI P., TAMBURRO A.M., DE EGUILEOR M., GIGLIOTTI S., PENNACCHIO F., 2012 – *Functional amyloids in insect immune response*. - Insect Biochem. Mol. Biol. 42:, 203-211.
- FALABELLA P., VARRICCHIO P., PROVOST B., ESPAGNE E., FERRARESE R., GRIMALDI A., DE EGUILEOR M., FIMIANI G., URSINI M.V., MALVA C., DREZEN J.-M., PENNACCHIO F., 2007 – *Characterization of the Ikb-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies*. - J. Gen. Virol., 88: 92-104.
- FATH-GOODIN A., GILL T.A., MARTIN S.B., WEBB B.A., 2006 – *Effect of Campoletis sonorensis cys-motif proteins on Heliothis virescens larval development*. - J. Insect Physiol., 52: 576-585.
- FIANDRA L., TERRACCiano I., FANTI P., GARONNA A., FERRACANE L., FOGLIANO V., CASARTELLI M., GIORDANA B., RAO R., PENNACCHIO F., 2010 – *A viral chitinase enhances oral activity of TMOF*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 40: 533-540.
- FITCHES E., AUDSLEY N., GATEHOUSE J.A., EDWARDS J.P., 2002 – *Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 32: 1653-1661.
- FITCHES E., EDWARDS M.G., MEE C., GRISHIN E., GATEHOUSE A M R., EDWARDS J.P., GATEHOUSE J.A., 2004 – *Fusion protein containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion*. - J. Insect Physiol., 50: 61-71.
- GILL T.A., FATH-GOODIN A., MAITI I.B., WEBB B.A., 2006 – *Potential uses of cys-motif and other polydnavirus genes in biotechnology*. - Adv. Virus Res., 68: 393-426.
- INCEOGLU A.B., KAMITA S.G., HAMMOCK, B.D., 2006 – *Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook*. - Adv. Virus Res., 68: 323-360.
- JARLFORSS U.E., DAHLMAN D.L., ZHANG D., 1997 – *Effects of Microplitis croceipes teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation*. - J. Insect Physiol., 43: 577-585.
- JEFFERS L.A., SHEN H., KHALIL S., BISSINGER B.W., BRANDT A., GUNNOE T.B., ROE R.M., 2012 – *Enhanced activity of an insecticidal protein, trypsin modulating oostatic factor (TMOF), through conjugation with aliphatic polyethylene glycol*. - Pest Manag. Sci., 68: 49-59.
- KAMITA S.G., KANG K.-D., HAMMOCK B.D., INCEOGLU A.B., 2005 – *Genetically Modified Baculoviruses for Pest Insect Control*. - In Comprehensive Molecular Insect Science (Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S., Eds) Vol 6, pp. 271-322. Elsevier, San Diego.
- KANG J.S., DELUCA P.P., LEE K.C., 2009 – *Emerging PEGylated drugs*. - Expert Opin. Emerging Drugs, 14: 363-380.
- KIRST A.H., 2010 – *The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research*. - J. Antibiot. 63: 101-111.
- LI M., HUANG Q., WUB Y., 2011 – *A novel chitosan-poly(lactide) copolymer and its submicron particles as imidacloprid carriers*. - Pest Manag. Sci., 67: 831-836
- MAITI I.B., DEY N., DAHLMAN D.L., WEBB B.A., 2003 – *Antibiosis-type resistance in transgenic plants expressing teratocyte secretory peptide (TSP) gene from hymenopteran endoparasite (Microplitis croceipes)*. - Plant Biotech. 1: 209-219.
- MAO S., SUN W., KISSEL T., 2010 – *Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA*. - Adv. Drug Deliv. Rev., 62 : 12-27.
- NICHOLSON G.M., 2007 – *Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control*. - Toxicon 49: 413-422.
- OERKE E.-C., DEHNE H.-W., 2004 – *Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection*. - Crop Prot., 23: 275-285.
- PENG J., ZHONG J., GRANADOS R., 1999 – *A baculovirus enhancer alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae*. - J Insect Physiol., 45: 159-166.
- PENNACCHIO F., GIORDANA B., RAO R., 2012 – *Applications of parasitoid virus and venom research in agriculture*. In: Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens, eds. N. Beckage and J.-M. Drezen, Elsevier: 269-283.
- PENNACCHIO F., MANCINI D., 2012 – *Aphid parasitoid venom and its role in host regulation*. In: Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens, eds. N. Beckage and J.-M. Drezen, Elsevier: 247-254.

- PENNACCHIO F., STRAND M.R., 2006 - *Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera*. - Annu. Rev. Entomol., 51: 233-258.
- POPAT A., LIU J., HU Q., KENNEDY M., PETERS B., LU G.Q., QIAO S.Z., 2012 - *Adsorption and release of biocides with mesoporous silica nanoparticles*. - Nanoscale 4: 970-975.
- PRICE D.R.G., GATEHOUSE J.A., 2008 - *RNAi-mediated crop protection against insects*. - Trends Biotech. 26: 393-400.
- QUICKE D.L.J., 1997 - *Parasitic Wasps*. - Chapman & Hall, London, UK.
- RABEA E.I., EL BADAWY M., ROGGE T.M., STEVENS C.V., STEURBAUT W., HOFTE M., SMAGGHE G., 2006. - *Enhancement of fungicidal and insecticidal activity by reductive alkylation of chitosan*. - Pest Manag. Sci., 62: 890-897.
- RABEA E.I., EL BADAWY M., ROGGE T.M., STEVENS C.V., HOFTE M., STEURBAUT W., SMAGGHE G., 2005 - *Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives*. - Pest. Manag. Sci., 61: 951-960.
- RAO R., FIANDRA L., GIORDANA B., DE EGUILEOR M., CONGIU T., BURLINI N., ARCIELLO S., CORRADO G., PENNACCHIO F., 2004 - *AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of Bombyx mori larvae*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 34: 1205-1213.
- REGEV A., KELLER M., STRIZHOV N., SNEH B., PRUDOVSKY E., CHET I., GINZBERG I., KONCZ-KALMAN Z., KONCZ C., SCHELL J., ZILBERSTEIN A., 1996 - *Synergistic activity of a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against Spodoptera littoralis larvae*. - Appl. Environ. Microbiol., 62: 3581-3586.
- ROH J.Y., CHOI J.Y., LI M.S., JIN B.R., JE Y.H., 2007 - *Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control*. - J. Microbiol. Biotechnol., 17: 547-559.
- ROLDÃO A., VICENTE T., PEIXOTO C., CARRONDO M.J.T., ALVES P.M., 2011 - *Quality control and analytical methods for baculovirus-based products*. - J. Invert. Pathol., 107: S94-S105.
- RYAN S.M., MANTOVANI G., WANG X., HADDLETON D.M., BRAYDEN D.J., 2008 - *Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects*. - Expert Opin. Drug Deliv., 5: 371-383.
- SHEN H., BRANDT A., WITTING-BISSINGER B.E., GUNNOE T.B., ROE R.M., 2009 - *Novel insecticide polymer chemistry to reduce the enzymatic digestion of a protein pesticide, trypsin modulating oostatic factor (TMOF)*. - Pest. Biochem. Physiol., 93: 144-152.
- TERRA W.R., FERREIRA C., 2005 - *Biochemistry of digestion*. In "Comprehensive Molecular Insect Science", (Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S. Eds.), Vol. 4, pp. 171-224. Elsevier Pergamon Press.
- THOETKIATTIKUL H., BECK M. H., STRAND M.R., 2005 - *Inhibitor κ B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF- κ B activation and suppress the insect immune response*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102: 11426-11431.
- TREMBLAY E., 2003 - *Entomologia Applicata*. - Vol. I. Liguori Editore, Napoli, Italy.
- VINSON S.B., PENNACCHIO F., CONSOLI F., 2001 - *The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective*. In: Manipulating Hormonal Control (Endocrine Interactions), ed. J. Edwards, pp. 263-283. BIOS Scientific Publisher, Oxford, UK.
- WHITFIELD J.B., 1998 - *Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera*. - Annu. Rev. Entomol., 43: 129-151.
- WHITFIELD J.B., 2003 - *Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera*. - Adv. Parasitol., 54: 69-100.
- WOODLEY J.F., NAISBETT B., 1988 - *The potential of lectins for delaying the intestinal transit of drugs*. - Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 15: 125-126.
- YANG F.-L., LI X.-Z., ZHU F., LEI C.-L., 2009 - *Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. J. Agr. Food Chem., 57: 10156-10162.
- ZHANG M.I., TAN T., YUAN H., RUI C., 2003 - *Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligo-chitosan*. - J. Bioactive Compatible Polym., 18: 391-400.

LE BIOTECNOLOGIE PER LA DIFESA DELLE PIANTE IN ACCORDO CON LA NUOVA DIRETTIVA UE 2009/128 SULL'USO SOSTENIBILE DEI PESTICIDI

MATTEO LORITO (*) - FELICE SCALA (**)

(*) Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II; - e-mail: lorito@unina.it

(**) Istituto CNR per la Protezione delle Piante, Via Università, 100, 80055 Portici, Italy.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbionti e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

Biotechnologies for crop protection according to the new UE directive 2009/128 on the sustainable use of pesticides

This paper summarizes the most applied or promising biotechnologies based on the use of microbial antagonists, or their extracts, for sustainable control of diseases caused by phytopathogens in Europe, also in the light of the new EU Directive 2009/128. List of fungal and bacterial antagonists, for which a large set of efficacy data has been collected in last decade, includes species of *Bacillus*, *Trichoderma*, *Coniothyrium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, etc. There is also evidence that their usefulness could be significantly improved by exploiting the potential of bioactive metabolites and synergistic mixtures of different microbes. The delayed expansion of the use of biopesticides products in Europe, as compared to other areas, is discussed. The implementation of the new EU directive 2009/128, with the expected strong reduction of the number of pesticides available for use, provides a great opportunity for bio-products to finally make a strong positive impact on the sustainability of the European farming system.

KEY WORDS: biopesticides, biofertilizers, biotechnology, directive EU2009/128, sustainable crop protection

LE BIOTECNOLOGIE MICROBICHE PIÙ AVANZATE DAL PUNTO VISTA APPLICATIVO

L'uso di microrganismi antagonisti per controllare fitopatogeni, nematodi ed erbe infestanti è cominciato oltre 50 anni fa, ed oggi sono disponibili diversi formulati a base di funghi o batteri antagonisti utilizzabili come biofitofarmaci (ALTOMARE e TRINGOVSKA, 2011; HARMAN G.E., 2011; LORITO *et al.*, 2010). Questi prodotti possono consistere di un singolo organismo o di una miscela di organismi che esplicano la loro attività attraverso complessi meccanismi d'azione.

Per raggiungere uno sviluppo commerciale, un ceppo antagonista deve soddisfare criteri di sicurezza riguardanti l'assenza di tossicità e l'incapacità di produrre effetti collaterali indesiderati. Inoltre esso si deve adattare all'ambiente e persistere in campo almeno durante una stagione produttiva. Il ceppo viene selezionato anche in base alla sua competenza per la rizosfera, al suo spettro d'azione contro i patogeni ed alla sua applicabilità ad un largo numero di colture (TUCCI *et al.*, 2011). Inoltre, il ceppo dovrebbe essere efficace in diverse aree geografiche, avere una certa stabilità genetica e biologica anche durante la conservazione, ed essere prodotto in modo

facile ed economico per rendere i costi competitivi rispetto a quelli dei pesticidi di sintesi.

Individuato il ceppo con le migliori caratteristiche, i passi successivi consistono nel produrre una biomassa sufficientemente stabile, anche in condizioni avverse, e sviluppare sistemi di applicazione che assicurino la crescita e l'attività antagonistica nei confronti dei fitopatogeni. Tutto questo richiede un approccio che prenda in considerazione l'uso degli antagonisti caso per caso, poiché non esistono soluzioni generali. Ogni fase del processo che porta alla produzione e all'applicazione di un formulato può essere cruciale: per esempio, lo scaling-up dalla produzione in laboratorio a quella industriale può dar luogo a seri problemi a causa di imprevedibili effetti di tipo biologico. In alcuni casi, infatti, i tempi più lunghi impiegati nella produzione su larga scala, possono portare ad un'alterazione dell'attività metabolica dell'antagonista, con una conseguente riduzione della sua performance nel biocontrollo. In altre situazioni, essendo gli ingredienti dei formulati organismi vivi, si possono verificare cambiamenti genetici e/o interazioni con microrganismi contaminanti che danno come risultato la produzione di un prodotto di qualità non soddisfacente.

I funghi antagonisti possono essere usati in diversi modi. In generale, la biomassa del fungo antagonista (cellule, micelio, spore) ottenuta attraverso l'uso di fermentatori, viene trattata ed incorporata in differenti matrici per la preparazione di formulati granulari, in polvere, liquidi, ecc. Diversi studi hanno messo in evidenza che l'efficacia del prodotto può dipendere dal tipo di formulazione e dalle modalità di somministrazione. Per controllare patogeni tellurici, ad esempio, si è visto che *Trichoderma* è più efficace quando è applicato in forma di spore germinanti contenute in sabbia, oppure incluso in sferette di alginato. *T. virens*, invece, in esperimenti di protezione contro il marciume basale causato da *Pythium*, è stato applicato a semi di cotone con l'aiuto di un adesivante di latex. Per controllare questa malattia i semi possono essere trattati con *T. harzianum* formulato sia in forma liquida come miscela contenente un adesivante acquoso e particolati solidi da spruzzare, sia come miscela contenente polisaccaridi e alcoli da usare come ricoprente.

Sono oggi disponibili sul mercato mondiale qualche centinaio di prodotti a base di batteri, funghi o lieviti antagonisti legalmente registrati ed utilizzabili anche in agricoltura biologica. Una larga parte (circa metà) di questi prodotti sono a base di *Trichoderma* o *Bacillus* (HERMOSA *et al.*, 2012; SHORESH *et al.*, 2010). Essi sono utili per la lotta biologica contro agenti di marciumi dell'apparato radicale, del colletto e della base del fusto di piante ortive, agenti di morie nei semenzai, di tracheofusariosi, di mal del piede dei cereali, di infezioni radicali di specie arboree da frutto, di muffa dell'uva e di colture ortive, e di moniliosi e marciumi acquosi di pomacee e drupacee.

Per la registrazione dei vari prodotti, bisogna acquisire informazioni sui loro meccanismi d'azione, effettuare prove di efficacia relative alle aree geografiche dei paesi in cui si intende registrare il prodotto e mettere a punto metodiche capaci di monitorare la produzione di eventuali metaboliti tossici, permettendo un'efficace valutazione degli eventuali rischi derivanti da un uso su larga scala. Oltre ai prodotti registrati, si vendono e si utilizzano ampiamente una varietà di bioprotettori, biostimolanti e biofertilizzanti non registrati a base di *Trichoderma* o altri antagonisti. La diffusione di questi prodotti è molto ampia, grazie anche alla necessità di ridurre l'applicazione di prodotti fitosanitari di sintesi o di ottenere la certificazione di prodotto proveniente da agricoltura biologica (HARMAN *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda la lotta biologica contro funghi e batteri fitopatogeni con prodotti a base di antagonisti batterici, la caso più eclatante è quello

del ceppo K84 di *A. radiobacter*, che però non risulta ancora registrato in Europa. Ceppi di *Pseudomonas syringae* possono essere impiegati contro *Penicillium expansum* su pere e mele, contro *Botrytis cinerea* su pere e uva, contro *Monilina fruticola* e *Rhizopus stolonifer* su pesche, contro *P. digitatum* su limoni, e come induttori di resistenza contro *Plasmopara viticola* e *Uncinula necator* su uva. *P. fluorescens* è efficace nel controllo di malattie causate soprattutto da funghi terricoli, mentre varie specie di *Bacillus* sono attive soprattutto sulla superficie fogliare e hanno l'utile caratteristica di formare spore sufficientemente resistenti da essere facilmente utilizzabili in formulati commerciali.

Oltre ai microrganismi antagonisti, si possono utilizzare anche molecole da essi derivati. Queste molecole possono agire contro i patogeni sia inibendone direttamente la crescita ed eventualmente causandone la morte, sia indirettamente, inducendo una risposta di difesa nella pianta. Ad esempio, gli enzimi degradativi prodotti dai funghi antagonisti hanno un ruolo chiave nel processo del biocontrollo, e possono rappresentare, specialmente se usati in combinazioni sinergiche, una opportunità per lo sviluppo di nuovi prodotti e strategie di difesa contro i funghi fitopatogeni (LORITO *et al.*, 1994, 1996). Essi hanno una spiccata capacità di sinergizzare l'effetto di fungicidi di sintesi appartenenti a diverse classi e, in particolare, l'effetto di composti azolici che alterano le membrane cellulari (LORITO *et al.*, 1994, 1996). Per questi motivi, le miscele enzimatiche possono essere utilizzate sia tal quali come fungicidi "biologici", sia come coadiuvanti di principi chimici di sintesi, permettendo di ridurre significativamente le concentrazioni di anticrittogamici chimici. Inoltre, l'azione degli enzimi degradativi della parete cellulare dei patogeni fungini e delle piante determina il rilascio di oligosaccaridi che possono innescare reazioni di difesa nella pianta (HANSON e HOWELL, 2004; LORITO *et al.*, 1994, 1996).

Isolati del genere *Trichoderma* possono produrre diverse molecole in grado di indurre resistenza nelle piante. Una di queste molecole è una xilanasi che induce una reazione di resistenza localizzata. Alcuni peptidi e proteine prodotti da *T. virens* inducono la biosintesi di fitolessine terpenoidi e attività perossidasi in piante di cotone (HANSON e HOWELL, 2004). Recentemente, è stato suggerito che ceppi di *T. harzianum* possiedono geni con funzione simile a quelli di avirulenza *Avr4* e *Avr9* trovati nel fungo patogeno del pomodoro *Cladosporium fulvum*, i cui prodotti inducono resistenza nelle piante che hanno i corrispondenti fattori di resistenza.

L'uso commerciale di metaboliti prodotti da microrganismi antagonisti, invece, è stato fino ad ora sostanzialmente limitato dai possibili effetti tossici che questi composti potrebbero avere sull'ambiente e sulla salute dell'uomo. Tuttavia, sono numerosi i prodotti bioattivi sintetizzati sia da funghi sia da batteri antagonisti, e che si stanno valutando come potenziali nuovi biopesticidi (VINALE *et al.*, 2012).

L'IMPATTO ATTESO DELLA NUOVA DIRETTIVA UE SULL'IMPLEMENTAZIONE DELLA LOTTA INTEGRATA

L'uso commerciale degli agenti di lotta biologica come ingredienti attivi di formulazioni biopesticide o biofertilizzanti, sottoforma di agenti vivi, estratti o molecole bioattive, si è generalmente diffuso in Europa meno che in altre aree geografiche. Per esempio, applicazioni su scala molto più ampia si registrano in America centrale e meridionale, India, Cina ecc., dove centinaia di prodotti sono ufficialmente autorizzati per l'uso agricolo e disponibili sul mercato. Il ritardato sviluppo di queste tecnologie nel contesto Europeo si è verificato nonostante i numerosi casi positivi e ben documentati di prodotti a base di ceppi selezionati di *Bacillus*, *Trichoderma*, *Coniothyrium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, etc. utilizzati con successo per almeno un decennio in una varietà di condizioni applicative.

Comunque, la nuova direttiva Europea sull'implementazione della gestione integrata della lotta alle avversità biotiche e abiotiche cambierà radicalmente questa situazione, realizzando condizioni tali da permettere ai prodotti migliori la conquista di porzioni di mercato molto significative. Tra l'altro, il passaggio dalla lotta "convenzionale" a quella "integrata e biologica", che dovrà essere completato entro i prossimi 24 mesi, corrisponderà ad una perdita stimata di circa la metà dei principi attivi utilizzati oggi nei più comuni agro-farmaci.

Ovviamente, questa sorta di nuova rivoluzione "verde" solleva importanti interrogativi. Ci si chiede ad esempio se siamo o no pronti dal punto di vista tecnico-scientifico a cogliere questa opportunità di rinnovamento della pratica agricola europea? Questi prodotti sono veramente pronti ad abbandonare la loro nicchia per giocare un ruolo molto più importante nel sistema di produzione primario della UE? Quanto sono vicini, o quanto sono lontani, dagli alti livelli efficacia, spesso ottenuti contro una varietà di patogeni, tipici degli agrofarmaci convenzionali? Le risposte a queste domande sono complesse, ancora oggetto

di dibattito e saranno definite solo nei prossimi anni. Certamente il livello di conoscenza scientifica di base, di sviluppo tecnico e di esperienza applicativa per numerosi agrobiofarmaci non è mai stato così elevato, anche grazie a importanti avanzamenti realizzati più o meno nell'ultimo quinquennio. Inoltre, è interessante notare come si sia attivato un notevole interesse della grandi Aziende multinazionali tradizionalmente produttrici di pesticidi sintetici nell'incorporare e creare partenariati con piccole e medie imprese il cui "core business" è nel settore della lotta biologica in agricoltura.

RIASSUNTO

Questo lavoro riassume le biotecnologie più applicate e promettenti basate sull'uso di antagonisti microbici, o dei loro estratti, per la lotta sostenibile alle malattie causate da agenti fitopatogeni in Europa, anche alla luce della nuova direttiva UE 2009/128. L'elenco di antagonisti batterici e fungini, per i quali è conosciuta un'ampia casistica di applicazioni con risultati positivi nell'ultimo decennio include specie di *Bacillus*, *Trichoderma*, *Coniothyrium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, ecc. Ci sono anche numerose evidenze che l'utilità di questi microbi può essere notevolmente aumentata con l'uso dei loro metaboliti o di miscele sinergiche tra diversi principi attivi. Si discute anche la ritardata espansione dell'applicazione di questi agenti in Europa rispetto ad altre aree geografiche. Gli effetti della nuova direttiva UE, che tra l'altro causerà una drastica riduzione del numero di agrofarmaci a disposizione, sull'attuale situazione rappresenta una grande opportunità per questi prodotti biologici di avere finalmente un forte impatto positivo sulla sostenibilità della pratica agricola in Europa.

BIBLIOGRAFIA

- ALTOMARE C, TRINGOVSKA I., 2011 – *Beneficial Soil Microorganisms, an Ecological Alternative for Soil Fertility Management*. - Gen., Biof. Loc. Farm. Sys., 7, 161-214.
- HANSON L.E., HOWELL C.R., 2004 – *Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of Trichoderma virens*. - Phytopath., 94:171-176.
- HARMAN, G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., LORITO M., 2004 – *Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts*. - Nat. Rev. Microbiol., 2: 43-56.
- HARMAN G.E., 2011- *Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity*. - New Phytol., 189: 647-649.
- HERMOSA, R., VITERBO A., CHET I., MONTE E., 2012 – *Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes*. - Microbiol., 158:17-25.
- LORITO M., PETERBAUER C., HAYES C.K., HARMAN G.E., 1994 – *Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination*. - Microbiol., 140:623-629.
- LORITO M., WOO S.L., D'AMBROSIO M., HARMAN G.E., HAYES C.K., KUBICEK C.P., SCALA F., 1996 – *Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and*

membrane affecting compounds. - Mol. Plant-Micr. Interac., 9: 206-213.

LORITO M, WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E., 2010 – *Translational research on Trichoderma: from 'omics to the field.* - Ann. Rev. Phytopathol., 48: 395-417.

SHORESH M., HARMAN G.E., MASTOURI F., 2010 – *Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents.* - Ann. Rev. Phytopathol., 48: 21-43.

TUCCI M., RUOCCO M., De MASI L., De PALMA M., LORITO M., 2011 – *The beneficial effect of Trichoderma spp. on tomato is modulated by the plant genotype.* - Mol. Plant Pathol., 12: 341-354.

VINALE F., SIVASITHAMPARAM K., GHISALBERTI E.L., RUOCCO M., WOO S.L., LORITO M., 2012 – *Trichoderma secondary metabolites that affect plant metabolism.* - Nat. Prod. Comm., 7: 1545-1550.

I MICRORGANISMI SIMBIONTI: UNA RISORSA PER IL CONTROLLO DI AGENTI PATOGENI E INSETTI DANNOSI

ALBERTO ALMA (*) - ELENA GONELLA (*)

(*) DISAFA, Università degli Studi di Torino, via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO); alberto.alma@unito.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbiotici e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

Microbial symbionts: a resource for pest and pathogen control

Microbial symbioses in insects are widely distributed in every order. Different microbiotas play a variety of roles in their hosts, with peculiar features for each kind of associations. Symbionts may be obligate or facultative for insects; they may have a nutritional role, or can protect against adversities, or may manipulate the hosts' reproduction. The influence of microbial symbionts in insects' biology, physiology, behaviour and evolution could be considered as a resource for the management of insect-related problems. For this purpose, suitable microbial agents to be exploited for symbiotic control must be identified. In agriculture, interesting control applications have been proposed against noxious insects, such as the Mediterranean fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin), or against insect-transmitted pathogens, like the agent of Pierce Disease of grapevine, vectored by the sharpshooter *Homalodisca vitripennis* (Germar). Microbial symbionts of insects may represent promising control tools also in other model systems such as phytoplasma vectors, honeybee and their pathogens, or emerging pests like *Drosophila suzukii* Matsumura.

KEY WORDS: symbiotic bacteria, symbiotic control, insect vectors, fruit flies, honeybee health.

INTRODUZIONE

I microrganismi simbiotici degli insetti

Tipologie di simbiotici

Le associazioni simbiotiche tra microrganismi e insetti sono molto diffuse, dato che in quasi tutti gli ordini che compongono questo gruppo di artropodi sono presenti simbiosi di diversi tipi con organismi differenti. Le interazioni hanno un profondo impatto sull'ospite, e sono in grado di influenzarne profondamente la biologia, la fisiologia, il comportamento e l'evoluzione. L'importanza delle simbiosi microbiche negli insetti deriva dalla grande varietà che caratterizza le tipologie di simbiosi, ottimizzate nel corso del processo evolutivo dei diversi taxa, secondo le peculiarità dei singoli gruppi. Diverse categorie di simbiotici sono state descritte sulla base delle caratteristiche della relazione tra microrganismi e ospite.

La categoria dei simbiotici primari comprende microrganismi obbligati che svolgono ruoli essenziali per la vita dell'ospite, e che risiedono in cellule specializzate dette batteriociti organizzate in corpi chiamati batteriomi. Le associazioni che coinvolgono simbiotici primari sono generalmente molto antiche, e di conseguenza questi microrganismi sono fortemente coevoluti con l'ospite, fino al punto di avere un repertorio genetico molto

ridotto, che permette loro di svolgere solamente le attività correlate alla relazione simbiotica. I simbiotici primari sono tipicamente associati ad artropodi che si nutrono su diete sbilanciate, e che quindi necessitano di apporti nutrizionali aggiuntivi forniti dai microrganismi.

I simbiotici primari finora conosciuti appartengono ai phyla dei Proteobatteri e dei Bacteroidetes. Uno dei modelli più studiati è quello rappresentato dagli afidi e dal Gammaproteobatterio *Buchnera aphidicola*. Questo simbiote primario risiede in batteriociti all'interno di un batterioma associato all'intestino medio, e viene trasmesso verticalmente alla progenie (HEDDI & GROSS, 2011). *Buchnera* ha subito un netto processo di coevoluzione con gli insetti che la ospitano, dato che questa simbiosi è stata stabilita circa 200 milioni di anni fa (BAUMANN, 2005). Questo processo ha portato, come per tutti i simbiotici primari, a un'estrema riduzione delle dimensioni del genoma del simbiote (425-650 kb), e a un aumento della percentuale di AT nella sua composizione rispetto ad altri batteri (GIL *et al.*, 2002; HEDDI & GROSS, 2011). Il processo di riduzione genomica ha condotto all'eliminazione dei geni divenuti inutili in quanto già presenti nell'ambiente costituito dall'insetto (SHIGENOBU *et al.*, 2000), oppure dei geni tipici dei batteri ambientali, come quelli codificanti per la costruzione di strut-

ture della parete cellulare, o quelli coinvolti nella riparazione del DNA (DALE *et al.*, 2003). Al contrario, i geni coinvolti nella sintesi di amminoacidi essenziali sono stati mantenuti nel genoma di *Buchnera*, in quanto il simbionte è responsabile del loro rifornimento all'ospite, che non li ottiene direttamente dalla dieta (LIADOUZE *et al.*, 1996). Inoltre, l'assenza di regolatori o di attenuazione della trascrizione nella biosintesi di questi amminoacidi consente una sovrapproduzione, rispetto ai fabbisogni del simbionte, dei nutrienti che devono essere forniti all'ospite, al contrario di quanto avviene nei batteri non obbligati, nei quali le vie biosintetiche sono ridotte o interrotte alla presenza del prodotto finale (BAUMANN, 2005).

Un altro importante simbionte primario è '*Candidatus Carsonella ruddii*', Gammaproteobatterio associato a diverse specie di psille. Questi insetti, che si nutrono nel floema di diverse piante, specialmente dicotiledoni arboree, presentano un batterioma con struttura variabile, spesso caratterizzato da un sincizio multinucleato al cui interno si trovano batteriociti uninucleati contenenti il simbionte. *Carsonella* è tra i batteri con il genoma più ridotto (160kb) e con il minor contenuto in GC (16,5%) (NAKABACHI *et al.*, 2006). Lo studio del genoma di questo simbionte ha evidenziato la mancanza di diversi geni considerati essenziali per la sopravvivenza della cellula batterica, ridisegnando le conoscenze in merito al repertorio genico minimo per un procariote (MOYA *et al.*, 2009).

Un ulteriore esempio di simbionte primario legato a insetti floemomizi è dato dal Gammaproteobatterio '*Ca. Portiera aleyrodidarum*' associato agli aleirodidi. *Portiera* è contenuta in batteriomi accoppiati, da tondeggianti a ovali, generalmente di colore arancio. Una peculiarità di questa simbiosi è la modalità di trasmissione verticale: mentre nella maggior parte degli sternorinchi i simbionti lasciano i batteriociti per penetrare nelle cellule germinali, negli aleirodidi gli interi batteriociti migrano negli ovari penetrando nelle uova. Anche in questo caso, l'antichità dell'associazione tra i due organismi ha condotto ad una stretta coevoluzione, che ha permesso a *Portiera* di costituire un gruppo monofiletico all'interno dei Gammaproteobatteri, separato anche da altri simbionti primari (BAUMANN, 2005).

I simbionti primari sono necessari anche per la sopravvivenza degli pseudococcidi. Questi insetti contengono il Betaproteobatterio '*Ca. Tremblaya princeps*' all'interno di un singolo batterioma composto di batteriociti di grandi dimensioni. La peculiarità di questo simbionte è la sua capacità di contenere, a sua volta, un simbionte secondario riconducibile ai Gammaproteobatteri (VON DOHLEN *et*

al., 2001), rappresentando dunque l'unico modello finora noto di endosimbiosi tra due procarioti. Mentre le caratteristiche genetiche di *Tremblaya* indicano una stretta coevoluzione con gli ospiti, non si osserva per il Gammaproteobatterio una congruenza filogenetica con l'insetto tale da giustificare un processo coevolutivo. Queste evidenze suggeriscono che, in diverse specie di pseudococcidi, ceppi differenti di *Tremblaya* siano stati infettati da simbionti secondari divergenti, e che la trasmissione unitaria delle varie coppie di simbionti abbia condotto a fenomeni di cospeciazione (VON DOHLEN *et al.*, 2001; BAUMANN, 2005). Le caratteristiche del genoma di *Tremblaya* sono diverse da quelle degli altri simbionti primari. In particolare, il genoma di *Tremblaya* presenta un relativamente elevato contenuto in GC e due copie dell'operone rRNA (BAUMANN, 2005).

Tra gli insetti che si nutrono della linfa delle piante, gli auchenorinchi rappresentano un modello di particolare interesse in relazione allo sviluppo delle associazioni con simbionti primari, che in nessun altro gruppo sono così complesse e articolate. In molti casi, infatti, più simbionti primari hanno subito una coevoluzione congiunta in uno stesso ospite, e la riduzione genomica derivante da questo processo ha condotto a un'interdipendenza tra microrganismi, che forniscono fattori complementari concorrendo al rifornimento di nutrienti. Il Bacteroidetes simbionte primario '*Ca. Sulcia muelleri*' è diffuso in auchenorinchi riconducibili alle superfamiglie Fulgoroidea, Cicadoidea, Cercopoidea e Membracoidea (MORAN *et al.*, 2005a) (Fig. 1). Questo simbionte è stato riscontrato essere deputato al rifornimento all'ospite in amminoacidi essenziali, (WU *et al.*, 2006). Tuttavia *Sulcia*, la cui associazione con gli ospiti è tra le più antiche finora conosciute (250 milioni di anni), e il cui genoma è tra i più ridotti (circa 250 kb), ha perso a causa di una forte erosione genomica la capacità di produrre diversi amminoacidi necessari agli insetti, come la metionina e l'istidina. Attraverso fenomeni di convergenza evolutiva, i diversi *taxa* all'interno degli auchenorinchi hanno dunque sviluppato associazioni con altri simbionti primari diversi tra loro, presenti in concomitanza con *Sulcia*, ed in grado di fornire attraverso vie metaboliche diverse tra loro le sostanze mancanti. Nei cicadellidi cicadellini il Gammaproteobatterio '*Ca. Baumannia cicadellinicola*' funge da simbionte comprimario insieme a *Sulcia*; i cicadoidei sono confettati da *Sulcia* e dall'afaproteobatterio '*Ca. Hodgkinia cicadicola*'; nei cercopidi il simbionte complementare a *Sulcia* è il Betaproteobatterio '*Ca. Zinderia insecticola*' (MCCUTCHEON & MORAN, 2010). Il betaproteobatterio '*Ca. Vidania fulgoroi-*

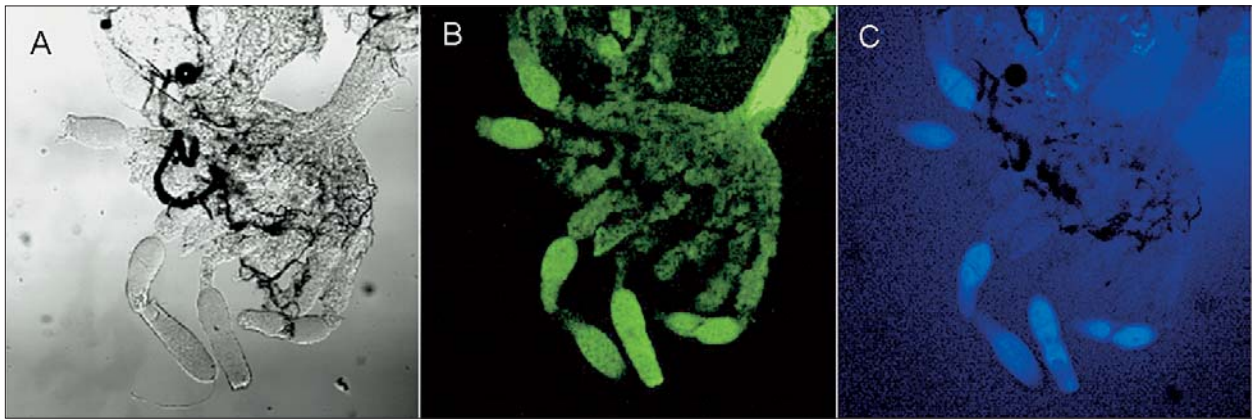


Figura 1

Ovario del cixiide *Hyalesthes obsoletus* visualizzato mediante microscopio a contrasto interferenziale (A). L'organo risulta fortemente colonizzato da batteri, come riscontrato tramite ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) effettuata con una sonda eubatterica (B). Molti dei batteri visualizzati sono riconducibili al simbiote primario '*Candidatus Sulcia muelleri*', come evidenziato dalla FISH realizzata con sonde *Sulcia*-specifiche (C) (GONELLA *et al.*, 2011).

deae', riscontrato in associazione con il Bacteroidetes in diversi cixiidi, potrebbe essere il simbiote co-primario in questa famiglia (GONELLA *et al.*, 2011).

Oltre agli insetti che si nutrono strettamente di linfa, anche altri fitofagi come i coleotteri curculionoidi sono legati a simbioti primari. Diverse specie in questa superfamiglia sono state descritte ospitare Gammaproteobatteri del genere '*Ca. Nardonella*' in batteriomi situati accanto ai tessuti intestinali e negli oociti. Questi simbioti sono riconducibili a più raggruppamenti filogenetici, con contenuti in GC e caratteristiche evolutive differenti, ed acquisiti dall'ospite in epoche diverse (LEFÈVRE *et al.*, 2004).

Gli artropodi che si nutrono di sangue rappresentano un ulteriore modello nell'ambito delle associazioni con simbioti primari in grado di fornire nutrienti mancanti nella dieta naturale dell'ospite. Un importante esempio è costituito dalle mosche Tsetse del genere *Glossina*, che ospita il simbiote primario '*Ca. Wigglesworthia glossinidia*'. Questo Gammaproteobatterio può avere una localizzazione sia intra- sia extracellulare, dato che occupa sia il citosol di batterioci che compongono batteriomi localizzati accanto all'intestino anteriore, sia il lume delle ghiandole lattifere (ATTARDO *et al.*, 2008). *Wigglesworthia* è responsabile di fornire all'ospite vitamine del gruppo B e cofattori, mancanti nel pasto di sangue; la sua eliminazione tramite somministrazione di antibiotici comporta nella mosca una pesante riduzione della fertilità (HEDDI & GROSS, 2011). Inoltre, questo simbiote, influenzando la risposta immunitaria dell'ospite, è in grado di rendere la mosca resistente al tripanosoma agente della malattia del sonno (WEISS & AKSOY, 2011).

I pidocchi del genere *Pediculus* ospitano simbioti primari in grado di fornire i nutrienti mancanti nella loro dieta, composta unicamente da sangue umano. Questi simbioti, situati in batterioci nell'intestino medio, sono trasmessi verticalmente infiltrandosi negli oociti durante il loro sviluppo. Il simbiote primario dei pidocchi umani è stato denominato '*Ca. Riesia pediculicola*', e diverge filogeneticamente da quello dei pidocchi del genere *Pedicinus*, parassiti delle scimmie non antropomorfe, chiamato '*Ca. Puchtella pedicophilus*' (SASAKI-FUKATSU *et al.*, 2006; FUKATSU *et al.*, 2009).

Non solamente gli insetti che si nutrono su diete sbilanciate, come quelli fino ad ora elencati, sono associati a simbioti primari. Un esempio è il caso delle formiche della tribù Camponotini, caratterizzate da una dieta variegata, che ospitano simbioti del genere '*Ca. Blochmannia*'. Questi simbioti, che occupano batterioci non organizzati in un vero e proprio batterioma, ma intercalati tra le cellule epiteliali dell'intestino medio e all'interno degli oociti, forniscono all'ospite diverse vitamine, cofattori e amminoacidi. Il ruolo nutrizionale di *Blochmannia* in un insetto onnivoro può essere spiegato dal fatto che, in alcune parti dell'anno o in alcuni dei diversi ambienti colonizzati da queste formiche, le risorse alimentari sono particolarmente scarse in alcuni nutrienti, rendendo dunque necessario l'apporto dato dai simbioti.

Una categoria di simbioti contrapposta a quelli primari è rappresentata dai simbioti secondari, che non sono strettamente necessari per la sopravvivenza del proprio ospite. Questi simbioti sono più simili ai microrganismi ambientali o ai patogeni, essendo facoltativi, spesso extracellulari e principalmente trasmessi orizzontalmente tra

popolazioni e specie diverse di insetti, e dunque non coevoluti con gli ospiti. Per questo motivo le interazioni con simbionti secondari sono spesso meno facilmente catalogabili rispetto a quelle con i simbionti primari, e non sempre il ruolo del microorganismo nell'ospite è chiaro. Tuttavia, la presenza di associazioni molto frequenti e mantenute nelle generazioni dell'ospite suggerisce funzioni importanti nel miglioramento della fitness dell'artropode. Alcuni dei simbionti secondari tra i più studiati sono diversi Gammaproteobatteri associati ad afidi, aleirodidi e psille, vale a dire *Regiella insecticola*, *Hamiltonella defensa* e *Serratia symbiotica* (MORAN *et al.*, 2005b). Questi simbionti sono comunemente ritrovati sia nell'emocele dell'insetto, sia all'interno di cellule che formano una guaina che circonda i batteriociti (FUKATSU & ISHIKAWA, 1998). La loro trasmissione è prevalentemente verticale, sebbene un'occasionale trasmissione orizzontale, sia tramite l'alimentazione sia mediante parassitoidi, garantisca la diffusione in ospiti diversi (SANDSTROM *et al.*, 2001). I loro genomi sono ridotti rispetto a quelli dei batteri ambientali strettamente imparentati, e così come osservato per i simbionti primari hanno basse percentuali di GC; tuttavia hanno dimensioni maggiori di quelli dei simbionti primari, e contengono geni persi da questi ultimi, come quelli collegati all'invasione dei tessuti dell'ospite. *R. insecticola*, *H. defensa* e *S. symbiotica* negli afidi sono coinvolti nella scelta delle piante ospiti, nella resistenza agli antagonisti e nella tolleranza alle alte temperature, per quanto molti dei meccanismi alla base di questi processi non sono noti (WILKINSON, 2011).

Un altro gruppo di simbionti secondari di emergente interesse è quello dei batteri acetici, appartenenti alla famiglia Acetobacteriaceae, descritti in associazione con insetti di numerosi ordini, come imenotteri, ditteri ed emitteri. Questi microrganismi, comunemente isolati da piante, fiori e frutti, sono associati al tratto intestinale di insetti che si nutrono su diete a base zuccherina. Il loro intestino, infatti, avendo regioni a pH acido, ambiente aerobico e alta presenza di zuccheri, che i batteri acetici sono in grado di ossidare in acido acetico, rappresenta una nicchia ottimale per questi microrganismi. I principali batteri acetici descritti come simbionti intestinali di insetti appartengono ai generi *Gluconobacter*, *Glocunoacetobacter* e *Acetobacter*, individuati in *Apis mellifera* L., in *Drosophila* spp., in *Bactrocera oleae* (Gmelin) e in *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell); e *Asaia*, osservata in zanzare dei generi *Anopheles* e *Aedes*, nell'imenottero *Marietta leopoldiana* Motschulsky, nel lepidottero *Pieris rapae* L. e nell'emittero *Scaphoideus titanus* Ball (CROTTI *et al.*, 2011). La funzione dei batteri acetici

come simbionti degli insetti è in gran parte ignota. La scoperta che questi microrganismi, come riscontrato in *Drosophila melanogaster* Meigen, hanno un ruolo nella modulazione dell'omeostasi intestinale basata sull'interazione con il sistema immunitario innato del moscerino della frutta (RYU *et al.*, 2008), suggerisce l'importanza dei batteri acetici simbionti nella stimolazione immunitaria, e quindi nel mantenimento di uno stato di buona salute per l'insetto (CROTTI *et al.*, 2011).

Oltre a simbionti primari e secondari, un ulteriore gruppo di microrganismi che svolge un ruolo di estremo interesse negli insetti, così come in altri artropodi, è quello dei manipolatori riproduttivi.

L'attività di questi simbionti è mirata all'aumento della produzione di femmine infette a discapito di quella maschile o di femmine non infette. In questo modo i manipolatori riproduttivi, che sono trasmessi maternalmente, sono in grado di diffondersi nelle popolazioni degli ospiti. Le strategie attraverso cui questi microrganismi modificano la riproduzione degli insetti che li ospitano sono molteplici. Attraverso l'induzione di incompatibilità citoplasmatica, gli incroci tra maschi infetti e femmine non infette non danno luogo a prole, mentre gli incroci tra maschi non infetti e femmine infette hanno successo. Gli induttori di incompatibilità agiscono tramite fattori citoplasmatici che nei maschi provocano una modificazione dei cromosomi presenti negli spermatozoi. Solo nelle uova delle femmine infette sono presenti i fattori che permettono il ripristino dei cromosomi spermatici, consentendo il normale sviluppo di un embrione diploide. Oltre all'induzione di incompatibilità citoplasmatica, i manipolatori riproduttivi possono operare sbilanciando la *sex ratio* delle popolazioni degli ospiti a favore delle femmine, tramite male killing, che consiste nell'uccisione della prole maschile durante l'embriogenesi, femminizzazione, che comporta nella prole lo sviluppo di fenotipo femminile da parte di individui con genotipo maschile, o induzione di partenogenesi.

I microrganismi capaci di alterare la riproduzione dei propri ospiti sono estremamente diffusi negli artropodi, grazie alla loro capacità di essere trasmessi orizzontalmente (ad esempio tramite parassitoidi) oltre che verticalmente alla progenie. I diversi meccanismi di alterazione riproduttiva attuati da questi simbionti hanno l'obiettivo di mantenere l'infezione nel tempo.

Il principale manipolatore riproduttivo è l'Alfaproteobatterio *Wolbachia pipientis*. *Wolbachia* infetta i due terzi delle specie di insetti, nonché numerosi altri artropodi (come acari, ragni, scorpioni e crostacei) e nematodi (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Questo simbionte si localizza principal-

mente nelle gonadi femminili all'interno degli oociti, dai quali viene trasmesso maternalmente, tuttavia è stato riscontrato anche in numerosi altri tessuti dei suoi ospiti, come le fibre muscolari, l'intestino, i tessuti cerebrali, i corpi grassi e l'emolinfa (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Lo stesso individuo può essere colonizzato da più ceppi diversi di *Wolbachia* (VAUTRIN *et al.*, 2007), oppure da *Wolbachia* e altre specie di manipolatori riproduttivi (ENIGL & SCHAUSBERGER, 2007; GOTTLIEB *et al.*, 2008), anche se la natura di un'eventuale interazione tra batteri diversi è tuttora sconosciuta. L'azione di alterazione riproduttiva è espressa da parte di questo simbionte mediante tutte le diverse strategie sopra descritte. L'induzione di incompatibilità citoplasmatica è la modalità di manipolazione più frequentemente riscontrata, ed è stata descritta in diversi ordini di insetti, oltre che in alcuni aracnidi e isopodi (WERREN *et al.*, 2008). L'induzione di partenogenesi telitoca è meno comune, ed è stata descritta fino ad ora solamente in specie con sviluppo arrenotoco, in cui i maschi si sviluppano da uova non fecondate, come imenotteri e tripidi, oltre ad alcuni acari (STOUTHAMER *et al.*, 1990; WEEKS & BREEUWER, 2001; ARAKAKI *et al.*, 2001). La femminizzazione, in un primo momento descritta solamente negli isopodi, è stata solo di recente documentata in insetti. All'interno di questa classe, la femminizzazione è stata osservata solamente in una specie di lepidotteri (*Eurema hecabe* L.) e in un emittero (*Zyginidia pullula* Boheman) (NEGRI *et al.*, 2006). D'altro canto, il fenomeno del *male killing* è stato descritto in un numero maggiore di insetti, appartenenti a tre diversi ordini (coleotteri, ditteri e lepidotteri), oltre che negli pseudoscorpioni (WERREN *et al.*, 2008).

Un altro importante simbionte agente di distor-

sioni riproduttive è il Bacteroidetes '*Ca. Cardinium hertigii*'. Anche questo batterio è ampiamente distribuito in vari ordini di insetti e in diversi altri artropodi e nematodi, tuttavia nella maggior parte degli ospiti riconosciuti il suo ruolo non è stato ancora chiarito. Alterazioni riproduttive dovute a *Cardinium* sono state descritte per *Encarsia pergandiella* Howard (induzione di partenogenesi), *E. hispida* DeSantis e *Brevipalpus* spp. (femminizzazione), *Bryobia sarothamni* Geijskes e *Eotetranychus suginamensis* (Yokoyama) (induzione di incompatibilità citoplasmatica) (BREEUWER *et al.*, 2011). Così come osservato per *Wolbachia*, anche *Cardinium* è localizzato principalmente nei tessuti riproduttivi, ed in particolare all'interno del follicolo e delle cellule nutrici, tuttavia è stato osservato nei tessuti epidermici e nervosi, nei corpi grassi, nelle ghiandole salivari e in specifici batteriociti (BREEUWER *et al.*, 2011) (Fig. 2). Un aspetto di particolare interesse tuttora da chiarire è se i meccanismi alla base delle alterazioni riproduttive causate da *Cardinium* e *Wolbachia* siano gli stessi, regolati dagli stessi gruppi di geni, oppure se lo stesso fenotipo sia indotto da vie diverse evolutesi separatamente.

Oltre ai più diffusi manipolatori sessuali *Wolbachia* e *Cardinium*, anche alcuni ceppi di altri batteri hanno sviluppato la capacità di alterare la riproduzione dei loro ospiti. Alcuni esempi sono rappresentati da ceppi dell'Alfaproteobatterio *Rickettsia*, induttori di partenogenesi in alcuni imenotteri e agenti di male killing in coleotteri (GOTTLIEB *et al.*, 2011), e del Mollicutes *Spiroplasma*, causa di male killing in *Drosophila* spp. (MONTENEGRO *et al.*, 2005), oppure il Gammaproteobatterio *Arsenophonus nasoniae*, agente di male killing in *Nasonia* spp. (SKINNER, 1985).

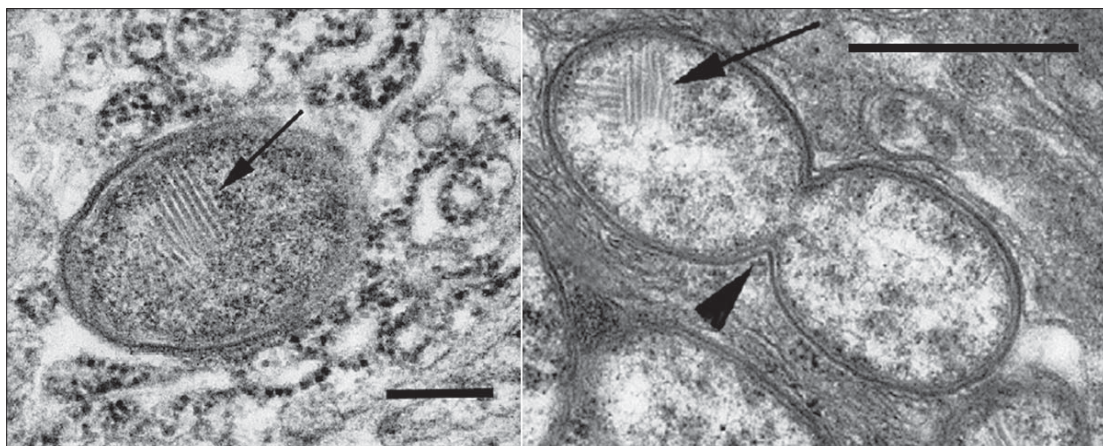


Figura 2

Immagini di microscopia elettronica a trasmissione raffiguranti il manipolatore riproduttivo '*Candidatus Cardinium hertigii*' nel cicadellide *Scaphoideus titanus*, all'interno dei corpi grassi (sinistra, barra = 0,8 μ m) e degli ovari (destra, barra = 0,8 μ m). Le frecce indicano il caratteristico *marker* morfologico che permette di identificare il genere *Cardinium*; la punta di freccia nell'immagine di destra mostra la presenza di cellule in divisione nei tessuti ovarici (SACCHI *et al.*, 2008).

Influenza dei simbionti sulla biologia degli insetti ospiti

I microrganismi simbionti esercitano pesanti effetti su diversi aspetti della vita dei loro insetti ospiti, come la fisiologia, l'ecologia, il comportamento alimentare o riproduttivo. L'influenza dei simbionti sugli ospiti può rendere la simbiosi obbligata, come nel caso dei simbionti primari, in conseguenza a lunghi processi coevolutivi. Tuttavia, anche nel caso dei simbionti facoltativi, il miglioramento della fitness degli ospiti o l'impedimento dello sviluppo per gli individui non infetti rappresentano la chiave per il mantenimento dell'associazione nel tempo. Un'attenzione particolare va posta agli effetti dei simbionti sugli insetti dannosi, a causa dell'effetto che questi possono avere sulla capacità invasiva dell'ospite (FELDHAAR, 2011).

Una funzione molto importante svolta da molti simbionti microbici degli insetti è il rifornimento di sostanze nutritive che non vengono diversamente acquisite dall'ospite, come ad esempio accade nel caso degli insetti che si nutrono su substrati poveri di determinate sostanze. In questi artropodi, i simbionti possono fornire amminoacidi essenziali, steroli o vitamine fondamentali. Altri microrganismi simbionti sono deputati alla demolizione di substrati complessi, come la cellulosa, o alla detossificazione da composti secondari nocivi presenti nei substrati alimentari (DOUGLAS, 2009). Grazie all'apporto nutrizionale aggiuntivo fornito dai microrganismi agli insetti, questi ottengono allargamento della propria gamma di substrati di alimentazione, potendo dunque colonizzare anche nicchie ecologiche povere di fonti alimentari ed ampliando la propria diffusione (DOUGLAS, 2009).

Quando non forniscono vantaggi nutrizionali, i microrganismi simbionti possono contribuire al miglioramento della fitness dell'ospite, attraverso la difesa da patogeni e parassitoidi, (OLIVER *et al.*, 2005), permettendo l'adattamento a stress abiotici (FELDHAAR, 2011), o tramite il mantenimento dell'omeostasi immunitaria (CROTTI *et al.*, 2011). Anche in questo caso l'influenza sull'ecologia dell'ospite può essere netta: la difesa da nemici naturali può condurre a una maggiore presenza di determinate specie in un ambiente a discapito di altre; la resistenza a stress abiotici come le alte temperature può condizionare la capacità degli insetti di sopravvivere in ambienti con temperature diverse (FELDHAAR, 2011); la stimolazione delle difese immunitarie, oltre a proteggere l'ospite da agenti patogeni, portando a una sua teorica proliferazione, può influenzare la capacità degli insetti vettori di microrganismi agenti di malattia di trasmettere questi patogeni a piante o animali (WEISS & AKSOY, 2011).

Anche i manipolatori della riproduzione influenzano pesantemente i propri ospiti. L'impatto sulla riproduzione comporta effetti ecologici ed evolutivi, isolando riproduttivamente popolazioni diverse e quindi contribuendo alla speciazione, diminuendo la diversità genetica delle linee infette, e riducendo le dimensioni delle popolazioni di insetti ospiti (FELDHAAR, 2011).

POTENZIALITÀ APPLICATIVE DEI SIMBIONTI DEGLI INSETTI

Gestione dei simbionti e controllo simbiotico

La conoscenza delle relazioni tra gli insetti e i microrganismi simbionti a essi associati può far luce su alcuni dei meccanismi alla base della vita di questi artropodi. Alla luce delle conoscenze acquisite negli ultimi anni sulle simbiosi microbiche, la gestione dell'entomofauna per la difesa delle piante e delle produzioni agro-alimentari, o per scopi legati alla salute pubblica, può essere effettuata tenendo in considerazione la complessità del sistema-insetto, dove l'insieme degli organismi che interagiscono nella simbiosi costituisce un super-individuo, definito olobionte (ROSEMBERG & ZILBER-ROSEMBERG, 2011). Gli attori microbici all'interno dell'olobionte possono essere impiegati seguendo un approccio chiamato Gestione della Risorsa Microbica (Microbial Resource Management, MRM) (VERSTRAETE, 2007). Questo approccio comporta strategie volte alla risoluzione di problemi pratici di varia natura presenti in un determinato ambiente grazie allo sfruttamento delle attività biologiche svolte dai microrganismi che vi risiedono. Fino a ora il MRM è stato impiegato con successo in vari ecosistemi, per risolvere problematiche ambientali o sanitarie, come nel caso della gestione delle acque reflue o della prebiotica umana. L'applicazione di questo metodo per contrastare problematiche correlate agli insetti può fornire promettenti risultati, per il controllo di agenti dannosi o per la protezione di insetti utili da malattie e stress (CROTTI *et al.*, 2012). Il MRM può essere sviluppato tramite la creazione di protocolli di lotta, secondo la strategia detta Controllo Simbiotico (CS). L'uso dei simbionti come agenti di controllo può essere indirizzato alla lotta diretta ad insetti dannosi, oppure al contenimento di patogeni di piante o animali trasmessi da vettori. L'attività di controllo può essere basata sull'espressione da parte dei simbionti di fattori antagonistici, oppure sullo sbilanciamento delle popolazioni ad opera di manipolatori riproduttivi, o ancora sulla competizione tra simbionti e patogeni nel corpo dell'insetto vettore.

I microrganismi in grado di svolgere un'attività di

controllo devono essere selezionati all'interno della naturale comunità microbica residente nell'insetto bersaglio (ALMA *et al.*, 2010). A tal fine, il presupposto fondamentale è rappresentato dalla caratterizzazione molecolare della comunità microbica associata all'insetto, seguita da ricerche più approfondite sulla localizzazione dei simbionti all'interno del corpo dell'ospite, effettuata tramite microscopia elettronica o ibridazione *in situ*. In seguito, tra i simbionti che compongono la frazione coltivabile del microbiota, uno *screening* accurato dei ceppi riconducibili ai simbionti più promettenti può consentire l'identificazione di isolati *wild-type* che presentano le caratteristiche necessarie per un agente di lotta, oppure i microrganismi di interesse possono essere opportunamente modificati geneticamente per lo sviluppo di tecniche di paratransgenesi. Altre analisi volte a chiarire le interazioni tra ospite e simbionti possono permettere di valutare se i candidati agenti di lotta siano in possesso di importanti requisiti, che includono la stabile associazione con l'ospite, la dominanza all'interno della comunità microbica dei singoli individui, la localizzazione negli stessi organi colonizzati dai patogeni (nel caso della lotta a malattie degli insetti o trasmesse da

questi), la facilità di coltivazione e manipolazione genetica *in vitro*, e la trasmissione verticale e/o orizzontale (ALMA *et al.*, 2010) (Fig. 3). Nel caso sia possibile individuare un agente di controllo efficace, prima di poter mettere in pratica protocolli di lotta basati sul suo utilizzo è necessario valutare i rischi connessi al rilascio nell'ambiente del microrganismo. Questi rischi possono essere rappresentati da una tossicità verso l'artropode o verso gli organismi animali e vegetali con cui questo viene in contatto, da uno sbilanciamento delle comunità microbiche affiliate a questi organismi, oppure, nel caso dell'impiego di protocolli basati sulla paratransgenesi, da problematiche relative all'immissione nell'ambiente di materiale genetico modificato.

Esempi di Controllo Simbiotico applicati all'agricoltura

Tecnica dell'insetto incompatibile applicata a *Ceratitis capitata*

La mosca mediterranea della frutta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), che infesta più di 250 specie di fruttiferi, rappresenta una delle minacce più preoccupanti per la frutticoltura di tutto il mondo. La caratterizzazione della comunità microbica

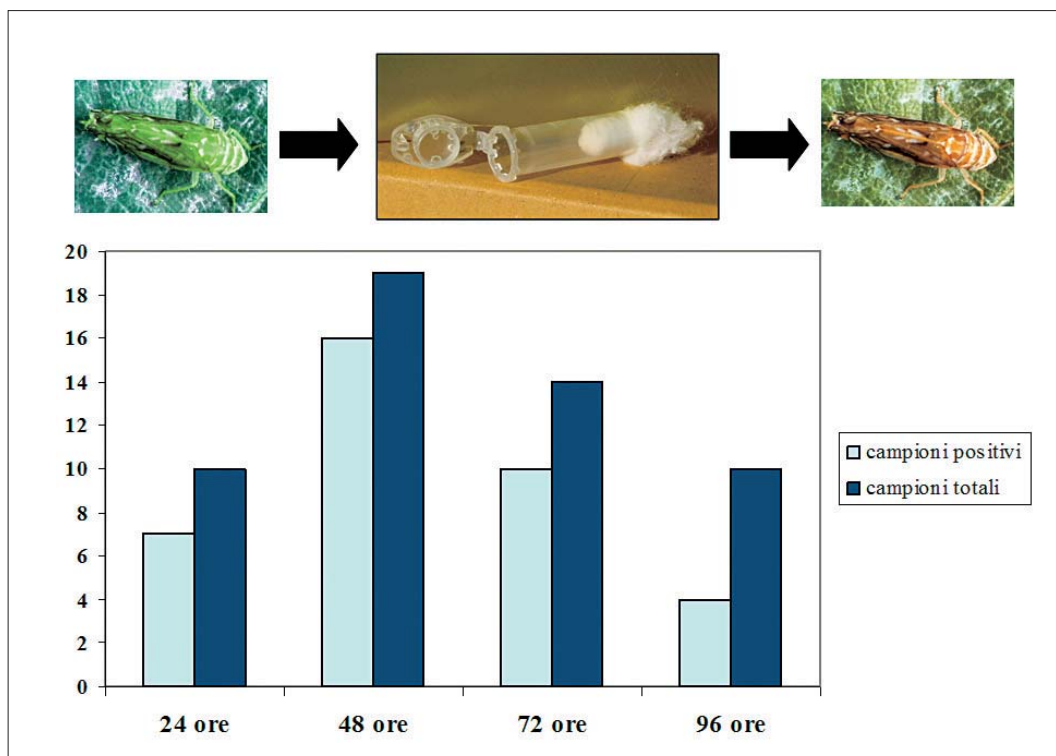


Figura 3

Il batterio acetico *Asaia* sp., candidato agente di controllo simbiotico per la lotta alla Flavescenza dorata della vite trasmessa dal cicadellide *Scaphoideus titanus*, è trasferito orizzontalmente tra individui che condividono il substrato alimentare. La trasmissione orizzontale è stata dimostrata tramite prove di *cofeeding* su dieta artificiale, condotte alimentando su una stessa soluzione zuccherina prima un individuo colonizzato con un ceppo marcato di *Asaia*, e successivamente un esemplare non colonizzato. Il grafico indica le cicaline risultate positive a PCR quantitativa con primer specifici per il gene marcatore (colonne azzurre) sul totale di individui saggiati (colonne blu), in seguito a diversi periodi di condivisione della dieta (da 24 a 96 ore) (modificato da GONELLA *et al.*, 2012).

associata a questo insetto ha dimostrato che *C. capitata* non è naturalmente infettata da ceppi di *Wolbachia*. Questo simbiote ha recentemente attirato l'interesse della comunità scientifica come potenziale agente di controllo simbiotico, sulla base delle alterazioni riproduttive di cui è responsabile, prima fra tutte l'induzione di incompatibilità citoplasmatica (BOURTZIS & ROBINSON, 2006). L'incompatibilità riproduttiva causata da *Wolbachia* può essere sfruttata per indurre sterilità in popolazioni di campo delle specie bersaglio utilizzando la tecnica dell'insetto incompatibile (Incompatible Insect Technique, IIT) (ZABALOU *et al.*, 2009). Questa tecnica prevede il lancio di maschi infettati da *Wolbachia*, riproduttivamente incompatibili con le femmine di campo, non infette, ed è stata sviluppata in analogia con la tecnica dell'insetto sterile (Sterile Insect Technique, SIT), basata sull'uso di radiazioni o di sterilizzanti chimici applicati a maschi che devono in seguito essere lanciati nei propri ambienti di sviluppo. La tecnica dell'IIT è stata dunque proposta per la lotta a *C. capitata* attraverso la creazione di linee di mosca mediterranea infette da *Wolbachia*. Le linee transinfettate sono state ottenute tramite microiniezioni nel citoplasma embrionale utilizzando la mosca del ciliegio *Rhagoletis cerasi* L. come donatore (ZABALOU *et al.*, 2004). *Wolbachia* è stata riscontrata in maniera permanente nelle linee transinfettate, e il lancio sperimentale di maschi infetti ha permesso la soppressione totale delle popolazioni di laboratorio (ZABALOU *et al.*, 2004). Tuttavia, un aspetto da tenere in considerazione per l'effettiva applicazione in pieno campo dell'IIT è la necessità di lanciare con estrema certezza solamente maschi, dato che il rilascio accidentale di femmine infette da *Wolbachia* vanificherebbe l'azione sterilizzante del lancio (queste femmine sarebbero in grado di produrre una normale progenie in seguito all'accoppiamento con i maschi lanciati), e permetterebbe la diffusione di femmine infette di seconda generazione che comprometterebbero del tutto la strategia di lotta (BOURTZIS & ROBINSON, 2006). La produzione massale di maschi incompatibili di *C. capitata* deve prevedere l'eliminazione delle femmine tramite shock termico embrionale, che è stato dimostrato condurre alla produzione di linee composte di soli maschi senza ridurre l'efficacia dell'incompatibilità citoplasmatica (ZABALOU *et al.*, 2009). Altri possibili fattori che potrebbero ridurre l'efficacia dell'attività di controllo, diminuendo l'efficienza dell'induzione di incompatibilità svolta da *Wolbachia* nei maschi infetti, sono l'età dell'insetto, il numero di accoppiamenti e la temperatura (BOURTZIS & ROBINSON, 2006); tuttavia il ruolo di

questi fattori non è stato ancora chiarito. Date le sue potenzialità, la possibilità dell'impiego dell'IIT contro la mosca mediterranea della frutta rappresenta un ottimo esempio per la sua sperimentazione anche in altri modelli, e sottolinea l'importanza dei manipolatori riproduttivi come agenti di lotta a basso impatto ambientale.

Paratransgenesi per la lotta alla malattia di Pierce della vite

La malattia di Pierce, causata dal Gammaproteobatterio *Xylella fastidiosa*, è una delle più problematiche avversità della vite in nord America, dove causa ingenti danni produttivi. Il principale insetto vettore di *X. fastidiosa* è il cicadellide cicalellino *Homalodisca vitripennis* (Germar). Tra le strategie proposte per il controllo della malattia di Pierce, un approccio di CS è stato proposto al fine di rendere *H. vitripennis* non idonea alla trasmissione del patogeno, tramite l'impiego di insetti paratransgenici. Per la ricerca di possibili agenti di paratransgenesi l'attenzione è stata focalizzata in particolare sui batteri endofiti della vite associati anche alla cicalina, che possano essere modificati per l'espressione di fattori anti *X. fastidiosa*. Tra questi, il Betaproteobatterio *Alcaligenes xylosoxidans denitrificans* è stato selezionato in quanto facilmente manipolabile *in vitro*. La capacità di *A. xylosoxidans denitrificans* di colonizzare il primo tratto intestinale di *H. vitripennis*, che ospita anche *X. fastidiosa*, è stata saggiata introducendo attraverso l'alimentazione un ceppo di *A. xylosoxidans denitrificans* trasformato per la produzione di una proteina fluorescente. L'efficacia della colonizzazione da parte del simbiote dell'intestino di *H. vitripennis*, osservata grazie a indagini di microscopia elettronica, supporta la possibilità di impiegare *A. xylosoxidans denitrificans* come agente di controllo (BEXTINE *et al.*, 2004). Un'indagine seguente è stata indirizzata a verificare la praticabilità dell'impiego di un sistema di distribuzione dell'agente di CS basato sulla pianta. Un ceppo marcato di *A. xylosoxidans denitrificans* è stato usato per valutare la colonizzazione di diverse piante ospiti in seguito all'inoculazione diretta nel vegetale. I risultati di queste prove hanno dimostrato come le piante meno appetibili per *H. vitripennis* fossero anche meno efficientemente colonizzate dal simbiote (BEXTINE *et al.*, 2005).

Per verificare in maniera definitiva che *A. xylosoxidans denitrificans* sia in possesso delle caratteristiche necessarie per un candidato agente di CS, è stato sviluppato un sistema per la valutazione dei rischi, in termini di tossicità per le piante, alterazioni degli ospiti, trasferimento genico orizzontale a ceppi *wild-type* del simbiote, stabilità del trans-

gene, conseguenze legate all'ecologia microbica del sistema pianta, ed effetti sul processo di vinificazione (MILLER *et al.*, 2006).

Modelli di studio con potenzialità applicative

Le simbiosi negli insetti vettori di fitoplasmi alla vite e ai fruttiferi

Un modello che può costituire un interessante base per lo sviluppo di strategie di CS è rappresentato dalla lotta alle fitoplasmosi, un gruppo di malattie che colpiscono svariate specie di piante spontanee e coltivate, e che sono causa di forti perdite economiche in tutta Europa, in particolar modo per quanto concerne la vite e le piante da frutto. Queste fitopatie sono causate da microrganismi privi di parete cellulare appartenenti al genere '*Ca. Phytoplasma*', trasmessi alle piante da psille e cicaline. Alla luce della rilevanza delle fitoplasmosi nel panorama viticolo italiano ed europeo, ricerche concernenti lo studio della comunità microbica associata ai vettori degli agenti eziologici sono state condotte al fine di individuare dei potenziali agenti di controllo. I primi studi sono stati effettuati sul cicadellide *S. titanus*, il vettore del fitoplasma responsabile della Flavescenza dorata (FD). Tra i microrganismi dominanti all'interno della comunità microbica di *S. titanus*, sono stati osservati il Bacteroidetes '*Ca. Cardinium heritigii*' e il batterio acetico *Asaia* sp. (MARZORATI *et al.*, 2006). Il primo, noto manipolatore riproduttivo, è trasmesso verticalmente alla progenie, come dimostrato dal suo ritrovamento nei tessuti riproduttivi delle femmine della cicalina (SACCHI *et al.*, 2008); tuttavia nessuna alterazione della riproduzione è stata individuata in *S. titanus*. Oltre che nelle gonadi femminili, *Cardinium* è stato riscontrato anche in numerosi altri organi, tra cui le ghiandole salivari. Questo suggerisce la possibilità che il simbionte sia trasmesso alla vite, come indicato da studi preliminari che hanno dimostrato la presenza del batterio nel mezzo alimentare (PAJORO *et al.*, 2008). Nonostante l'interesse suscitato dall'eventualità di un ciclo vitale del batterio condiviso tra pianta e insetto, altre caratteristiche di *Cardinium* rendono di difficile applicabilità lo sviluppo di tecniche di lotta basate su questo simbionte, come la sua incoltivabilità o l'apparente assenza di manipolazioni riproduttive nella cicalina. Il secondo simbionte dominante presente in *S. titanus*, vale a dire *Asaia*, è invece un promettente candidato agente per il CS. Infatti, questo batterio acetico, oltre a essere preponderante nel microbiota del cicadellide e a colonizzarne diversi organi, è trasmesso alla progenie tramite un fenomeno detto "egg smearing" (la contaminazione dell'uovo

durante la maturazione nell'ovario, seguita dalla penetrazione al suo interno durante lo sviluppo embrionale) (CROTTI *et al.*, 2009). In aggiunta, *Asaia* può essere trasferita tra individui che condividono il substrato alimentare o in seguito all'accoppiamento (GONELLA *et al.*, 2012). Un'ulteriore caratteristica del simbionte che appare di particolare interesse è la capacità di ceppi provenienti da un determinato insetto di colonizzare ospiti anche molto lontani filogeneticamente da questo. Dato il ritrovamento di *Asaia* anche in insetti vettori di interesse medico, come le zanzare dei generi *Aedes* e *Anopheles*, la versatilità di colonizzazione dimostrata da questo batterio acetico indica la possibilità di sfruttarlo come agente di lotta ad ampio spettro in diversi sistemi (CROTTI *et al.*, 2009).

Oltre a *S. titanus*, anche un altro importante vettore di fitoplasmi alla vite è stato oggetto di indagini relative alla comunità microbica, vale a dire il cixiide *Hyalesthes obsoletus* Signoret. Questo insetto trasmette il fitoplasma responsabile del Legno Nero (LN), di emergente interesse in diversi areali italiani ed europei. Il microbiota affiliato a *H. obsoletus* è risultato essere decisamente più variegato rispetto a quello di *S. titanus*. Numerose specie batteriche sono state osservate, distribuite in vari distretti corporei del cixiide (GONELLA *et al.*, 2011). Tra i simbionti osservati, diverse specie di batteri conosciuti come simbionti primari di altri auchenorrhinchi sono stati identificati in concomitanza in diversi organi. Questo suggerisce che questi simbionti possano concorrere nello svolgere ruoli fondamentali per *H. obsoletus*. Oltre a simbionti già noti, anche un Betaproteobatterio mai descritto in precedenza, denominato '*Ca. Vidania fulgoroideae*', è stato ritrovato con frequenze e distribuzione simili a quelle degli altri simbionti primari. È possibile dunque ipotizzare che *Vidania* svolga una funzione di primaria importanza nel cixiide, e una sua interdipendenza con gli altri simbionti primari non può essere esclusa (GONELLA *et al.*, 2011). Il ruolo e le interazioni tra i simbionti che compongono una così complessa comunità all'interno del corpo di *H. obsoletus* dovranno essere ulteriormente investigate in futuro, in modo da chiarire le potenzialità connesse con lo sfruttamento di uno o più di questi microrganismi nell'ambito della lotta al LN.

Data la rilevanza in termini di perdite economiche rappresentata dalle fitoplasmosi che colpiscono le piante da frutto, anche le psille che trasmettono i fitoplasmi che le causano sono state indagate per la presenza di potenziali agenti di controllo. In particolare, lo psillide *Cacopsylla pyri* L. è stato oggetto di un'accurata caratterizzazione microbica. Molti microrganismi già noti come sim-

bionti primari e secondari di psille sono stati riscontrati, tra cui batteri dei generi *Carsonella*, *Ralstonia*, *Sodalis* e *Arsenophonus*. Inoltre, alte percentuali di infezione sono state osservate per un batterio riconducibile ad una nuova specie, denominata '*Ca. Liberibacter europaeus*' (Cleu) (Fig. 4). Il genere '*Ca. Liberibacter*' comprende importanti agenti patogeni di diverse piante coltivate, in particolare agrumi e solanacee, diffusi in tutto il mondo. Al contrario, Cleu, che oltre a colonizzare diversi distretti corporei di *C. pyri* può essere trasmesso al pero, non induce sintomi nelle piante infette (RADDADI *et al.*, 2011). Per questo motivo è stato suggerito che Cleu abbia un ruolo di simbionte in diverse specie di psille, nonché di endofita del pero e di altre rosacee (RADDADI *et al.*, 2011; CAMEROTA *et al.*, 2012), piuttosto che di fitopatogeno.

L'uso dei simbionti dell'ape nella lotta alla peste americana

L'applicazione di strategie di MRM per la protezione dell'ape (*Apis mellifera* L.) appare di estremo interesse data la grande importanza economica di questo insetto, sia per i prodotti che derivano dal suo allevamento, sia per il suo ruolo di impollinatore. Molte sono le malattie che affliggono questo insetto utile, inoltre l'insorgenza di pesanti fenomeni di mortalità delle colonie osservati in tutto il mondo negli ultimi anni desta notevoli preoccupa-

zioni, a causa delle difficoltà legate alla cura di questa sindrome, che non è riconducibile a un solo agente causale, ma alla concorrenza di più fattori di origine biotica e abiotica che provocano uno stress del sistema immunitario dell'ape. Il mantenimento di una comunità microbica equilibrata nel tratto intestinale è di estrema utilità per il rinforzo delle difese immunitarie e dunque la conservazione di un buono stato di salute nell'ape, così come è stato osservato anche per l'uomo e per altri animali. I numerosi studi concernenti la comunità microbica associata all'ape hanno evidenziato la presenza di diversi *phyla* batterici (MOHR & TEBBE, 2006). I risultati ottenuti da COX-FOSTER *et al.* (2007), in seguito al confronto tra comunità microbiche di esemplari colpiti da moria delle colonie e adulti sani, hanno permesso di ipotizzare un collegamento tra l'indebolimento generale dell'individuo a causa di tale moria e lo sbilanciamento del suo microbiota intestinale. Alla luce di queste evidenze, lo studio del ruolo dei simbionti intestinali dell'ape nel mantenimento di un buono stato di salute risulta di estremo interesse. Tra i microrganismi simbionti riscontrati nell'intestino dell'ape, i batteri acetici e lattici appaiono di particolare rilevanza, in quanto noti, in altri modelli animali, per esercitare un'attività benefica per l'ospite. L'alto tenore zuccherino e l'elevato livello di acidità presenti nel tratto intestinale dell'ape lo rendono una

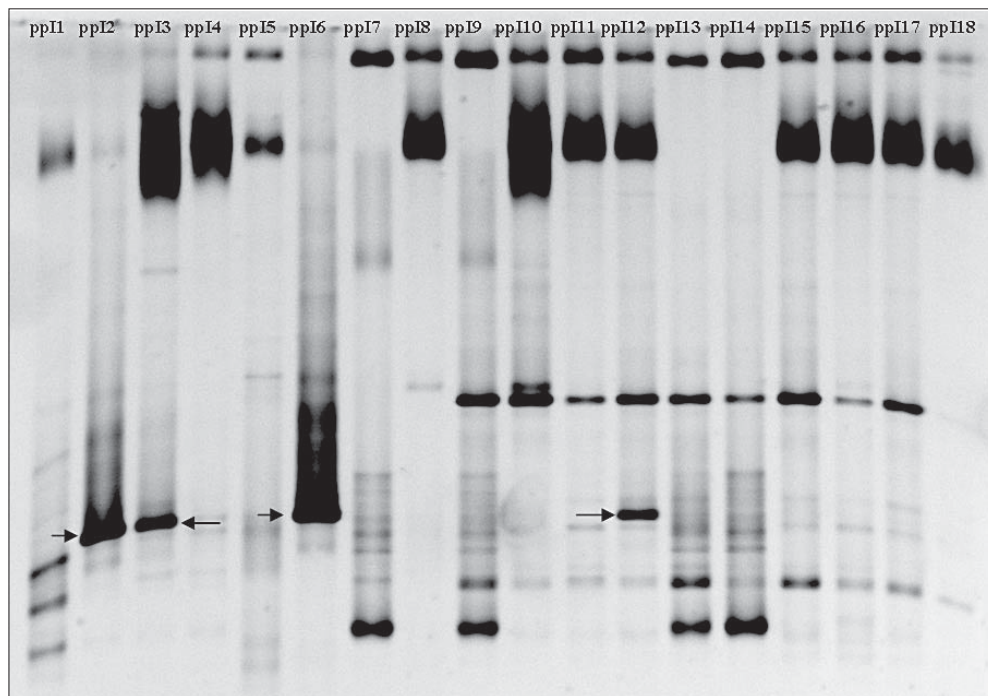


Figura 4

Profili elettroforetici in gradiente denaturante ottenuti dal DNA batterico presente in individui di *Cacopsylla pyri* (indicati dalle sigle in alto). La presenza di diverse bande, che rappresentano specie batteriche differenti, rileva la grande diversità microbica affiliata all'insetto. Le bande indicate dalle frecce corrispondono alla nuova specie '*Candidatus Liberibacter europaeus*' (RADDADI *et al.*, 2011).

nicchia ottimale per lo sviluppo di questi batteri. Diverse specie del genere *Lactobacillus*, tra i batteri acetici, e dei generi *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Saccharibacter*, tra i batteri acetici, sono state rinvenute nell'intestino di *A. mellifera* (MOHR & TEBBE, 2006; 2007). Questi simbionti potrebbero essere sfruttati in strategie di MRM non solamente per la lotta alla moria delle colonie, ma anche per proteggere l'ape dall'insorgenza dei numerosi altri patogeni che la affliggono. Tra questi, i patogeni batterici che attaccano le larve sono responsabili di malattie particolarmente gravi, vale a dire la peste americana, causata da *Paenibacillus larvae*, e la peste europea, dovuta a *Melissococcus plutonius*. Tali patogeni sono attualmente molto difficili da controllare, dato che l'uso di antibiotici è l'unica cura efficace, ma non permessa in diverse nazioni europee. L'impiego di microrganismi probiotici può rappresentare una promettente alternativa a basso impatto ambientale. Diversi ceppi di batteri lattici, acetici e sporigeni presenti in *A. mellifera* sono noti per la loro capacità di contenere le popolazioni di patogeni tramite la produzione di composti antimicrobici o l'abbassamento del pH, e in effetti sono stati riscontrati inibire *in vitro* la crescita di *P. larvae*. Prove *in vivo* condotte utilizzando larve alimentate con ceppi di batteri lattici e successivamente esposte a *P. larvae* hanno confermato la capacità di questi batteri di proteggere l'ape dal patogeno (FORSGREN *et al.*, 2010), sottolineando la possibilità dell'impiego di batteri probiotici per la protezione delle larve. Nuove strategie per il controllo delle malattie delle api potranno quindi essere formulate sulla base delle evidenze fino a ora acquisite e di studi futuri che dovranno essere condotti per la comprensione dei diversi meccanismi che entrano in gioco nell'inibizione dei patogeni da parte dei simbionti, come esclusione competitiva, produzione di sostanze antimicrobiche e stimolazione del sistema immunitario.

I simbionti in *Drosophila suzukii*

Il dittero brachicero *Drosophila suzukii* Matsumura è un moscerino della frutta originario del sud-est asiatico, che di recente è stato introdotto accidentalmente in Europa e in America (HAUSER *et al.*, 2009; CALABRIA *et al.*, 2012). L'introduzione di questo insetto ha destato gravi preoccupazioni per la sua elevata pericolosità per le produzioni frutticole. Infatti, a differenza delle altre specie nel genere *Drosophila*, *D. suzukii* attacca i frutti durante il normale processo di maturazione sulla pianta (GRASSI *et al.*, 2009). Le piante coltivate più gravemente colpite da questo moscerino della frutta sono fragola, piccoli frutti e fruttiferi maggiori, ma

anche diverse specie spontanee sono attaccate. Lo sviluppo di strategie di lotta contro la diffusione di *D. suzukii* è fortemente necessario data la gravità dei danni che questo insetto causa alla frutticoltura. Anche alla luce dei promettenti risultati acquisiti nell'ambito della lotta ad altri insetti e patogeni dannosi, la creazione di protocolli di CS potrebbe condurre a un controllo efficace. Attualmente la comunità batterica residente in *D. suzukii* non è conosciuta, nonostante la caratterizzazione dei lieviti associati all'insetto e alle sue piante ospiti sia stata riportata recentemente (HAMBY *et al.*, 2012). D'altro canto, numerosi studi sono stati indirizzati alla conoscenza del microbiota di altre specie con genere. I *taxa* più frequentemente ritrovati in *Drosophila* spp. includono le Enterobacteriaceae, i Lactobacillales, e le Acetobacteriaceae, anche se una forte influenza della quantità e del tipo di cibo ingerito dai singoli individui sulla composizione della comunità microbica è stata riscontrata (CHANDLER *et al.*, 2011). L'importanza come candidati agenti di CS dei gruppi batterici osservati in diverse specie nel genere *Drosophila* è nota sulla base delle numerose evidenze ottenute in altri sistemi. Anche il ruolo recentemente riconosciuto per i batteri acetici nel modulare l'omeostasi immunitaria in *D. melanogaster* (ROH *et al.*, 2008) pone le basi verso la possibilità di impiegare questi simbionti per il contenimento di *D. suzukii*. Oltre a batteri acetici, lattici ed enterobatteriacee, un simbionte frequentemente riscontrato nel genere *Drosophila* è *Wolbachia*, che è stata riconosciuta svolgere ruoli diversi in specie differenti, come quello di induttore di incompatibilità citoplasmatica (WERREN *et al.*, 2008) e di male killing (MONTENEGRO *et al.*, 2005), di simbionte mutualista (HEDGES *et al.*, 2008) e di patogeno (MIN & BENZER, 1997). Data l'importanza di questo Alfabroteobatterio come strumento di CS, è necessario chiarire la natura dell'eventuale interazione tra *Wolbachia* e *D. suzukii*.

Alla luce delle conoscenze esistenti in merito alla composizione della comunità microbica affiliata a *Drosophila* spp., studi mirati alla conoscenza della struttura e del ruolo del microbiota di *D. suzukii* potranno aprire nuovi scenari di lotta a basso impatto ambientale che coinvolgano l'impiego di agenti microbici.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'interesse verso la conoscenza delle relazioni che intercorrono tra gli insetti e i rispettivi microrganismi simbionti è fortemente cresciuto nel corso degli ultimi anni, come sottolineato dalla presenza

di sempre più numerosi studi in merito. Differenti modelli sono stati fino a ora presi in considerazione; per gli insetti studiati molti importanti meccanismi alla base dei processi fisiologici, metabolici e comportamentali sono stati delucidati, spesso con interessanti implicazioni nell'ambito della gestione di problematiche connesse agli artropodi, come nel caso della creazione di protocolli di CS. Tuttavia, sono ancora numerosi i sistemi che comprendono la presenza di insetti o patogeni dannosi per i quali soluzioni basate sul MRM potrebbero essere di estrema utilità, ma per i quali non esistono ancora conoscenze riguardanti la comunità microbica. Studi futuri che coinvolgano modelli non ancora esplorati potranno fornire ulteriori elementi verso lo sviluppo di strategie di lotta innovative.

RIASSUNTO

Le simbiosi microbiche negli insetti sono ampiamente diffuse in tutti gli ordini. Molte funzioni diverse sono svolte dalle comunità microbiche presenti in ospiti differenti, e ogni tipologia di associazione presenta caratteristiche particolari. I simbionti possono instaurare associazioni obbligate o facoltative con gli insetti; possono contribuire alla nutrizione dell'ospite, proteggerlo dalle avversità biotiche e abiotiche, o manipolarne la riproduzione per garantirsi una più ampia diffusione. L'influenza dei simbionti microbici nella biologia, nella fisiologia, nel comportamento e nell'evoluzione degli insetti può essere considerata come una risorsa che può essere sfruttata per la gestione di problematiche correlate agli insetti. A tal fine, è fondamentale l'identificazione di agenti microbici ottimali, dotati di un elevato potenziale per il controllo simbiotico. In agricoltura, applicazioni di lotta di notevole interesse sono state proposte contro la diffusione di insetti dannosi, come nel caso della mosca mediterranea della frutta *Bactrocera oleae* (Gmelin), o per il controllo di patogeni trasmessi da insetti, come l'agente della malattia di Pierce della vite, trasmesso dalla cicalina *Homalodisca vitripennis* (Germar). I simbionti microbici degli insetti possono rappresentare promettenti strumenti di lotta anche in altri modelli, tra cui i vettori di fitoplasmi, l'ape e i patogeni che la attaccano, o gli insetti nocivi di emergente interesse come *Drosophila suzukii* Matsumura.

BIBLIOGRAFIA

- ALMA A., DAFFONCHIO D., GONELLA E., RADDADI N., 2010 – *Microbial symbionts of Auchenorrhyncha transmitting phytoplasmas: a resource for symbiotic control of phytoplasmas*. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, Weintraub P. & Jones P. Ed., CAB International, Wallingford, UK, pp. 272-292.
- ARAKAKI N., MIYOSHI T., NODA H., 2001 – *Wolbachia-mediated parthenogenesis in the predatory thrips Frankliniella vespiformis (Thysanoptera: Insecta)*. - *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 1011-1016.
- ATTARDO G.M., LOHS C., HEDDI A., ALAM U.H., YILDIRIM S., AKSOY S., 2008 – *Analysis of milk gland structure and function in Glossina morsitans: milk protein production, symbiont populations and fecundity*. - *J. Insect Physiol.*, 54: 1236-1242.
- BAUMANN P., 2005 – *Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects*. - *Annu. Rev. Microbiol.*, 59: 155-189.
- BEXTINE B.R., LAUZON C., POTTER S.E., LAMPE D., MILLER T.A., 2004 – *Delivery of a genetically marked Alcaligenes sp. to the glassy winged sharpshooter for use in a paratransgenic control strategy*. - *Curr. Microbiol.*, 48: 327-331.
- BEXTINE B.R., LAMPE D., LAUZON C., JACKSON B., MILLER T.A., 2005 – *Establishment of a genetically marked insect-derived symbiont in multiple host plants*. - *Curr. Microbiol.*, 50: 1-7.
- BOURTZIS K., ROBINSON S., 2006 *Insect pest control using Wolbachia and/or radiation*. In: *Insect Symbiosis Vol. 2*, Bourtzis K. & Miller T.A. Ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 225-246.
- BREEUWER H., ROS V.I.D., GROT T.V.M., 2011 – *Cardinium: the next addition to the family of reproductive parasites*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zchori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 207-224.
- CALABRIA G., MÀCA J., BACHLI G., SERRA L., PASCUAL M., (2012) *First records of the potential pest species Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) in Europe*. - *J. Appl. Entomol.*, 136: 139-147.
- CAMEROTA C., RADDADI N., PIZZINAT A., GONELLA E., CROTTI E., TEDESCHI R., MOZES-DAUBE N., EMBER I., ACS Z., KOLBER M., ZCHORI-FEIN E., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2012 – *Incidence of 'Candidatus Liberibacter europaeus' and phytoplasmas in Cacopsylla species (Hemiptera: Psyllidae) and their host/shelter plants*. - *Phytoparasitica*, 40: 213-221.
- CHANDLER J.A., MORGAN LANG J., BHATNAGAR S., EISEN J.A., KOPP A., 2011 – *Bacterial communities of diverse Drosophila species: ecological context of a host-microbe model system*. - *Plos Genet.*, 7(9): e1002272.
- 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., VANENGELSDORP D., KALKSTEIN A. L., DRYSDALE A., HUI J., ZHAI J., CUIN L., HUTCHISON S. K., FREDRIK SIMONS J., EGHOLM M., PETTIS J. S., LIPKIN W. I., 2007 – *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*. - *Science*, 318: 283-287.
- CROTTI E., BALLOI A., HAMDI C., SANSONNO L., MARZORATI M., GONELLA E., FAVIA G., CHERIF F A., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D., 2012 *Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems*. *Microbial Biot.*, 5: 307-317.
- CROTTI E., DAMIANI C., PAJORO M., GONELLA E., RIZZI A., RICCI I., NEGRI I., SCUPPA P., ROSSI P., BALLARIN P., RADDADI N., MARZORATI M., SACCHI L., CLEMENTI E., GENCHI M., MANDRIOLI M., BANDI C., FAVIA G., ALMA A., DAFFONCHIO D., 2009 – *Asaia, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insect of phylogenetically distant genera and orders*. - *Environ. Microbiol.*, 11(12): 3252-3264.
- CROTTI E., GONELLA E., RICCI I., CLEMENTI E., MANDRIOLI M., SACCHI L., FAVIA G., ALMA A., BOURTZIS K., CHERIF F A., BANDI C., DAFFONCHIO D., 2011 – *Secondary symbionts of insects: acetic acid bacteria*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zchori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 45-72.
- DALE C., WANG B., MORAN N.A., OCHMAN H., 2003 – *Loss of DNA recombinational repair enzymes in the initial stages of genome degeneration*. - *Mol. Biol. Evol.*, 20: 1188-1194.

- DOUGLAS A.E., 2009 – *The microbial dimension in insect nutritional ecology*. - *Funct. Ecol.*, 23: 38-47.
- ENIGL M., SCHAUSBERGER P., 2007 – *Incidence of the endosymbionts Wolbachia, Cardinium and Spiroplasma in phytoseiid mites and associated prey*. - *Exp. Appl. Acarol.*, 42(2): 75-85.
- FELDHAAR H., 2011 – *Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts*. - *Ecol. Entomol.*, 36: 533-543.
- FORSQREN E., OLOFSSON T.C., VASQUEZ A., FRIES I., 2010 – *Novel lactic acid bacteria inhibiting Paenibacillus larvae in honey bee larvae*. - *Apidologie*, 41(1): 99-108.
- FUKATSU T., ISHIKAWA H., 1998 – *Differential immunohistochemical visualisation of the primary and secondary intracellular symbiotic bacteria of aphids*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1284-1291.
- FUKATSU T., HOSOKAWA T., KOGA R., NIKOH N., KATO T., HAYAMA S., TAKEFUSHI H., TANAKA I., 2009 – *Intestinal endocellular symbiotic bacterium of the macaque louse Pedicinus obtusus: distinct endosymbiont origins in anthropoid primate lice and the old world monkey louse*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 3796-3799.
- GIL R., SABATER-MUÑOZ B., LATORRE A., SILVA F.J., MOYA A., 2002 – *Extreme genome reduction in Buchnera spp.: toward the minimal genome needed for symbiotic life*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 4454-4458.
- GONELLA E., CROTTI E., RIZZI A., MANDRIOLI M., FAVIA G., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2012 – *Horizontal transmission of the symbiotic bacterium Asaia sp. in the leafhopper Scaphoideus titanus Ball (Hemiptera: Cicadellidae)*. - *BMC Microbiol.*, 12(Suppl 1): S4.
- GONELLA E., NEGRI I., MARZORATI M., MANDRIOLI M., SACCHI L., PAJORO M., CROTTI E., RIZZI A., CLEMENTI E., TEDESCHI R., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D., 2011 – *Bacterial endosymbiont localization in Hyalesthes obsoletus, the insect vector of Bois Noir in Vitis vinifera*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(4): 1423-1435.
- GOTTLIEB Y., GHANIM M., GUEGUEN G., 2008. – *Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies*. - *FASEB J.*, 22: 2591-2599.
- GOTTLIEB Y., PERLMAN S.J., CHIEL E., ZCHORI-FEIN E., 2011 – *Rickettsia get around*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zchori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp.191-206.
- GRASSI A., PALMIERI L., GIORGIO L., 2009 – *Nuovo fitofago per i piccoli frutti in Trentino*. - *Terra Trentina*, 10: 19-23.
- HAMBY K.A., HERNÁNDEZ A., BOUNDY-MILLS K., ZALOM F.G., 2012 – *Associations of Yeasts with Spotted-Wing Drosophila (Drosophila suzukii; Diptera: Drosophilidae) in Cherries and Raspberries*. - *Appl. Environ. Microbiol.* 78(14): 4869-4873.
- HAUSER M., GAIMARI S., DAMUS M., 2009 – *Drosophila suzukii new to North America*. - *FlyTimes*, 43: 12-15.
- HEDDI A., GROSS R., 2011 – *Proteobacteria as primary endosymbionts of arthropods*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zchori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 1-27.
- HEDGES L.M., BROWNLIE J.C., O'NEILL S.L., JOHNSON K.N., 2008 – *Wolbachia and virus protection in insects*. - *Science*, 322: 702.
- LEFÈVRE C., CHARLES H., VALLIER A., DELOBEL B., FARREL B., HEDDI A., 2004 – *Endosymbionts phylogenesis in the dryothoridae weevils: evidence for bacterial replacements*. - *Mol. Biol. Evol.*, 21: 965-973.
- LIADOUZE I., FEBVAY G., GUILLARD J., BONNOT G., 1996 – *Metabolic fate of energetic amino acids in the aposymbiotic pea aphid Acyrthosiphon pisum (Harris) (Homoptera: Aphididae)*. - *Symbiosis*, 21: 115-127.
- MARZORATI M., ALMA A., SACCHI L., PAJORO M., PALERMO S., BRUSETTI L., RADDADI N., BALLOI A., TEDESCHI R., CLEMENTI E., CORONA S., QUAGLINO F., BIANCO P.A., BENINATI T., BANDI C., DAFFONCHIO D., 2006 – *A novel Bacteroidetes symbiont is localized in Scaphoideus titanus, the insect vector of flavescence dorée in Vitis vinifera*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1467-1475.
- MCCUTCHEON J.P., MORAN N.A., 2010 – *Functional convergence in reduced genomes of bacterial symbionts spanning 200 My of evolution*. - *Genome Biol. Evol.*, 2: 708-718.
- MILLER T.A., LAUZON C., LAMPE D., DURVASULA R., MATTHEWS S., 2006 – *Paratransgenesis applied to control insect-transmitted plant pathogens: the Pierce's disease case*. In: *Insect Symbiosis*, Vol. 2, Bourtzis K. & Miller T.A. Ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 247-263.
- MIN K.-T., BENZER S., 1997 – *Wolbachia, normally a symbiont of Drosophila, can be virulent, causing degeneration and early death*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10792-10796.
- 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, 258-272.
- MOHR K.I., TEBBE C.C., 2007 – *Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees*. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 573-582.
- MONTENEGRO H., SOLFERINI V.N., KLACZKO L.B., HURST G.D.D., 2005 – *Male-killing Spiroplasma naturally infecting Drosophila melanogaster*. - *Insect Mol. Biol.*, 14(3): 281-287.
- MORAN N.A., TRAN P., GERARDO N.M., 2005a – *Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8802-8810.
- MORAN N.A., RUSSEL J.A., KOGA R., FUKATSU T., 2005b – *Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3302-3310.
- MOYA A., GIL R., LATORRE A., PERETÓ J., PILAR GARCILLÁN-BARCIA M., DE LA CRUZ F., 2009 – *Toward minimal bacterial cells: evolution vs. design*. - *FEMS Microbiol. Rev.*, 33: 225-235.
- NAKABACHI A., YAMASHITA A., TOH H., ISHIKAWA H., DUNBAR H.E., MORAN N.A., HATTORI M., 2006 – *The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont Carsonella*. - *Science*, 314: 267.
- NEGRI I., PELLECCIA M., MAZZOGLIO P.J., PATETTA A., ALMA A., 2006 – *Feminizing Wolbachia in Zyginidia pulula (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex-determination system*. - *Proc. R. Soc. B*, 273: 2409-2416.
- OLIVER, K.M., MORAN N.A., HUNTER M.S., 2005 – *Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 12795-12800.
- PAJORO M., MARZORATI M., NEGRI I., SACCHI L., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2008 – *Investigation on the life cycle of ST1-C, the endosymbiont of Scaphoideus titanus*. - *Bull. Insectol.*, 61(1): 217-218.
- RADDADI N., GONELLA E., CAMEROTA C., PIZZINAT A.,

- TEDESCHI R., CROTTI E., MANDRIOLI M., BIANCO P.A., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2011 – ‘*Candidatus Liberibacter europaeus*’ sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. – *Environ. Microbiol.*, 13(2): 414-426.
- ROH S.W., NAM Y.-D., CHANG H.-W., KIM K.-H., KIM M.-S., RYU J.-H., KIM S.-H., LEE W.-J., BAE J.-W., 2008 – *Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in Drosophila melanogaster*. – *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 6171-6177.
- ROSENBERG E., ZILBER-ROSENBERG I., 2011 – *Symbiosis and Development: The Hologenome Concept*. – *Birth Defects Res C*, 93: 56–66.
- RYU J.H., KIM S.H., LEE H.Y., BAI J.Y., NAM Y.D., BAE J.-W., LEE D.G., KIM J., LEE D., LEE W.J., 2008 – *Innate immune homeostasis by the homeobox gene Caudal and commensal-gut mutualism in Drosophila*. – *Science*, 319: 777-782.
- SACCHI L., GENCHI M., CLEMENTI E., BIGLIARDI E., AVANZATI A.M., PAJORO M., NEGRI I., MARZORATI M., GONELLA E., ALMA A., DAFFONCHIO D., BANDI C., 2008 *Multiple symbiosis in the leafhopper Scaphoideus titanus (Hemiptera: Cicadellidae): details of transovarial transmission of Cardinium sp. and yeast-like endosymbionts*. – *Tissue Cell*, 40: 231–242.
- SANDSTROM J.P., RUSSEL J.A., WHITE J.P., MORAN N.A., 2001 – *Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids*. – *Mol. Ecol.*, 10, 217-228.
- SASAKI-FUKATSU K., KOGA R., NIKOH N., YOSHIZAWA K., KASAI S., MIHARA M., KOBAYASHI M., TOMITA T., FUKATSU T., 2006 – *Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice*. – *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7349-7352.
- SCHNEIDER, D., MILLER W.J., RIEGLER M., 2011. – *Arthropod shopping for Wolbachia*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zcori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 149-174.
- SHIGENOBU S., WATANABE H., HATTORI M., SAKAKI Y., ISHIKAWA H., 2000. *Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS*. – *Nature*, 407: 81-86.
- SKINNER S.W., 1985 – *Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting sex ratios in the parasitoid wasp Nasonia vitripennis*. – *Genetics*, 109: 745-754.
- STOUTHAMER R., LUCK R.F., HAMILTON W.D., 1990 – *Antibiotics cause parthenogenetic Trichogramma (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex*. – *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87: 2424–2427.
- VAUTRIN E., CHARLES S., GENIEYS S., VAVRE F., 2007 – *Evolution and invasion dynamics of multiple infections with Wolbachia investigated using matrix based models*. – *J. Theor. Biol.*, 245: 197-209.
- VERSTRAETE, W., 2007 – *Microbial ecology and environmental biotechnology*. – *ISME J.*, 1: 1–4.
- VON DOHLEN C.D., KOHLER S., ALSOP S.T., MCMANUS W.R., 2001 – *Mealybug -proteobacterial endosymbionts contain -proteobacterial symbionts*. – *Nature*, 412: 433-436.
- WEEKS A.R., BREEUWER J.A., 2001 – *Wolbachia-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites*. – *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 2245–2251.
- WEISS B., AKSOY S., 2011 – *Microbiome influences on insect host vector competence*. – *Trends Parasitol.*, 27(11): 514-522.
- WERREN J.H., BALDO L., CLARK M.E., 2008 – *Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology*. – *Nature Rev. Microbiol.*, 6: 741-751.
- WILKINSON T.L., 2011 – *Facultative tenants from the Enterobacteriaceae within phloem-feeding insects*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zcori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 73-87.
- WU D., DAUGHERTY S.C., VAN AKEN S.E., PAI G.H., WATKINS K.L., KHOURI H., TALLON L.J., ZABORSKY J.M., DUNBAR H.E., TRAN P.L., MORAN N.A., EISEN J.A., 2006. – *Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters*. – *PLoS Biol.* 4: e188.
- ZABALOU S., APOSTOLAKI A., LIVADARAS I., FRANZ G., ROBINSON A.S., SAVAKIS C., BOURTZIS K., 2009 – *Incompatible insect technique: incompatible males from a Ceratitis capitata genetic sexing strain*. – *Entomol. Exp. Appl.*, 132(3): 232-240.
- ZABALOU, S., REIGLER, M., THEODORAKOPOULOU, M., STAUFFER, C., SAVAKIS, C. BOURTZIS, K., 2004 – *Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control*. – *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101: 15042–15045.

NUOVE PROSPETTIVE DI CONTROLLO MICROBIOLOGICO DEGLI INSETTI NOCIVI

LUCA RUIU (*) - IGNAZIO FLORIS (*)

(*) Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, lucaruiu@uniss.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbionti e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

New microbiological control perspectives against insect pests

Among the enormous variety of microorganisms associated to insects, numerous agents of disease, including fungi, bacteria, virus, protozoa, have been identified and studied. During the last decades, both the scientific community and industry worked mostly with *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), an entomopathogenic species characterized by the production of parasporal bodies containing specific insecticidal pore-forming endotoxins (Cry proteins). Due to the wide insecticidal potential variability of different *Bt* strains, in relation to the specificity between insect midgut receptors and activated Cry proteins, a large number of *cry* genes are continuously being identified and sequenced, and more genes continue to be discovered as new bacterial isolates are collected worldwide.

However, the use of microbial based biological control is still relegated to niche contexts, in relation to its narrow efficacy spectrum, to the highly specific mode of action and to the lack of truly transformational associated technologies. In this scenario, the recent discovery of other environmentally safe microbial insecticides is creating new opportunities for the management of certain insect pests. Significant is the recent introduction of a newly discovered strain of *Chromobacterium subtsugae* sp. Nov., an effective bacterium against a broader insect spectrum and showing a more complex mode of action. Significant is also the case of the recently discovered entomopathogen *Brevibacillus laterosporus*.

The availability of new "omics" biotechnologies allows to develop new molecular approaches leading to the discovery of new genes and toxins implicated in the bioinsecticidal action, thus generating new information on the insecticidal action and its molecular features and creating new biological control perspectives.

Key words: bioinsecticides, biological control, *Bt*, *Brevibacillus laterosporus*, *Chromobacterium subtsugae*.

La protezione e salvaguardia dell'ambiente insieme alla necessità di garantire il fabbisogno di sostentamento di una popolazione umana che si espande ad un tasso annuo stimato intorno al 1,15%, sono divenuti aspetti di importanza sempre crescente (United Nations Population Division of the Department of Economic and Social Affairs, May 3, 2011). L'implementazione di nuove tecniche agrarie e tecnologie per il contenimento degli insetti nocivi appare di primaria importanza per permettere agli agricoltori e allevatori di incrementare le produzioni agrarie e zootecniche su una superficie limitata, contenendo i potenziali danni causati dai parassiti (OERKE & DEHENE, 2004).

Questo giustifica la continua crescita registrata nel mercato degli agrofarmaci sia in termini economici che di varietà dei principi attivi disponibili. Con un valore stimato sui 47 miliardi di dollari a livello globale (BCC Research, 2010), il mercato attuale dei pesticidi si caratterizza per un incremento significativo (circa 15% per anno) del segmento dei biopesticidi (Global Industry Analysts, Inc., MCP-1573, Feb 2012).

Risultato, questo, legato anche al ritiro dal mer-

cato di numerosi agrofarmaci, al relativo costo per lo sviluppo di nuovi formulati sintetici ed ai nuovi regolamenti che riducono i livelli di residui (Maximum Residue Level, MRL) ammessi nei prodotti agrari e zootecnici. Infatti, lo scenario legislativo, favorisce lo sviluppo e la registrazione pre-commerciale di sostanze a minore impatto ambientale, ma efficaci per il controllo degli organismi nocivi (i.e. EC Regulation No. 1107/2009). Inoltre, l'uso del controllo integrato, o Integrated Pest Management (IPM), diviene obbligatorio dal 2014 su scala internazionale (EC Directive 2009/128).

Per far fronte alla necessità di ridurre l'impatto ambientale connesso con l'uso di diverse sostanze chimiche di vecchia generazione, la comunità scientifica, accademica e industriale, ha compiuto diversi sforzi negli ultimi decenni per lo sviluppo di alternative efficaci ed ecosostenibili. Fra queste, la scoperta e l'uso di specie microbiche entomopatogene come batteri, virus, protozoi, funghi, microsporidi, nematodi (VEGA & KAYA, 2012). Tipicamente, micopatogeni e nematodi agiscono penetrando attraverso la cuticola della vittima, mentre virus, batteri e protozoi attraverso l'intestino.

Fra le prime applicazioni significative, è doveroso ricordare quelle con il fungo entomopatogeno *Beauveria bassiana* già alla fine XIX secolo, la cui azione bioinsetticida si esplica in seguito al contatto dei suoi conidi con il tegumento dell'insetto bersaglio, sul quale, se le condizioni sono idonee, germinano e producono ife fungine che perforano la cuticola e invadono il corpo dell'insetto. Questa "azione meccanica" determina perdita di acqua e disidratazione della vittima, concorrendo a causarne la morte (PEKRUL & GRULA, 1979). Diverse specie fungine, sono poi state oggetto di sperimentazioni di controllo biologico nei confronti degli insetti. Fra queste, specie appartenenti ai generi *Achersonia*, *Agerata*, *Verticillium*, *Sphaerostilbe*, *Podonectria*, *Myriangiium*, *Hirsutella*, *Metarhizium*. Successi e insuccessi si sono nel tempo alternati, spesso in relazione al verificarsi di variabili condizioni ambientali (i.e. temperatura e umidità), fattori che regolano la germinazione dei conidi fungini (FAWCETT, 1944). Il potenziale dei batteri entomopatogeni nel controllo biologico storicamente è stato riconosciuto molto dopo, in seguito all'introduzione della specie *Bacillus popilliae* contro il coleottero giapponese *Popillia japonica* (STEINHAUS, 1975). Il paradigma del controllo microbiologico, si è poi evoluto radicalmente con la scoperta di nuovi ceppi di *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) attivi nei confronti di specifici insetti e che si sono dimostrati competitivi con gli insetticidi chimici in termini di costo e performance. Il ceppo HD-1, della sierovarietà *kurstaki* (DE BARJAC & LEMILLE, 1970), è così divenuto il punto di riferimento per il controllo biologico dei lepidotteri in ambito agrario e forestale, oggi affiancato da altri ceppi commercialmente disponibili come SA-11 ed EG2348, quest'ultimo ottenuto attraverso un processo naturale di coniugazione che garantisce l'espressione di un range di diverse entomotossine e una conseguente elevata efficacia insetticida. La successiva scoperta di un ceppo di *Bt* appartenente alla sierovarietà *israelensis* (*Bti*) divenne fondamentale per il controllo microbico di ditteri nematoceri, ed in particolare di zanzare e simuli (GOLDBERG & MARGALIT, 1977). In seguito, viene individuato un ceppo attivo nei confronti di coleotteri, appartenente alla sierovarietà *tenebrionis* (KRIEG *et al.*, 1983).

Fra i batteri entomopatogeni, il *Bt* è certamente la specie più studiata e rappresentata da centinaia di ceppi differenti. Si tratta di un microrganismo ubiquitario che si può facilmente isolare dal suolo e dal filloplano. Può inoltre essere isolato da insetti. Il ciclo biologico di *Bt* è caratterizzato da una fase di divisione vegetativa esponenziale seguita, in condizioni di stress nutrizionale, da una fase stazionaria semi-quiescente o di sporulazione. Durante la sporulazione, nel citoplasma dello spo-

rangio batterico vengono prodotte una o più inclusioni parasporali cristalline, che rappresentano il principale componente insetticida. Tali inclusioni cristalline, contengono le δ -endotossine, proteine responsabili della tossicità verso differenti insetti. Le proteine contenute in tali "cristalli" costituiscono circa il 20-30 % dell'insieme delle proteine presenti in fase di sporulazione. Le proteine dei cristalli, anche dette tossine Cry, sono protossine monomeriche che variano da un ceppo di *Bt* all'altro. Inoltre, differenti tossine Cry variano nella loro attività contro differenti insetti. Anche forma, dimensione e localizzazione cellulare dei cristalli sono ceppo specifiche (DE MAAGD *et al.*, 2003).

Così ad esempio *Bt* var. *finitimus* produce una o due inclusioni associate all'esosporio, mentre nella generalità dei casi le inclusioni parasporali sono localizzate nel citoplasma dello sporangio al di fuori dell'esosporio. Le protossine nel cristallo sono legate mediante ponti disolfuro tra le estremità C-terminali. Una volta ingerite dall'insetto, queste vengono solubilizzate nell'intestino e sotto l'azione di proteasi danno origine alle tossine attive. Questo processo è alla base della specificità del meccanismo di azione sugli insetti. Lo studio della struttura atomica delle tossine Cry (LI *et al.*, 1991) ha portato alla identificazione di tre domini. Il Dominio I (N-terminale) si pensa si inserisca nella membrana delle cellule epiteliali dell'intestino medio degli insetti causando la formazione di un poro; il Dominio II rappresenta la regione maggiormente variabile che si lega a recettori dell'epitelio e determina la specificità della tossina; il Dominio III contiene la regione conservata C-terminale che si pensa dia stabilità alla struttura proteica e potrebbe anche giocare un ruolo nella specificità del legame recettore-tossina (PIGOTT & ELLAR, 2007). Inoltre, qualche ceppo di *Bt* produce delle proteine citolitiche, anche dette tossine Cyt, incluse nel corpo parasporale. La prima tossina Cyt (Cyt A) caratterizzata, è prodotta da *Bt* var. *israelensis* (*Bti*). Attualmente, sono note differenti classi di citolisine (Cyt A, B e C), proteine di 25-28 kDa (LI *et al.*, 1996). I geni codificanti le δ -endotossine sono normalmente localizzati su plasmidi che contengono più di un gene codificante per tossina. Oltre alle δ -endotossine, diversi ceppi di *Bt* hanno l'abilità di produrre altre tossine, durante la fase di crescita vegetativa o durante la sporulazione. Una nuova classe di tossine prodotte dal *Bt*, vegetative insecticidal proteins (VIP), è stata recentemente scoperta. Si tratta di molecole espresse durante la fase vegetativa e che presentano un più ampio spettro di azione insetticida.

Nonostante il successo di differenti prodotti,

l'impiego del controllo microbiologico è ancora relegato a contesti di nicchia, in relazione al meccanismo di azione spesso molto specifico. Tuttavia, si stima un futuro incremento nell'impiego dei bioinsetticidi, in combinazione o rotazione con gli insetticidi sintetici. Ma, ulteriori studi e ricerche sono necessari per sviluppare soluzioni innovative che possano rispondere alle richieste degli utilizzatori finali e del legislatore in termini sia di efficacia che di sostenibilità ambientale. Al presente stato dell'arte, i bioinsetticidi non hanno ancora raggiunto il loro potenziale a causa della mancanza di tecnologie ad essi associate che ne incrementino l'efficacia (GLARE *et al.*, 2012). Con questa prospettiva, nuovi microrganismi entomopatogeni sono stati scoperti e caratterizzati. Fra questi, è significativo il caso della nuova specie batterica *Chromobacterium subtsugae* sp. Nov. che manifesta un'azione sia per ingestione che per contatto a più ampio spettro e che colpisce sia gli insetti con apparato boccale masticatore (es. coleotteri, lepidotteri) che i fitomizi (es. eterotteri) e gli acari (MARTIN *et al.*, 2007).

Significativo anche il caso del batterio entomopatogeno *Brevibacillus laterosporus*, caratterizzato dalla proprietà di produrre un tipico corpo parasporale lamellare a forma di canoa attaccato ad un lato della spora. Si tratta di una specie originariamente isolata in acqua (LAUBACH, 1916), nel suolo e nelle api (MCCRAY, 1917). Più di recente, le sue proprietà insetticide sono state dimostrate nei confronti di larve di zanzare (*Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*) e *Simulium vittatum* (FAVRET & YOUSTEN, 1985; RIVERS *et al.*, 1991), larve di Coleotteri e Lepidotteri, ed anche nei confronti di Nematodi e Molluschi (SINGER, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2004). In alcuni ceppi di *B. laterosporus* è inoltre stata osservata la produzione di inclusioni parasporali simili a quelle prodotte da *B. thuringiensis* (SMIRNOVA *et al.*, 1996). Entomotossine proteiche prodotte da *B. laterosporus* sono state recentemente identificate per il controllo di nematodi parassiti e di coleotteri dannosi alle piante (BONE *et al.*, 1991; BOETS *et al.*, 2004) nonché nei confronti di *Musca domestica* (RUIU *et al.*, 2006 e 2007a). L'impiego di *B. laterosporus* è stato sperimentato anche in condizioni di campo sui substrati di sviluppo larvale in aziende zootecniche (RUIU *et al.*, 2008 e 2011). È stata inoltre messa in evidenza la sua compatibilità con l'entomofauna utile non-target (RUIU *et al.*, 2007b e c). Anche nel caso di *B. laterosporus*, similamente a quanto osservato per *B. thuringiensis* (LACEY & FEDERICI, 1979; KNOWLES & ELLAR, 1987; LANE *et al.*, 1989), dopo l'ingestione, l'azione biotossica determina effetti istopatologici sull'intestino medio di mos-

che trattate che includono il progressivo disfacimento dell'epitelio intestinale, con distruzione dei microvilli, vacuolizzazione del reticolo endoplasmatico, degenerazione mitocondriale, aumento di strutture simili a lisosomi, perdita di ribosomi, disorganizzazione del reticolo endoplasmatico rugoso, deterioramento della tunica muscolare con i relativi tessuti connettivi ed infine lisi cellulare (RUIU *et al.*, 2012).

L'avvento delle nuove biotecnologie "omiche", come la genomica e la proteomica, consente di chiarire il ruolo di diverse molecole implicate nell'azione insetticida e i loro livelli di espressione nei microrganismi entomopatogeni. Anche se ancora molto resta da capire, questo approccio molecolare sta permettendo di studiare più nel dettaglio i meccanismi molecolari che sottendono l'azione insetticida non solo di nuovi agenti entomopatogeni, ma anche di quelli noti da tempo e per i quali i meccanismi di azione non sono del tutto compresi, come per l'ascomicete *B. bassiana*. In questo caso, il recente sequenziamento dell'intero genoma ha portato a ipotizzare un percorso evolutivo convergente verso la patogenicità nei confronti degli insetti, mettendo in luce numerosi geni di virulenza specie-specifici (XIAO *et al.*, 2012).

Il moderno approccio allo studio sta generando informazioni e strumenti innovativi che aprono nuove frontiere per l'impiego con successo di "nuovi" e "vecchi" agenti entomopatogeni in programmi di controllo integrato di diversi insetti nocivi.

RIASSUNTO

Nell'ambito dei numerosi microrganismi associati agli insetti, diversi studi sono stati dedicati agli agenti entomopatogeni tra cui funghi, batteri, virus, protozoi. Durante gli ultimi decenni, la comunità scientifica e l'industria hanno lavorato principalmente con *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), una specie entomopatogena che si caratterizza per la produzione di corpi parasporali contenenti specifiche entomotossine (proteine Cry). A causa dell'ampia variabilità insetticida tra differenti ceppi di *Bt*, legata alla specificità recettore intestinale-proteina Cry, un ampio numero di geni *cry* sono continuamente identificati e sequenziati in tutto il mondo, facendo seguito a nuovi isolamenti e lavori di caratterizzazione molecolare.

Tuttavia, l'impiego del controllo microbiologico è ancora limitato a contesti di nicchia, in relazione al ristretto spettro di azione dei bioinsetticidi disponibili, alla loro elevata specificità e alla mancanza di tecnologie associate che ne amplifichino l'effetto.

In questo scenario, la recente scoperta di altri insetticidi microbici a basso impatto ambientale sta aprendo nuove prospettive per il controllo biologico di diversi insetti nocivi. Significativa è la recente introduzione di un nuovo ceppo di *Chromobacterium subtsugae* sp. Nov., un batterio efficace contro un ampio spettro di insetti che mostra un meccanismo di azione più complesso. Rilevante anche il

caso di *Brevibacillus laterosporus*, batterio entomopatogeno recentemente scoperto.

La disponibilità delle moderne biotecnologie “omiche” permette lo sviluppo di nuovi approcci molecolari che stanno conducendo alla scoperta di nuovi geni e tossine di origine microbica implicati nei meccanismi bioinsetticidi, così generando preziose informazioni che consentono di ottimizzare il loro impiego nel controllo biologico e creare nuove prospettive di difesa eco-compatibile.

BIBLIOGRAFIA

- DE BARJAC H., LEMILLE F., 1970 – *Presence of flagellar antigenic subfactors in Serotype 3 of Bacillus thuringiensis*. - J. Invertebr. Pathol., 15: 139-140.
- BOETS A., ARNAUT G., VAN RIE J., DAMME N., 2004 – United States Patent Class 800279000.
- BONE W., SINGER S., 1991 – United States Patent No. 5,045,314
- DE MAAGD R.A., BRAVO A., BERRY C., CRICKMORE N., SCHNEPF H.E., 2003 – *Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria*. - Annu. Rev. Genet., 37: 409-433.
- FAVRET E.M., YOSTEN A.A., 1985 – *Insecticidal activity of Bacillus laterosporus*. - J. Invertebr. Pathol., 45: 195-203.
- FAWCETT H.S., 1944 – *Fungus and bacterial diseases of insects as factors in biological control*. - Bot. Rev., 10: 327-348.
- GLARE T., CARADUS J., GELERNTER W., JACKSON T., KEYHANI N., KOHL J., MARRONE P., MORIN L., STEWART A., 2012 – *Have biopesticides come of age?* - Trends Biotechnol., 30: 250-258.
- GOLDBERG L.J., MARGALIT J., 1977 – *A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti and Culex pipiens*. - Mosquito News 37: 355-358.
- KNOWLES B.H., ELLAR D.J., 1987 – *Colloid-osmotic is a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins with different insect specificity*. - Biochim. Biophys. Acta, 924: 509-518.
- KRIEG A., HUGER A.M., LANGENBRUCH G.A., SCHNETTER W., 1983 – *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera*. - J. Appl. Entomol., 96: 500-508.
- LACEY L.A., FEDERICI B.A., 1979 – *Pathogenesis and midgut histopathology of Bacillus thuringiensis in Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae)*. - J. Invertebr. Pathol., 33: 171-182.
- LANE N.J., HARRISON J.B., LEE W.M., 1989 – *Changes in microvilli and golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial delta-endotoxin*. - J. Cell Sci., 93: 337-347.
- LAUBACH A.C., 1916 – *Studies on aerobic, sporebearing, non pathogenic bacteria. Spore bearing organism in water*. - J. Bacteriol., 1: 505-512.
- LI J., CARROL J., ELLAR D.J., 1991 – *Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from Bacillus thuringiensis at 2.5 Å resolution*. - Nature, 353: 815-821.
- LI J., KONI P.A., ELLAR D.J., 1996 – *Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin cytB from Bacillus thuringiensis sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation*. - J. Mol. Biol., 257: 129-152.
- MARTIN P.A.W., HIROSE E., ALDRICH J.R., 2007 – *Toxicity of Chromobacterium subsugae to southern sink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)*. - J. Econ. Entomol., 100: 680-684.
- MCCRAY A.H., 1917 – *Spore-forming bacteria in the apiary*. - J. Agricult. Res., 8: 399-420.
- OERKE E.C., DEHNE H.W., 2004 – *Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection*. - Crop Protection, 23: 275-285.
- OLIVEIRA E.J., RABINOVITCH L., MONNERAT R.G., PASSOS L.K., ZAHNER V., 2004 – *Molecular characterization of Brevibacillus laterosporus and its potential use in biological control*. - Appl. Environ. Microbiol., 70: 6657-6664.
- PEKRUL S., GRULA E.A., 1979 – *Mode of infection of the corn earworm (Heliothis zea) by Beauveria bassiana as revealed by scanning electron microscopy*. - J. Invertebr. Pathol., 34: 238-247.
- PIGOTT C.R., ELLAR D.J., 2007 – *Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity*. Microbiol. - Mol. Biol. Rev., 71: 255-281
- RIVERS D.B., VANN C.N., ZIMMACK H.L., DEAN D.H., 1991 – *Mosquitocidal Activity of Bacillus laterosporus*. - J. Invertebr. Pathol., 58: 444-447.
- RUIU L., DELRIO G., ELLAR D. J., FLORIS I., PAGLIETTI B., RUBINO S., SATTÀ A., 2006 – *Lethal and sublethal effects of Brevibacillus laterosporus on the housefly (Musca domestica)*. - Entomol. Exp. Appl., 118: 137-144.
- RUIU L., FLORIS I., SATTÀ A., ELLAR D. J., 2007a – *Toxicity of a Brevibacillus laterosporus strain lacking parasporal crystals against Musca domestica and Aedes aegypti*. - Biol. Control, 43: 136-143.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2007b – *Susceptibility of the house fly pupal parasitoid Muscidifurax raptor (Hymenoptera: Pteromalidae) to the entomopathogenic bacteria Bacillus thuringiensis and Brevibacillus laterosporus*. Biol. Control, 43: 188-194.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2007c – *Susceptibility of the honeybee (Apis mellifera L.) to entomopathogenic bacterial toxins used for the biological control*. - Redia, 15: 105-108.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2008 – *Immature house fly (Musca domestica) control in breeding sites with a new Brevibacillus laterosporus formulation*. - Environ. Entomol., 37: 505-509.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2011 – *Comparative applications of Azadirachtin- and Brevibacillus laterosporus-based formulations for house fly management experiments in dairy farms*. - J. Med. Entomol., 48: 345-350.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2012 – *Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after Brevibacillus laterosporus ingestion*. - J. Invertebr. Pathol., 111: 211-216.
- SINGER S., 1996 – *The utility of morphological group II Bacillus*. - Adv. Appl. Microbiol., 42: 219-261.
- SMIRNOVA T.A., MINENKOVA I.B., ORLOVA M.V., LECADET M.M., AZIZBEKYAN R.R., 1996 – *The crystal-forming strains of Bacillus laterosporus*. - Res. Microbiol., 147: 343-350.
- STEINHAUS E.A., 1975 – *Disease in a minor chord*. - Ohio State University Press. Columbus, 488 pp.
- VEGA F.E., KAYA H.K., 2012 – *Insect Pathology*. - Second Edition, Elsevier Inc., 512 pp.
- XIAO G., YING S., ZHENG P., WANG Z.L., ZHANG S., XIE X.Q., SHANG Y., LEGER R.J., ZHAO G.P., WANG C., FENG M.G., 2012 – *Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity of Beauveria bassiana*. - Sci. Rep., 2: 483 DOI: 10.1038/srep00483

L'INTESTINO MEDIO DEGLI INSETTI: BERSAGLIO E BARRIERA DEI BIOINSETTICIDI

MORENA CASARTELLI (*)

(*) Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, via Celoria 26, 20133 Milano; morena.casartelli@unimi.it
Lettura tenuta durante la Tavola rotonda "Antagonisti, simbionti e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

The insect midgut: target and barrier for bioinsecticides

Sustainable agriculture aims at limiting the employment of chemical compounds for pest control and promotes the adoption of bioinsecticides, environmentally-safe molecules of natural origin which have high specificity against pests and thus harmless for non-target organisms. In recent decades a variety of biocontrol methods employing peptidic or proteinaceous insect-specific toxins derived from microorganisms, plants, insects or insect enemies have been examined in the laboratory and field. The insect midgut represents a target of orally administered bioinsecticides or, if the compounds have an hemocelic target, it represents the barrier that has to be crossed to exert their activity. At present, proteins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) are the active ingredient in the most widely used biopesticides. Bt toxins target receptors located on the apical membranes of the midgut cells of susceptible insects where they form pores that lead to cell osmotic shock and, consequently, to the death of the insect for starvation and septicemia. By contrast, bioinsecticides which target hemocelic receptors have to cross unaltered the midgut barrier, constituted by the peritrophic membrane and the midgut epithelium. The latter can be crossed through the transcellular and/or the paracellular route. During the last years, the study of the functional features of these two pathways shed light on the mechanisms involved in peptide and protein transport across the insect midgut epithelium and opened new perspectives for the design of appropriate strategies to increase their absorption.

Key words: Bt toxins; plant lectins; protein and peptide absorption; transcellular and paracellular route.

L'agricoltura moderna deve integrare al meglio le esigenze di produttività e di redditività delle aziende con quelle di sicurezza degli alimenti, rispetto della natura e della biodiversità. Per raggiungere questo obiettivo è importante sviluppare nuove strategie per il controllo degli insetti dannosi che permettano la riduzione dell'utilizzo degli insetticidi chimici di sintesi. Queste sostanze, infatti, sebbene abbiamo significativamente ridotto i danni causati dai fitofagi e siano oggi molto meno tossiche rispetto ai prodotti del passato, presentano ancora alcune caratteristiche negative, come l'azione ad ampio spettro e la possibilità di sviluppo di ceppi di insetti resistenti (WHETSTONE e HAMMOCK, 2007). Per questa ragione numerosi gruppi di ricerca sono oggi impegnati nell'individuazione di nuove strategie di controllo degli insetti dannosi ed in particolare nell'identificazione di molecole di origine naturale ad attività insetticida. L'interesse è rivolto all'individuazione di proteine e peptidi prodotti da virus, batteri, funghi, piante, insetti o loro nemici naturali, come parassitoidi e predatori, in grado di interferire con i complessi processi fisiologici di questa classe di Artropodi (BALE *et al.*, 2008; DAYAN *et al.*, 2009; WHETSTONE e HAMMOCK, 2007). Parallelamente,

gli studi sono anche rivolti all'individuazione dell'appropriato metodo di somministrazione affinché le molecole ad attività insetticida possano raggiungere in forma attiva i loro target (WHETSTONE e HAMMOCK, 2007).

I bioinsetticidi somministrati oralmente raggiungono il lume intestinale dove entrano in contatto con la barriera intestinale, costituita dalla membrana peritrofica e dall'epitelio intestinale. La membrana peritrofica è una sottile lamina acellulare costituita da una maglia di microfibrille di chitina a cui sono associate proteine, glicoproteine e proteoglicani. Essa avvolge il contenuto intestinale separando così lo spazio endoperitrofico da quello ectoperitrofico, a diretto contatto con la membrana apicale delle cellule intestinali, e rappresenta un'importante barriera al passaggio di patogeni e macromolecole potenzialmente tossiche (LEHANE, 1997). L'epitelio intestinale è deputato alla produzione di enzimi digestivi (TERRA e FERREIRA, 1994) e all'assorbimento delle sostanze nutritive (GIORDANA *et al.*, 1998). Le cellule che svolgono queste fondamentali funzioni sono le cellule colonnari. Esse sono cellule polarizzate che presentano la membrana apicale, ossia quella rivolta verso il lume, ripiegata a formare un orletto

a spazzola. Nello stadio larvale dei Lepidotteri, accanto a questo tipo cellulare, si possono osservare anche le cellule a coppa, che conferiscono all'epitelio intestinale peculiari caratteristiche funzionali (GIORDANA *et al.*, 1998).

Considerato il fondamentale ruolo fisiologico svolto dall'epitelio intestinale, esso rappresenta un possibile bersaglio per i bioinsetticidi, oppure la barriera che deve essere superata affinché le molecole ad attività tossica con target emocelico possano esercitare la loro azione. Sebbene da diverso tempo ci siano evidenze che proteine e peptidi possano superare intatti la barriera intestinale di insetto (JEFFERS e ROE, 2008), solo recentemente sono stati compiuti approfonditi studi per indagare i meccanismi fisiologici coinvolti nell'assorbimento di queste macromolecole nell'intestino di insetto (CASARTELLI *et al.*, 2005; 2007; 2008; FIAN-DRA *et al.*, 2009). Queste ricerche sono di fondamentale importanza per individuare adeguati metodi di somministrazione dei bioinsetticidi di natura proteica con target emocelico e per mettere a punto opportune strategie per aumentarne il passaggio attraverso la barriera intestinale, affinché possano raggiungere i target emocelici in quantità sufficiente per esercitare la loro attività tossica (FIANDRA *et al.*, 2010).

Attualmente, dell'intero mercato degli insetticidi, i bioinsetticidi rappresentano solo circa il 3 %, di cui più del 90 % è costituito da tossine del *Bacillus thuringiensis* (Bt); esse rappresentano quindi la principale alternativa naturale agli insetticidi chimici di sintesi. *B. thuringiensis* è un batterio Gram positivo aerobio che durante la fase di sporulazione produce inclusioni cristalline formate da proteine ad attività insetticida: le tossine Cry e le tossine Cyt. Queste δ -endotossine sono altamente specifiche per gli insetti target (Lepidotteri, Coleotteri e Ditteri), non presentano tossicità nei confronti di vertebrati e piante e sono completamente biodegradabili. Rappresentano quindi una valida alternativa per il controllo degli insetti dannosi in agricoltura e degli insetti vettori di malattie. Queste proteine hanno la capacità di inserirsi nel dominio apicale della membrana plasmatica delle cellule assorbenti intestinali dell'insetto target e di formare un poro (BRAVO *et al.*, 2011). Le numerose tossine fino ad oggi identificate (più di 500) sono state classificate sulla base della sequenza amminoacidica primaria in più di 60 gruppi e sulla base del possibile meccanismo d'azione in 4 famiglie (BRAVO *et al.*, 2011). La più numerosa è rappresentata dalla famiglia di tossine Cry con tre domini (3d-Cry) (circa 40 gruppi, più di 200 tossine). Le tossine appartenenti a questa famiglia hanno una struttura tridimensionale organizzata in tre domini. Il dominio I è implica-

to nell'oligomerizzazione della tossina, nell'inserzione in membrana e nella formazione del poro; i domini II e III sono invece coinvolti nel riconoscimento di specifiche proteine presenti a livello della membrana apicale delle cellule assorbenti intestinali che fungono da recettori per la tossina. Questi due domini sono quindi i responsabili della specie-specificità delle differenti tossine (BRAVO *et al.*, 2011). Il meccanismo d'azione proposto per le tossine attive contro i Lepidotteri prevede differenti step, qui di seguito brevemente riassunti (BRAVO *et al.*, 2011):

- le inclusioni cristalline ingerite dalla larva vengono solubilizzate nel lume intestinale, un ambiente con condizioni fortemente riducenti e con pH fortemente alcalino;
- nel lume intestinale vengono così liberate le protossine, ossia la forma inattiva delle tossine, che vengono attivate mediante taglio proteolitico ad opera delle proteasi intestinali;
- la tossina in forma monomerica si lega a proteine presenti sulla membrana apicale delle cellule assorbenti, definite recettori primari. Nel caso delle tossine Cry1A, attive contro numerosi Lepidotteri, i recettori primari sono proteine appartenenti alla famiglia delle caderine. È stato recentemente dimostrato che anche nel caso di insetti appartenenti all'ordine dei Ditteri e dei Coleotteri le caderine fungono da recettore primario;
- il legame con il recettore primario rende possibile un ulteriore taglio proteolitico della tossina che porta all'eliminazione di un breve peptide all'estremità N-terminale della proteina, ossia quello che corrisponde all' α -elica 1 del dominio I;
- questo taglio proteolitico induce la formazione di strutture oligomeriche che mostrano elevata affinità per i recettori secondari, proteine ancorate alla membrana apicale delle cellule assorbenti mediante un residuo di glicosilfosfatidilinositolo (GPI-anchored proteins). Tra i recettori secondari identificati nei Lepidotteri e nei Ditteri possiamo ricordare l'aminopeptidasi N e la fosfatasi alcalina; recentemente è stato dimostrato che quest'ultimo enzima funge da recettore anche nei Coleotteri;
- in seguito al legame con i recettori secondari, gli oligomeri si inseriscono nella membrana apicale delle cellule assorbenti a livello dei microdomini di membrana (zattere lipidiche o lipid rafts) dove sono espressi gli stessi recettori secondari, con la conseguente formazione di pori selettivi per gli ioni potassio;
- questi pori causano un grave shock osmotico nelle cellule intestinali, che determina la loro rottura e infine la morte dell'insetto.

Sebbene il meccanismo d'azione delle tossine Cry sia stato descritto in dettaglio solo nei Lepidotteri, l'identificazione degli stessi recettori nei 3 differenti ordini di insetto sensibili alle tossine Bt e il fatto che quelle attive nei confronti di questi insetti appartengano tutte alla famiglia di tossine Cry con tre domini suggeriscono che il meccanismo d'azione di queste tossine sia lo stesso nei 3 ordini (BRAVO *et al.*, 2011).

È stato proposto un modello alternativo per spiegare la tossicità delle tossine Cry (ZHANG *et al.*, 2006). Questo modello prevede che l'interazione delle tossine 3d-Cry in forma monomerica con il recettore primario attivi una cascata del segnale intracellulare: l'interazione della tossina con la caderina attiva una proteina G che a sua volta attiva l'enzima adenilato ciclasi con il conseguente aumento della concentrazione intracellulare di cAMP. Gli aumentati livelli di cAMP attivano la proteina chinasi A, che avvia un pathway intracellulare del segnale che porta alla destabilizzazione del citoscheletro e all'alterazione dell'attività di specifici canali di membrana: la perdita dell'integrità strutturale e funzionale della cellula innesca processi di morte cellulare. Questo modello prevede che la morte delle cellule di insetto avvenga senza l'interazione della tossina con il recettore secondario, quindi senza la formazione della struttura oligomerica della tossina e la conseguente formazione del poro. Occorre però precisare che l'elaborazione di questo modello deriva da studi eseguiti *in vitro*, su cellule di insetto in coltura (cellule High Five di ovario di *Tricoplusia ni*) esprimenti il gene eterologo della caderina che in *Manduca sexta* funge da recettore primario per la Cry1Ab, la tossina utilizzata per questo studio, quindi cellule che non sono il naturale target della tossina. Inoltre, ad oggi, non ci sono evidenze sperimentali che dimostrino il coinvolgimento di questo meccanismo nella morte delle cellule dell'intestino larvale *in vivo*. Oltre a ciò, dati sperimentali indicano che l'interazione tra il recettore primario e le tossine non può essere l'unico evento responsabile della morte dell'insetto. Sono state infatti prodotte delle tossine modificate, denominate tossine CryMod, che mancano dell' α -elica 1 del dominio I, ossia di quella breve sequenza amminoacidica che viene eliminata in seguito a taglio proteolitico dopo l'interazione della tossina con il recettore primario. Queste tossine mostrano attività tossica inalterata nei confronti di larve che hanno sviluppato resistenza perché presentano il recettore primario mutato e quindi incapace di legare la tossina (SOBERON *et al.*, 2007); questa evidenza è una chiara indicazione che, come precedentemente detto, l'interazione tra

questo recettore e le tossine non può essere l'unico evento responsabile della morte dell'insetto.

Numerosi sono i prodotti a base di Bt oggi utilizzati per il controllo degli insetti dannosi per l'agricoltura e contro differenti specie di Ditteri. Essi sono rappresentati da formulati a base di spore e cristalli o da piante transgeniche esprimenti tossine Bt. Quest'ultimo metodo di somministrazione si è dimostrato particolarmente efficace perché nella pianta transgenica la tossina è espressa in modo continuo ed è protetta dalle radiazioni solari a cui è sensibile. Il principale problema legato all'utilizzo dei prodotti a base di Bt, specialmente nel caso delle piante geneticamente modificate, è determinato dallo sviluppo di resistenza, che dipende in primo luogo dall'insorgenza di mutazioni che interferiscono con il meccanismo d'azione delle tossine. Queste mutazioni possono portare ad alterazioni nel processo di attivazione delle tossine o ad alterazioni nei recettori che hanno come conseguenza una riduzione del binding alle membrane apicali delle cellule intestinali (BRAVO *et al.*, 2011). Differenti sono le strategie messe in atto per ritardare o limitare l'insorgenza di resistenza quando si utilizzano piante geneticamente modificate; le più comuni ed efficaci sono la creazione di aree rifugio o la produzione di piante Bt esprimenti differenti tossine attive contro una determinata specie di insetto che abbiano recettori differenti (BRAVO *et al.*, 2011). Diverse sono anche le strategie per aumentare l'attività tossica delle proteine Cry, riassunte in una recente review (PARDO-LOPEZ *et al.*, 2009). È stato ad esempio dimostrato che la somministrazione combinata di tossine Cry e chitinasi, enzimi in grado di alterare la maglia di chitina della membrana peritrofica, a larve di *Spodoptera littoralis* e *Helicoverpa armigera* determina un sensibile aumento dell'efficacia del bioinsetticida. Il maggiore effetto larvicida è probabilmente da imputare ad un aumento della permeabilità della tossina attraverso la membrana peritrofica e quindi ad un maggior numero di proteine Cry che possono raggiungere la membrana apicale delle cellule colonnari dove sono collocati i recettori. È stato anche dimostrato che numerosi inibitori delle serin proteasi, somministrati ad una concentrazione molto inferiore a quella tossica in combinazione con le tossine Cry, ne potenziano l'attività insetticida, probabilmente perché riducono la degradazione delle stesse tossine Cry ad opera di specifiche proteasi intestinali. Nel caso di tossine Cry attive contro i Ditteri, è stato osservato che la somministrazione combinata con proteine Cyt determina un aumento della loro attività tossica e la soppressione della resistenza in popolazioni di *Culex quinquefasciatus* resistenti alle tossine

Cry. E' bene ricordare che le tossine Cyt sono proteine con attività citolitica prodotte da alcuni ceppi di *B. thuringiensis*, in particolare da quelli che mostrano attività insetticida contro i Ditteri. Esse hanno la capacità di formare pori nelle membrane, ma non hanno nessuna relazione filogenetica con le tossine Cry. Le proteine Cyt non si legano a recettori proteici presenti nella membrana, ma interagiscono direttamente con i lipidi di membrana, inserendosi nel doppio stato fosfolipidico e formando un poro o distruggendo l'organizzazione del doppio strato lipidico con un meccanismo simile a quello dei detergenti. Per quanto riguarda la sinergia tra alcune proteine Cry attive contro i Ditteri e le tossine Cyt o la capacità di queste ultime di bypassare la resistenza in popolazioni di larve di zanzara che hanno sviluppato resistenza alle tossine Cry, il meccanismo proposto è il seguente: le tossine Cyt si inseriscono nella membrana apicale delle cellule assorbenti intestinali ed espongono regioni che vengono riconosciute dalle proteine Cry; le proteine Cyt possono così fungere da recettore per le tossine Cry, facilitando l'oligomerizzazione e la formazione del poro. L'attività tossica delle proteine Cry è stata potenziata anche somministrando oralmente a larve di lepidottero la tossina in combinazione con frammenti di caderina denominati CR12-MPED che, oltre ad essere in grado di legare la tossina, hanno la capacità di inserirsi nella membrana apicale delle cellule intestinali. L'effetto sinergico con le tossine Cry è determinato, come nel caso delle proteine Cyt, dall'aumento del numero dei siti di binding per la tossina a livello dell'orletto a spazzola. Ciò promuove l'oligomerizzazione della tossina e quindi aumenta la probabilità che le proteine Cry interagiscano con i recettori secondari. Tra le strategie per aumentare l'attività tossica delle proteine Cry vanno infine ricordate modificazioni nei geni che codificano per le tossine stesse, come ad esempio: a) l'introduzione di specifici siti di taglio proteolitico intramolecolari per migliorare il processo di attivazione e, di conseguenza, aumentare il binding ai recettori di membrana; b) la creazione di tossine ibride che presentino attività tossica nei confronti di un più ampio spettro di insetti o maggiore entomopatogenicità rispetto alle tossine parentali da cui esse derivano; c) la delezione di piccole regioni della tossina, come nel caso delle tossine CryMod precedentemente citate, che mancano dell' α -elica 1 del dominio I, ossia di quella breve sequenza amminoacidica che viene eliminata in seguito a taglio proteolitico dopo l'interazione della tossina con il recettore primario. Queste tossine formano oligomeri anche in assenza dell'interazione con il recettore primario e, oltre a

presentare una aumentata tossicità, possono essere particolarmente utili per contrastare fenomeni di resistenza dovuti a mutazioni nel recettore primario stesso che lo rendono incapace di legare la tossina.

Da quanto riportato, emerge chiaramente come una conoscenza dettagliata del meccanismo d'azione di un bioinsetticida e della sua interazione con l'organo bersaglio sia fondamentale per individuare opportune strategie volte migliorarne l'efficacia.

Un altro esempio di bioinsetticida efficace per ingestione orale è rappresentato dalle lectine prodotte dalle piante. Alcune lectine sono presenti nei semi e in differenti tessuti di riserva come tuberi, bulbi, rizomi; altre invece, sono presenti in tessuti che non hanno funzione di riserva, come foglie e fiori, e la loro espressione viene indotta in condizioni di stress biotico o abiotico (attacco di insetti fitofagi, siccità, basse temperature, elevata concentrazione salina) (MICHIELS *et al.*, 2010; VANDENBORRE *et al.*, 2011). La caratteristica che accomuna tutte le lectine è quella di essere proteine con un dominio in grado di legare in modo specifico e reversibile i carboidrati, sia semplici monosaccaridi sia complessi glicani. Negli ultimi decenni le lectine prodotte dalle piante hanno suscitato molto interesse perché mostrano una elevata attività tossica nei confronti di molti insetti fitofagi (Lepidotteri, Ditteri, Coleotteri ed Emittteri). La somministrazione orale di queste proteine (aggiunte nella dieta artificiale o espresse in piante transgeniche) provoca differenti effetti tossici (MICHIELS *et al.*, 2010; VANDENBORRE *et al.*, 2011):

- alterazione dei processi digestivi;
- alterazione della crescita e dello sviluppo;
- riduzione del numero di uova deposte;
- alterazione dell'espressione genica nelle cellule intestinali (ad esempio di geni coinvolti nell'organizzazione del citoscheletro, nei processi di detossificazione, nel metabolismo energetico e di geni che codificano per enzimi digestivi);
- morte dell'insetto.

Il meccanismo d'azione di queste proteine non è stato ancora chiarito. È noto che alcune lectine si legano alla membrana peritrofica e alla membrana apicale delle cellule assorbenti intestinali, mentre altre vengono internalizzate nelle cellule assorbenti, superano l'epitelio intestinale e si ritrovano nell'emolinfa, nei tubuli Malpighiani, nel corpo grasso, negli ovarioli (MICHIELS *et al.*, 2010). È stato ad esempio dimostrato che larve di *Ostrinia nubilalis* alimentate con dieta contenente WGA (Wheat Germ Agglutinin) presentano alterazioni strutturali della membrana peritrofica e della membrana apicale delle cellule colonnari dell'epi-

telio intestinale (HOPKINS e HARPER, 2001; VANDENBORRE *et al.*, 2011). In questo caso l'effetto tossico della lectina è da attribuire ad una riduzione della funzione di barriera di queste strutture e/o delle capacità di assorbimento dei nutrienti da parte dell'epitelio intestinale. Anche nel caso di lectine che non causano alterazioni strutturali dei microvilli, il binding alla membrana apicale delle cellule assorbenti potrebbe impedire le normali funzioni digestive e di assorbimento dell'epitelio stesso (CACCIA *et al.*, 2012). Per quanto riguarda invece le lectine in grado di superare la barriera intestinale, come ad esempio la GNA (*Galanthus nivalis* Agglutinin), e di raggiungere così l'emocele e specifici tessuti e organi non sono state fatte ad oggi ipotesi sul loro meccanismo d'azione.

Come precedentemente detto, è stato ampiamente dimostrato che peptidi e proteine sono in grado di superare la barriera intestinale di insetto. Va però precisato che l'epitelio intestinale di questi Artropodi, e l'intestino medio delle larve di lepidottero in particolare (GIORDANA *et al.*, 1998), presenta peculiari caratteristiche funzionali che, se studiate in dettaglio, possono fornire importanti informazioni su come aumentare l'assorbimento di peptidi e proteine ad attività insetticida. Negli ultimi anni abbiamo focalizzato i nostri studi sulla caratterizzazione delle proprietà funzionali delle due vie che queste macromolecole possono utilizzare per superare l'epitelio intestinale: la via transcellulare e la via paracellulare. Il primo pathway implica il superamento dei domini apicale e basolaterale della membrana plasmatica della cellula e il complesso processo cellulare che permette l'assorbimento della macromolecola prende il nome di transitosi (TUMA e HUBBARD, 2003). Tale processo prevede che la macromolecola venga endocitata ad un dominio della membrana plasmatica, trasportata nel citosol all'interno di vescicole e rilasciata per esocitosi a livello del dominio di membrana opposto rispetto a quello dove è avvenuta l'internalizzazione. Il secondo pathway, la via paracellulare, è rappresentato dal canale acquoso compreso tra le membrane laterali di due cellule adiacenti, la cui permeabilità è regolata dalla giunzione settata.

Le proprietà funzionali della via paracellulare dell'intestino di insetto sono ancora poco conosciute. Abbiamo così iniziato la caratterizzazione *in vitro* di questa via di permeazione nell'intestino larvale di lepidottero. Abbiamo dimostrato che essa presenta una selettività rispetto alla carica e alla dimensione degli ioni (FIANDRA *et al.*, 2006) e che peptidi e molecole organiche come il proctolin o la fluoresceina superano l'epitelio intestinale esclusivamente attraverso questa via (FIANDRA *et*

al., 2009). Inoltre, la permeabilità della via paracellulare è modulabile: un aumento della concentrazione intracellulare dello ione calcio o di cAMP determina un aumento della permeabilità di questa via di permeazione (FIANDRA *et al.*, 2006). Utilizzando un acido grasso a catena media (C10) che in mammifero causa un aumento della permeabilità della giunzione stretta mobilizzando il calcio dai depositi intracellulari (CANO-CEBRIAN *et al.*, 2005), stiamo ora studiando uno dei pathway intracellulari che può portare nelle cellule di intestino di insetto ad un aumento della concentrazione intracellulare di calcio. Abbiamo dimostrato che intestini larvali di lepidottero isolati in camere di Ussing e incubati in presenza di C10, presentano un aumento della permeabilità della via paracellulare agli ioni e un aumento del flusso di proctolin e fluoresceina. Abbiamo chiarito che l'acido grasso attiva nelle cellule intestinali di lepidottero una via di trasduzione del segnale inositide-dipendente. Più precisamente, il C10 attiva la fosfolipasi C che porta alla produzione di inositolo trifosfato (IP3) e al conseguente rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico. Lo ione calcio si lega alla calmodulina e il complesso porta all'attivazione della chinasi che fosforila la catena leggera della miosina (MLCK). Ciò determina una probabile riorganizzazione del citoscheletro connesso alla giunzione settata che ha come conseguenza un aumento della permeabilità della via paracellulare (CASARTELLI *et al.*, dati non pubblicati). Rimane ancora da chiarire come la fosforilazione della catena leggera della miosina causi tale riorganizzazione del citoscheletro. È bene sottolineare che l'individuazione dei meccanismi cellulari coinvolti nella regolazione della permeabilità di questa via di permeazione può risultare particolarmente utile per mettere a punto opportune strategie di somministrazione per piccole molecole organiche, come peptidi attivi, con target emocelico.

Per quanto riguarda lo studio della via transcellulare, abbiamo dimostrato che l'albumina, da noi scelta come proteina modello, è in grado di superare l'epitelio intestinale delle larve di lepidottero, montato in un opportuno apparato di perfusione, per transitosi (CASARTELLI *et al.*, 2005). Utilizzando cellule colonnari in coltura abbiamo chiarito che l'albumina viene internalizzata a livello della membrana apicale con un meccanismo di endocitosi mediata da clatrina da un recettore omologo alla megalina (CASARTELLI *et al.*, 2008), recettore multiligando espresso in molti epitelii assorbenti di mammifero (MOESTRUP e VERROUST, 2001; CHRISTENSEN e BIRN, 2002). La megalina-like di insetto è in grado di riconoscere, oltre all'albumina, altri ligandi (insulina, transferrina,

gentamicina) (CASARTELLI *et al.*, 2008; CASARTELLI *et al.*, dati non pubblicati) e potrebbe quindi essere, come in mammifero, un recettore scavenger in grado di riconoscere e internalizzare molteplici substrati. Le proprietà di questo recettore potrebbero quindi rivelarsi particolarmente utili per veicolare proteine di interesse attraverso l'intestino di insetto, e la stessa albumina, internalizzata in modo molto efficiente da questo recettore, potrebbe fungere da vettore per molecole di interesse ad attività insetticida.

Un efficace metodo per veicolare molecole poco permeabili attraverso la membrana plasmatica è rappresentato dai Cell Penetrating Peptides (CPP). In differenti tipi cellulari di mammifero, è stato dimostrato che i CPP, piccoli peptidi caratterizzati dalla presenza di numerosi residui di lisina e arginina, sono in grado di superare la membrana plasmatica e di fungere da vettori per differenti tipi di cargo (proteine, peptidi, acidi nucleici) ad essi associati (SCHMIDT *et al.*, 2010; MADANI *et al.*, 2011). Il meccanismo coinvolto nella loro internalizzazione non è stato ancora del tutto chiarito. È stato dimostrato che l'internalizzazione di alcuni CPP è mediata da meccanismi endocitotici, ma in molti casi si è osservato che l'ingresso in cellula avviene anche in presenza di inibitori dell'endocitosi (FUTAKI *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2007).

Abbiamo recentemente dimostrato che il CPP Tat può essere utilizzato come vettore per cargo proteici anche nelle cellule intestinali di lepidottero (CERMENATI *et al.*, 2011). In cellule colonnari di intestino larvale di lepidottero in coltura abbiamo dimostrato che la proteina di fusione formata dal CPP Tat e dalla enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) viene internalizzata con maggior efficienza rispetto alla sola eGFP. Abbiamo anche chiarito che il meccanismo coinvolto nell'internalizzazione della Tat-eGFP è indipendente da energia poiché né inibitori metabolici né specifici inibitori dell'endocitosi mediata da clatrina interferiscono con l'ingresso in cellula della proteina di fusione. Poiché le cellule colonnari in coltura sono in sospensione ed espongono alla soluzione di incubazione sia il dominio apicale che quello basolaterale della membrana plasmatica, per verificare se la membrana apicale è effettivamente coinvolta nell'internalizzazione della Tat-eGFP, abbiamo isolato e montato l'intestino in un opportuno apparato di perfusione. La eGFP e la Tat-eGFP sono state aggiunte nel comparto luminale dell'apparato e dopo tre ore di incubazione gli intestini sono stati osservati in microscopia confocale. I tessuti incubati in presenza di Tat-eGFP mostrano un segnale fluorescente molto più intenso di quello osservato negli intestini incubati con la sola eGFP, chiara indicazione che il CPP Tat è in grado di pro-

muovere l'internalizzazione della proteina eGFP attraverso la membrana apicale delle cellule di intestino larvale di lepidottero. Con il medesimo approccio sperimentale abbiamo anche misurato il flusso trans-epiteliale della eGFP e della Tat-eGFP. Abbiamo così dimostrato che il CPP Tat non solo aumenta l'internalizzazione della proteina cargo, ma incrementa in modo significativo il suo trasporto trans-epiteliale. Questi risultati aprono nuove prospettive per una efficace somministrazione orale di macromolecole ad attività insetticida i cui target siano localizzati nelle cellule dell'epitelio intestinale di insetto o nel compartimento emocelico.

RIASSUNTO

L'agricoltura sostenibile cerca di limitare l'uso intensivo degli insetticidi chimici di sintesi per il controllo degli insetti dannosi alle colture a favore dei bioinsetticidi, molecole di origine naturale a basso impatto sull'ambiente, sugli organismi non bersaglio e sulla salute umana. Per questa ragione numerosi gruppi di ricerca sono oggi impegnati nell'individuazione di nuove strategie di controllo degli insetti dannosi e nell'identificazione di molecole di origine naturale ad attività insetticida. L'interesse è rivolto all'individuazione di proteine e peptidi prodotti da microorganismi, piante, insetti o loro nemici naturali. L'intestino medio di insetto rappresenta un bersaglio per i bioinsetticidi somministrati per via orale, oppure la barriera che deve essere superata affinché le molecole ad attività tossica con target emocelico possano esercitare la loro azione. I bioinsetticidi più diffusi in commercio sono i prodotti a base di tossine del batterio *Bacillus thuringiensis*, proteine che si legano a recettori presenti sulle membrane apicali delle cellule dell'intestino degli insetti sensibili e causano pori che portano allo shock osmotico delle cellule e alla morte dell'insetto per inedia e setticemia. Le molecole entomocide con target emocelico devono invece superare inalterate la barriera intestinale, costituita dalla membrana peritrofica e dall'epitelio intestinale. Quest'ultimo può essere attraversato tramite la via transcellulare e/o la via paracellulare. Negli ultimi anni lo studio delle proprietà funzionali di queste due vie di permeazione ha permesso di chiarire quali siano i meccanismi coinvolti nell'assorbimento di peptidi e proteine a livello dell'epitelio intestinale d'insetto e di elaborare opportune strategie per aumentarne il trasporto.

BIBLIOGRAFIA

- BALE J.S., VAN LENTEREN J.C., BIGLER F., 2008 – *Biological control and sustainable food production*. - Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363: 761-776.
- BRAVO A., LIKITVIVATANAVONG S., GILL S.S., SOBERON M., 2011 – *Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide*. - Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41: 423-431.
- CACCIA S., VAN DAMME E.J.M., DE VOS W.H., SMAGGHE G., 2012 – *Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from Hippastrum hybrid (Amaryllis) in Spodoptera littoralis larvae*. - Journal of Insect Physiology, 58: 1177-1183.

- CANO-CEBRIAN M.J., ZORNOZA T., GRANERO L., POLACHE A., 2005 – *Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery*. - Current Drug Delivery, 2: 9-22.
- CASARTELLI M., CORTI P., LEONARDI M.G., FIANDRA L., BURLINI N., PENNACCHIO F., GIORDANA B., 2005 – *Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva*. - Journal of Insect Physiology, 51: 933-940.
- CASARTELLI M., CERMENATI G., CORTI P., FIANDRA L., GRIMALDI A., SANTO N., PENNACCHIO F., GIORDANA B., 2007 – *Absorption of horseradish peroxidase in Bombyx mori larval midgut*. - Journal of Insect Physiology, 53: 517-525.
- CASARTELLI M., CERMENATI G., RODIGHIERO S., PENNACCHIO F., GIORDANA B., 2008 – *A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect (Bombyx mori, Lepidoptera)*. - American Journal of Physiology, 295: R1290-R1300.
- CERMENATI G., TERRACCiano I., CASTELLI I., GIORDANA B., RAO R., PENNACCHIO F., CASARTELLI M., 2011 – *The CPP Tat enhances eGFP cell internalization and transepithelial transport by the larval midgut of Bombyx mori (Lepidoptera, Bombycidae)*. - Journal of Insect Physiology, 57: 1689-1697.
- CHRISTENSEN E.I., BIRN H., 2002 – *Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors*. - Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3: 258-268.
- DAYAN F.E., CANTRELL C.L., DUKE S.O., 2009 – *Natural products in crop protection*. - Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17: 4022-4034.
- FIANDRA L., CASARTELLI M., GIORDANA B., 2006 – *The paracellular pathway in the lepidopteran larval midgut: modulation by intracellular mediators*. - Comparative Biochemistry and Physiology, 144A: 464-473.
- FIANDRA L., CASARTELLI M., CERMENATI G., BURLINI N., GIORDANA B., 2009 – *The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides*. - Journal of Insect Physiology, 55: 10-18.
- FIANDRA L., TERRACCiano I., FANTI P., GARONNA A., FERRACANE L., FOGLIANO V., CASARTELLI M., GIORDANA B., RAO R., PENNACCHIO F., 2010 – *A viral chitinase enhances oral activity of TMOF*. - Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40: 533-540.
- FUTAKI S., NAKASE I., TADOKORO A., TAKEUCHI T., JONES A.T., 2007 – *Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms*. - Biochemical Society Transactions, 35: 784-787.
- GIORDANA B., LEONARDI M.G., CASARTELLI M., CONSONI P., PARENTI P., 1998 – *K⁺-neutral amino acid symport of Bombyx mori larval midgut: a system operative in extreme conditions*. - American Journal of Physiology, 274: R1361-R1371.
- HOPKINS T.L., HARPER M.S., 2001 – *Lepidopteran peritrophic membranes and the effect of dietary germ agglutinin on their formation and structure*. - Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 47: 100-109.
- JEFFERS L.A., ROE R.M., 2008 – *The movement of proteins across the insect and tick digestive system*. - Journal of Insect Physiology, 54: 319-332.
- LEHANE M.L., 1997 – *Peritrophic matrix structure and function*. - Annual Review of Entomology, 42: 525-550.
- MADANI F., LINDBERG S., LANGE L., FUTAKI S., GRASLUND S., 2011 – *Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides*. - Journal of Biophysics Volume 2011, Article ID 414729, 10 pages doi:10.1155/2011/414729.
- MICHIELS K., VAN DAMME E.J.M., SMAGGHE G., 2010 – *Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectines?* - Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 73:193-212.
- MOESTRUP S.K., VERROUST P.J., 2001 – *Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids and hormones in polarized epithelia*. - Annual Review of Nutrition, 21: 407-428.
- PARDO-LOPEZ L., MUNOZ-GARAY C., PORTA H., RODRIGUEZ-ALMAZAN C., SOBERON M., BRACO A., 2009 – *Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. - Peptides, 30: 589-595.
- PATEL L.N., ZARO J.L., SHEN W., 2007 – *Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives*. - Pharmaceutical Research, 24: 1977-1992.
- SCHMIDT N., MISHRA A., LAI G.H., WONG G.C.L., 2010 – *Arginine-rich cell-penetrating peptides*. - FEBS Letters, 584: 1806-1813.
- SOBERÓN M., PARDO-LÓPEZ L., LÓPEZ I., GÓMEZ I., TABASHNIK B., BRAVO A., 2007 – *Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance*. - Science, 318: 1640-1642.
- TERRA W.R., FERREIRA C., 1994 – *Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function*. - Comparative Biochemistry and Physiology, 109B: 1-62.
- TUMA P.L., HUBBARD A.L., 2003 – *Transcytosis: crossing cellular barriers*. - Physiological Reviews, 83: 871-932.
- VANDENBORRE G., SMAGGHE G., VAN DAMME E.J.M., 2011 – *Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects*. - Phytochemistry, 72: 1538-1550.
- WHETSTONE P.A., HAMMOCK B.D., 2007 – *Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control*. - Toxicon, 49: 576-596.
- ZHANG X., CANDAS M., GRIKO N.B., TAUSSIG R., BULLA JR. L.A., 2006 – *A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis*. - Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America, 103: 9897-9902.

LA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI DELL'AFIDE *MYZUS PERSICAE* (SULZER)

EMANUELE MAZZONI (*) - PIERO CRAVEDI (*)

(*) Istituto di Entomologia e Patologia vegetale – Facoltà di Agraria - Università Cattolica del Sacro Cuore - Via E. Parmense, 84, 29122 Piacenza - emanuele.mazzoni@unicatt.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi”. Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Insecticide resistance in the aphid Myzus persicae (Sulzer)

Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) is a key pest in Italian peach orchards but also in many herbaceous crops. Insecticide treatments selected resistant populations. Several resistance mechanisms in *M. persicae* are known: esterases and mixed function oxydases overproduction and target site insensitivity for carbamates, pyrethroids and also for cyclodienic insecticides. More recently a highly specific target site resistance mechanisms have been found against neonicotinoid insecticides. These resistance mechanisms allow aphids to survive when sprayed with traditional aphicides. In Italy resistant strains are widely distributed but they are more frequent where agriculture is more intense. Management strategies are discussed.

KEY WORDS: *Myzus persicae*, peach, nicotinic receptor, esterase E4/FE4, modified acetylcholinesterase, kdr

INTRODUZIONE

Il problema della resistenza agli insetticidi negli Afidi ed Aleirodidi è particolarmente sentito a causa di una serie di fattori che conferiscono a molte delle specie appartenenti questo gruppo sistematico un ruolo chiave nella difesa delle colture. La notevole polifagia, spesso a danno di colture a elevato reddito, unita a una grande capacità riproduttiva, li rendono i soggetti ideali per lo sviluppo e la selezione di popolazioni resistenti ai prodotti fitosanitari. A livello mondiale le specie che maggiormente destano preoccupazioni sono gli afidi *Myzus persicae* (Sulzer) e *Aphis gossypii* Glover e gli aleirodidi *Bemisia tabaci* (Gennadius) e *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood).

In Italia l'importanza fitosanitaria di queste specie varia in funzione dell'ambiente ma in linea di massima *M. persicae* e *B. tabaci* rappresentano le avversità di maggior rilievo economico.

L'afide verde del pesco, particolarmente nell'Italia settentrionale, è una specie chiave nella difesa fitosanitaria del pesco e di varie colture erbacee (BARBAGALLO *et al.*, 2007).

Il grande impatto economico della specie ha causato nel tempo un'elevata pressione di selezione ad opera degli insetticidi impiegati per il suo controllo. Le segnalazioni di resistenza agli agrofarmaci sono numerose. I primi rapporti di insuccessi dei trattamenti risalgono già alla metà del secolo scorso. Tuttavia, nonostante il problema fosse ampiamente noto, è solo dopo il 1970 circa che si è

iniziato a comprendere quali fossero i meccanismi di resistenza coinvolti.

Nel corso degli anni, i cambiamenti di strategia fitosanitaria, di volta in volta adottati per il contenimento delle popolazioni di questa specie, hanno spesso selezionato popolazioni resistenti. L'introduzione di nuovi principi attivi, con meccanismi d'azione radicalmente differenti da quelli già presenti in commercio, ha determinato la temporanea illusione di aver risolto il problema della resistenza. Tuttavia, anche insetticidi ritenuti inizialmente molto efficaci e “sicuri”, per quanto riguarda lo sviluppo di resistenze, presto o tardi, hanno mostrato una minor efficacia. Un classico esempio di questo preoccupante fenomeno è rappresentato dagli insetticidi appartenenti alla classe dei neonicotinoidi (modalità d'azione IRAC 4A – agonisti del recettore nicotinico dell'acetilcolina - nAChR). Questi insetticidi, in anni recenti, hanno rappresentato ampiamente il più consolidato e diffuso strumento per la lotta contro gli afidi fornendo, fin dalla loro introduzione, una valida alternativa a vecchi prodotti e dimostrando ampiamente di essere un utile supporto sia alle strategie di lotta integrata che alla gestione della resistenza agli insetticidi.

Le segnalazioni di popolazioni sulle quali i trattamenti con neonicotinoidi dimostrano una minor efficacia si sono moltiplicate nel corso degli ultimi anni (FOSTER *et al.*, 2008; TOOR *et al.*, 2008; PHILIPPOU *et al.*, 2010; PUINEAN *et al.*, 2010), arrivando a forme di resistenza conclamate causate da mutazioni speci-

fiche nella sequenza amminoacidica del recettore nicotinico dell'acetilcolina (BASS *et al.*, 2011).

Il fenomeno delle resistenze multiple è noto da anni sia in *M. persicae* che in varie altre specie di insetti. La coesistenza di differenti meccanismi che interagiscono con diverse classi di principi attivi può portare praticamente all'immunità le popolazioni coinvolte (FIELD *et al.*, 1997; DEWAR *et al.*, 1998). Tali meccanismi possono essere raggruppati in due grandi gruppi: resistenze metaboliche, prodotte da enzimi in grado di detossificare e/o sequestrare le molecole dell'insetticida, e resistenze target-site, causate da alterazioni del sito bersaglio che lo rendono molto meno sensibile all'azione dell'insetticida.

LE RESISTENZE METABOLICHE

La resistenza causata da esterasi

La prima forma di resistenza caratterizzata nelle popolazioni di *M. persicae* è stata una resistenza di tipo metabolico. Agli inizi degli anni '70 è stata infatti correlata la resistenza, sia agli esteri fosforici che ad altri insetticidi caratterizzati dalla presenza di un gruppo estere nella loro molecola, all'attività di enzimi appartenenti al gruppo delle esterasi (NEEDHAM & SAWICKI, 1971). Successivamente è stato evidenziato e quantificato il legame tra livello di resistenza nei confronti degli organofosforici e attività enzimatica (DEVONSHIRE *et al.*, 1992). Ai livelli di resistenza indicati come S (sensibile), R1 (moderatamente resistente), R2 (molto resistente) e R3 (estremamente resistente) sono stati abbinati i valori di assorbanza ottenuti in un test spettrofotometrico in grado di misurare l'attività esterasica totale attraverso l'idrolisi del substrato artificiale 1-naftilacetato. Tale metodo si è dimostrato essere di particolare utilità per caratterizzare la resistenza prodotta da esterasi mediante un test "in vitro" di rapida e semplice attuazione (DEVONSHIRE *et al.*, 1992; MAZZONI & CRAVEDI, 2002).

Nei cloni con più elevata resistenza fino all'1% delle proteine totali dell'afide può essere costituito da questi enzimi (DEVONSHIRE *et al.*, 1998).

La caratterizzazione biochimica di queste esterasi ha portato alla scoperta che questo meccanismo di resistenza in *M. persicae* è causato dalla sovrapproduzione di due varianti dello stesso enzima indicate come E4 e FE4 (fast E4). I due enzimi sono molto simili: le sequenze amminoacidiche differiscono di soli 9 sostituzioni di amminoacidi (DEVONSHIRE *et al.*, 1998) e le loro masse molecolari sono molto simili (circa 65 kDa per l'esterasi E4 e 66 kDa per l'esterasi FE4). Esistono poi altre leggere differenze di attività per queste

due molecole: FE4 mostra una maggior velocità nella corsa elettroforetica (Devonshire *et al.*, 1998) e riesce anche a idrolizzare gli insetticidi più velocemente rispetto a E4, anche se questo ha scarsi effetti sul livello di resistenza prodotto (DEVONSHIRE *et al.*, 1983) perché il principale effetto sarebbe dovuto da una azione di "sequestro" più che di idrolisi (DEVONSHIRE & MOORES, 1982; DEVONSHIRE *et al.*, 1998).

La sovrapproduzione è generata dall'amplificazione del gene codificante presente in un numero di copie che può arrivare a svariate decine (FIELD *et al.*, 1999; BIZZARO *et al.*, 2005; RIVI *et al.*, 2013). Ad oggi è noto che l'amplificazione riguarda alternativamente una delle due forme e che le rispettive popolazioni hanno una distribuzione differente. Le popolazioni con esterasi E4 si ritrovano principalmente nell'Europa settentrionale mentre quelle con esterasi FE4 sono prevalenti nelle aree mediterranee. Tuttavia le migrazioni degli afidi portano a spostamenti su lunghissime distanze con possibilità di ritrovare rimescolamenti dei genotipi (HARRINGTON *et al.*, ; FOSTER *et al.*, 1998; MARGARITPOULOS *et al.*, 2003; FENTON *et al.*, 2005). Inoltre l'amplificazione del gene E4 è legata a variazioni del cariotipo (Blackman *et al.*, 1995). Mentre i geni amplificati sono localizzati sull'autosoma 3T nei ceppi E4, in quelli FE4 sono normalmente distribuiti in vari autosomi (BLACKMAN *et al.*, 1995). Recentemente è stata dimostrata la presenza di variazioni del cariotipo anche in popolazioni "FE4" raccolte in varie regioni italiane (RIVI *et al.*, 2012). Tali variazioni del cariotipo che nei cloni E4 sono legate all'amplificazioni del gene e alla resistenza, nei cloni FE4 non sono invece risultate collegate alla resistenza causata da esterasi (RIVI *et al.*, 2013).

La resistenza causata da monossigenasi

La resistenza causata da "ossigenasi a funzione mista" basate sul citocromo P450 (MFO) è nota da tempo ed è stata ampiamente dimostrata in vari gruppi di insetti, dai Lepidotteri ai Ditteri, solo per indicare i più importanti (GAO QI *et al.*, 2012; KARATOLOS *et al.*, 2012; REYES *et al.*, 2012; SCHULER, 2012; SHANG *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2013; Nwane *et al.*, 2013; RIVERON *et al.*, 2013). In *M. persicae*, nonostante i dati tossicologici dimostrino per via indiretta, cioè con l'uso di sinergizzanti come il piperonil butossido, il coinvolgimento di questi enzimi nella resistenza ad alcune classi di insetticidi (piretroidi e neonicotinoidi), ad oggi, le conferme biochimiche del fenomeno sono mancanti perché esistono documentate difficoltà ad ottenere misure di questa attività enzimatica a causa di probabili meccanismi di interferenza (PHILIPPOU *et al.*, 2010).

Recenti indagini sui possibili meccanismi di resistenza posseduti da un clone greco, hanno evidenziato, nella resistenza ai neonicotinoidi, il coinvolgimento di un gene (CYP6CY3), codificante un citocromo P450. La maggior quantità di MFO deriverebbe da una amplificazione e da alterazioni nella regolazione dell'espressione del suddetto gene (PUINEAN *et al.*, 2010). Anche in Italia osservazioni preliminari, al momento non confermate da analisi biomolecolari, portano a supporre un elevato grado di coinvolgimento di questi sistemi enzimatici nel conferire resistenza ad ampio spettro a numerose molecole insetticide (MAZZONI *et al.*, 2012).

LE RESISTENZE TARGET-SITE

La resistenza causata da acetilcolinesterasi insensibile

Fino all'inizio degli anni 2000 la maggior parte delle popolazioni raccolte in Italia mostravano una attività esterasica totale piuttosto elevata e compatibile con livelli di resistenza significativi nei confronti di esteri fosforici e altre molecole insetticide con legami estere (MAZZONI & CRAVEDI, 2002). Le variazioni nello scenario dei principi attivi disponibili e utilizzati hanno successivamente modificato l'importanza di questo meccanismo di resistenza. L'introduzione di un aficida ad elevata specificità e meno sensibile all'azione inibitoria delle esterasi come il pirimicarb aveva fornito un utile strumento per limitare l'effetto negativo di questi enzimi. Tuttavia nei primi anni '90 è stata trovata la presenza di un nuovo meccanismo di resistenza più specifico e in grado di conferire livelli di resistenza più elevati nei confronti proprio del pirimicarb e del suo gruppo chimico di appartenenza: gli insetticidi di-metilcarbammati (MOORES *et al.*, 1994). La scoperta è avvenuta in Grecia e successivamente è stata segnalata anche in altre aree, Italia compresa (MAZZONI & CRAVEDI, 2002). Tale resistenza è stata evidenziata in origine mediante biosaggi e per mezzo di saggio biochimici impiegando il saggio di Ellman (ELLMAN, 1959) in presenza dell'inibitore specifico (pirimicarb) (MOORES *et al.*, 1988; MOORES *et al.*, 1994). La causa genetica è rimasta sconosciuta fino al 2003 quando un gruppo di ricerca giapponese ha evidenziato il legame tra la resistenza e una mutazione puntiforme del gene codificante l'acetilcolinesterasi 2 (ACE-2) (NABESHIMA *et al.*, 2003). Tale mutazione produce la sostituzione della serina in posizione 431 con una fenilalanina (S431F) modificando la sensibilità dell'enzima per il pirimicarb ed il triazamate (MOORES *et al.*, 1994). Successivamente l'importanza di tale mutazione nel conferire resistenza

al pirimicarb è stata confermata anche in altre specie di afidi di notevole interesse economico come l'afide del cotone, *Aphis gossypii* Glover (BENTING & NAUEN, 2004). Inoltre la mutazione del codone codificante l'aminoacido in posizione 431 rimuove un sito di restrizione per l'endonucleasi SspI nell'allele "wild-type". Ciò ha consentito di sviluppare un protocollo di diagnosi basato su PCR-RFLP per identificare contemporaneamente più mutazioni presenti nello stesso individuo (CASSANELLI *et al.*, 2005).

La resistenza causata da mutazioni del canale del sodio

Verso la fine degli anni '90 è stata scoperta una nuova mutazione puntiforme in grado di inibire significativamente l'azione degli insetticidi piretroidi (FIELD *et al.*, 1997). Oltre a questa mutazione, comunemente nota come mutazione *kdr* e che, come in altre specie, produce la sostituzione L1014F, sono state trovate anche altre due mutazioni del gene codificante il canale del sodio voltaggio dipendente. La prima, relativamente comune a molte specie di insetti, è denominata *s-kdr* e porta alla sostituzione M918T (DAVIES *et al.*, 2007; DU & DONG, 2008) mentre la seconda segnalata per la prima volta in un clone raccolto a Piacenza, produce la sostituzione F979S (CASSANELLI *et al.*, 2005). Tale mutazione, trovata abbinata alla mutazione *kdr*, sembra produrre significativi incrementi dei fattori di resistenza ai piretroidi. I fattori di resistenza (RF) stimati nei confronti di un piretroide come il fluvalinate passano da circa 15 a circa 90 quando alla mutazione L1014F (*kdr*) si abbina la mutazione F979S entrambe in eterozigosi. Il fattore di resistenza risulta di poco inferiore a quello stimato per popolazioni con la mutazione *kdr* in omozigosi abbinata alla mutazione M918T (*s-kdr*) in eterozigosi (RF ~ 115) (CRINITI *et al.*, 2008). Più recentemente una nuova variante della mutazione *s-kdr* (M918L) è stata trovata in vari paesi europei (FONTAINE *et al.*, 2011) e in Italia (DOSSA *et al.*, 2012): Tale mutazione porta alla sostituzione della metionina in posizione 918 non con una treonina ma con una leucina. Al momento è solo parzialmente noto l'effetto che tale mutazione esercita sui livelli di resistenza ai piretroidi (FONTAINE *et al.*, 2011; DOSSA *et al.*, 2012). In Italia le mutazioni classiche *kdr* e *s-kdr* sembrano essere estremamente diffuse mentre le F979S e M918L vengono riscontrate solo raramente (MAZZONI, *comm. pers.*)

La resistenza ai neonicotinoidi

Gli insetticidi del gruppo dei neonicotinoidi, ad oggi, rappresentano il più consolidato e diffuso

strumento per la lotta contro l'afide verde del pesco e fin dalla loro introduzione sono stati una valida alternativa ai vecchi prodotti dimostrando di essere un utile supporto alle strategie di lotta integrata e contribuendo, contemporaneamente, alla gestione della resistenza agli insetticidi (CRAVEDI & MAZZONI, 2004; ELBERT *et al.*, 2008). Tuttavia recenti e significativi cali di efficacia sono stati dimostrati in Francia, Spagna, Italia e Grecia (PHILIPPOU *et al.*, 2010; ANONIMO 2011; MAZZONI *et al.*, 2012; SLATER *et al.*, 2012). Nel primo caso, identificato in Grecia, è stato messo in evidenza il possibile coinvolgimento di resistenze metaboliche ma successivamente, in un clone raccolto in Francia, è stata trovata una mutazione localizzata nella subunità beta 1 del recettore nicotinico dell'acetilcolina. Tale mutazione porta alla sostituzione di una arginina con una treonina in posizione 81 (R81T) (BASS *et al.*, 2011). La sostituzione di un singolo amminoacido riduce l'affinità dell'insetticida per il recettore e al tempo stesso rende la nuova sequenza amminoacidica molto simile a quella dei vertebrati per i quali in neonicotinoidi dimostrano una bassa tossicità (BASS *et al.*, 2011). La presenza della mutazione, eventualmente abbinata a resistenze metaboliche, porta a fattori di resistenza di varie centinaia di volte (MAZZONI *et al.*, 2012; SLATER *et al.*, 2012).

ALTRI MECCANISMI DI RESISTENZA

Altre forme di resistenza note riguardano una resistenza target-site specifica per i ciclodienici (ANTHONY *et al.*, 1998). Tale meccanismo di resistenza non ha tuttavia al momento significati pratici: i ciclodienici sono prodotti "fuorilegge" e non risultano resistenze incrociate con altre molecole impiegate come aficidi.

Più interessante è invece la scoperta che i geni codificanti per varie proteine cuticolari sono sovra-espressi in cloni di *M. persicae* caratterizzati da elevati livelli di resistenza a vari insetticidi. L'uso di biosaggi con metodiche di applicazione differenti (applicazione topica a confronto con applicazione per ingestione) modifica in modo significativo i fattori di resistenza suggerendo la possibilità che una alterata permeabilità cuticolare possa influenzare la sopravvivenza ai trattamenti e quindi anche i livelli di resistenza agli insetticidi. Ulteriori prove a favore derivano anche dall'uso di insetticidi marcati con radionuclidi (^3H -imidacloprid) e dal non completo effetto di recupero della sensibilità utilizzando i sinergizzanti come il piperonilbutossido (PUINEAN *et al.*, 2010).

CONCLUSIONI

Al momento molte fondamentali domande sulla resistenza agli insetticidi richiedono ricerche approfondite per poter giungere a risposte soddisfacenti che possano avere le necessarie ricadute nel campo dell'entomologia agraria.

La difesa contro gli insetti dannosi deve necessariamente tener conto della loro "plasticità" per ritardare / mitigare lo sviluppo ed affermazione della resistenza agli insetticidi.

Gli insetti si stanno evolvendo e la loro sopravvivenza ai trattamenti insetticidi è basata su molti e differenti meccanismi che agiscono contemporaneamente a livello di singolo individuo. Le nostre strategie di difesa fitosanitaria devono quindi adattarsi a loro volta a questo fenomeno articolandosi in "approcci multipli". Nessun principio attivo è completamente e definitivamente immune allo sviluppo di resistenze e quindi l'approccio deve essere: "quali conoscenze servono e devono essere applicate per ritardare il più a lungo possibile la resistenza alle molecole insetticide?"

RIASSUNTO

L'intenso uso di insetticidi per combattere le infestazioni *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) ha selezionato popolazioni resistenti ai principi attivi che sono stati utilizzati nell'arco degli ultimi decenni. Le ricerche, iniziate negli anni '70 hanno evidenziato vari meccanismi di resistenza: sovrapproduzione di esterasi e di monossigenasi, insensibilità dei siti bersaglio specifici per i carbammati, per i piretroidi, per i ciclodienici e, scoperta solo recentemente, anche per i neonicotinoidi. Tali forme di resistenza sono in grado di consentire agli esemplari portatori di sopravvivere ai trattamenti con gli aficidi tradizionali.

In Italia le popolazioni più resistenti provengono principalmente da aree dove l'agricoltura è più intensiva. Ciò è molto preoccupante poiché in genere nelle strategie di difesa non viene posta adeguata attenzione al problema "resistenza" per la cui soluzione non si può fare affidamento solo alla possibilità di impiegare nuovi principi attivi quando quelli vecchi mostrano segni di inefficacia.

BIBLIOGRAFIA

- ANONYMOUS (2011) *IRAC NEWSLETTER ISSUE 25 – Myzus resistance alert!* IRAC. Available from: http://www.irac-online.org/wp-content/uploads/2009/11/eConnection_issue25v1.0.pdf, 2012.
- ANTHONY N., UNRUH T., GANSER D., FRENCH CONSTANT R., 1998 – *Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, Myzus persicae*. – Mol. Gen. Genet., 260: 165-175.
- BARBAGALLO S., COCUZZA G., CRAVEDI P., KOMAZAKI S., 2007 – *IPM case studies: deciduous fruit trees*. In: *Aphids as crop pests*, Emden H.F.v. & Harrington R. Eds., CABI, Wallingford, pp. 651-661.

- BASS C., PUINEAN A.M., ANDREWS M., CULTER P., DANIELS M., ELIAS J., PAUL V.L., CROSTHWAITE A.J., DENHOLM I., FIELD L.M., FOSTER S.P., LIND R., WILLIAMSON M.S., SLATER R., 2011 – *Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid Myzus persicae*. - BMC Neuroscience, 12: (31 May 2011).
- BENTING J., NAUEN R., 2004 – *Biochemical evidence that an S431F mutation in acetylcholinesterase-1 of Aphis gossypii mediates resistance to pirimicarb and omethoate*. - Pest Manag. Sci., 60: 1051-1055.
- BIZZARO D., MAZZONI E., BARBOLINI E., GIANNINI S., CASSANELLI S., PAVESI F., CRAVEDI P., MANICARDI G.C., 2005 – *Relationship among expression, amplification, and methylation of FE4 esterase genes in Italian populations of Myzus persicae (Sulzer) (Homoptera: Aphididae)*. - Pest. Bioch. Physiol., 81: 51-58.
- BLACKMAN R.L., SPENCE J.M., FIELD L.M., DEVONSHIRE A.L., 1995 – *Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in Myzus persicae (Homoptera: Aphididae)*. - Heredity, 75: 297-302.
- CASSANELLI S., CERCHIARI B., GIANNINI S., BIZZARO D., MAZZONI E., MANICARDI G.C., 2005 – *Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and kdr insecticide resistance in the peach potato aphid Myzus persicae*. - Pest Manag. Sci., 61: 91-96.
- CRAVEDI P., MAZZONI E., 2004 – *Insecticide resistance management of the green peach aphid in Italian peach orchards*. - Bull. OILB/SROP, 27: 75-78.
- CRINITI A., MAZZONI E., CASSANELLI S., CRAVEDI P., TONDELLI A., BIZZARO D., MANICARDI G.C., 2008 – *Biochemical and molecular diagnosis of insecticide resistance conferred by esterase, MACE, kdr and super-kdr based mechanisms in Italian strains of the peach potato aphid, Myzus persicae (Sulzer)*. - Pest. Biochem. Physiol., 90: 168-174.
- DAVID J.P., ISMAIL H.M., CHANDORPROUST A., PAINE M.J.I., 2013 – *Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on earth. (Special Issue: Cytochrome P450 and its impact on planet Earth.)*. - Phil. Trans. R. Soc. London, Series B, Biological Sciences: 20120429.
- DAVIES T.G.E., FIELD L.M., USHERWOOD P.N.R., WILLIAMSON M.S., 2007 – *DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels*. - IUBMB life, 59: 151-162.
- DEVONSHIRE A.L., DEVINE G.J., MOORES G.D., 1992 – *Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of Myzus persicae (Homoptera: Aphididae)*. - Bull. Entomol. Res., 82: 459-463.
- DEVONSHIRE A.L., FIELD L.M., FOSTER S.P., MOORES G.D., WILLIAMSON M.S., BLACKMAN R.L., 1998 – *The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae*. - Phil. Trans. R. Soc. London. Series B, Biological Sciences, 353: 1677-1684.
- DEVONSHIRE A.L., MOORES G.D., CHIANG C.L., 1983 – *The biochemistry of insecticide resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae*. In: Pesticide chemistry: human welfare and the environment, Proceedings of the 5th International Congress of Pesticide Chemistry, Kyoto, Japan, 29 August - 4 September 1982. ume 3. Mode of action, metabolism and toxicology, pp 191-196.
- DEVONSHIRE A.L., MOORES G.D., 1982 – *A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach—potato aphids (Myzus persicae)*. - Pest. Biochem. Physiol., 18: 235-246.
- DEWAR A., HAYLOCK L., FOSTER S., DEVONSHIRE A., HARRINGTON R., 1998 – *Three into one will go - the evolution of resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae*. - British Sugar Beet Review, 66: 14-19.
- DOSSA, G.S.C., ZIMMER, T.C., NAUEN, R., 2012 – *Characterisation of insecticide resistance in clonal cultures of Myzus persicae (Homoptera: Aphididae) obtained from an Italian field population in 2010*. In: Tropentag 2012, Resilience of agricultural systems against crises 19-21/09/2012 Gottingen.
- DU Y.Z. & DONG K., 2008 – *Molecular basis of knockdown resistance to pyrethroid insecticides*. In: Recent advances in insect physiology, toxicology and molecular biology, Liu N. Ed., Research Signpost, Trivandrum., pp. 29-40.
- ELBERT A., HAAS M., SPRINGER B., THIELERT W., NAUEN R., 2008 – *Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection*. - Pest Manag. Science, 64: 1099-1105.
- ELLMAN G.L., 1959 – *Tissue sulfhydryl groups*. - Arch. Biochem. Biophys., 82: 70-77.
- FENTON B., MALLOCH G., WOODFORD J.A.T., FOSTER S.P., ANSTEAD J., DENHOLM I., KING L., PICKUP J., 2005 – *The attack of the clones: tracking the movement of insecticide-resistant peach-potato aphids Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)*. - Bull. Entomol. Res., 95: 483-494.
- FIELD L.M., ANDERSON A.P., DENHOLM I., FOSTER S.P., HARLING Z.K., JAVED N., MARTINEZTORRES D., MOORES G.D., WILLIAMSON M.S., DEVONSHIRE A.L., 1997 – *Use of biochemical and DNA diagnostics for characterising multiple mechanisms of insecticide resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae (Sulzer)*. - Pest. Sci., 51: 283-289.
- FIELD L.M., BLACKMAN R.L., TYLERSMITH C., DEVONSHIRE A.L., 1999 – *Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant Myzus persicae (Sulzer)*. - Biochem. J. (London), 339: 737-742.
- FONTAINE S., CADDoux L., BRAZIER C., BERTHO C., BERTOLLA P., MICOUD A., ROY L., 2011 - *Uncommon associations in target resistance among French populations of Myzus persicae from oilseed rape crops*. - Pest Manag. Sci., 67: 881-885.
- FOSTER S.P., COX D., OLIPHANT L., MITCHINSON S., DENHOLM I., 2008 – *Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)*. - Pest Manag. Sci., 64: 1111-1114.
- FOSTER S.P., DENHOLM I., HARLING Z.K., MOORES G.D., DEVONSHIRE A.L., 1998 – *Intensification of insecticide resistance in UK field populations of the peach-potato aphid, Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae) in 1996*. - Bull. Entomol. Res., 88: 127-130.
- GAO QI, LI MEI, SHENG CHENGFA, SCOTT J.G., QIU XINGHUI, 2012 – *Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies (Musca domestica)*. - Pest. Biochem. Physiol., 104: 252-260.
- HARRINGTON R., DEWAR A.M., DEVONSHIRE A.L., FEATHER M., FOSTER S.P., HALLSWORTH P., HARLING Z., HAYLOCK L.A., PARKER S.J., STEVENS M., 1997 – *Monitoring and forecasting aphid vectors of beet viruses: a working system*. - Proceedings of the 60th IIRB Congress, Cambridge, UK, 1-3 July 1997. pp. 465-468.
- KARATOLOS N., WILLIAMSON M.S., DENHOLM I., GORMAN K., FFRENCHCONSTANT R.H., BASS C., 2012 – *Overexpression of a cytochrome P450 is associated with resist-*

- ance to pyriproxyfen in the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. - PLoS ONE; 2012.7: 2, e31077.
- MARGARITOPOULOS J.T., BLACKMAN R.L., TSITSIPIS J.A., SANNINO L., 2003 – *Co-existence of different host-adapted forms of the Myzus persicae group (Hemiptera: Aphididae) in southern Italy*. - Bull Entomol. Res., 93: 131-135.
- MAZZONI E., PANINI M., ANACLERIO M., 2012 – *Resistenza agli insetticidi neonicotinoidi in popolazioni emiliano-romagnole dell'afide verde del pesco*. In: Atti delle Giornate Fitopatologiche 13-16 marzo 2012, Milano Marittima (RA), pp. 155-160.
- MAZZONI E., CRAVEDI P., 2002 - *Analysis of insecticide-resistant Myzus persicae (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards*. - Pest Manag. Sci., 58: 975-980.
- MOORES G.D., DEVINE G.J., DEVONSHIRE A.L., 1994 – *Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in Myzus persicae and Myzus nicotianae*. - Pest. Biochem. Physiol., 49: 114-120.
- MOORES G.D., DEVONSHIRE A.L., DENHOLM I., 1988 – *A microtitre plate assay for characterizing insensitive acetylcholinesterase genotypes of insecticide-resistant insects*. - Bull. Entomol. Res., 78: 537-544.
- NABESHIMA T., KOZAKI T., TOMITA T., KONO Y., 2003 – *An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, Myzus persicae*. - Biochem. Bioph. Res. Comm., 307: 15-22.
- NEEDHAM P.H., SAWICKI R.M., 1971 – *Diagnosis of resistance to organophosphorus insecticides in Myzus persicae (Sulz.)*. - Nature, 230: 125-126.
- NWANE P., ETANG J., CHOUAIBOU M., TOTO J.C., KOFFI A., MIMPFOUNDI R., SIMARD F., 2013 – *Multiple insecticide resistance mechanisms in Anopheles gambiae s.l. populations from Cameroon, Central Africa*. - Parasites and Vectors; 6: 41, (22 February 2013).
- PHILIPPOU D., FIELD L., MOORES G., 2010 – *Metabolic enzyme(s) confer imidacloprid resistance in a clone of Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) from Greece*. - Pest Manag. Sci., 66: 390-395.
- PUINEAN A.M., FOSTER S.P., OLIPHANT L., DENHOLM I., FIELD L.M., MILLAR N.S., WILLIAMSON M.S., BASS C., 2010 – *Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid Myzus persicae*. - PLoS Genetics, 6: e1000999.
- REYES M., ROCHA K., ALARCON L., SIEGWART M., SAUPHANOR B., 2012 – *Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad*. - Pest. Biochem. Physiol.; 102: 45-50.
- RIVERON J.M., IRVING H., NDULA M., BARNES K.G., IBRAHIM S.S., PAINE M.J.I., WONDJI C.S., 2013 – *Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles funestus*. - Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America, 110: 252-257.
- RIVI M., MONTI V., MAZZONI E., CASSANELLI S., PANINI M., ANACLERIO M., CIGOLINI M., CORRADETTI B., BIZZARO D., MANDRIOLI M., MANICARDI G.C., 2013 – *A1-3 chromosomal translocations in Italian populations of the peach potato aphid Myzus persicae (Sulzer) not linked to esterase-based insecticide resistance*. - Bull. Entomol. Res., DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485312000685>.
- RIVI M., MONTI V., MAZZONI E., CASSANELLI S., PANINI M., BIZZARO D., MANDRIOLI M., MANICARDI G.C., 2012 – *Karyotype variations in Italian populations of the peach potato aphid Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)*. - Bull. Entomol. Res., 102: 663-671.
- SCHULER M.A., 2012 - *Insect P450s: mounted for battle in their war against toxins*. - Mol. Ecol.; 21: 4157-4159.
- SHANG Q.L., PAN YIOU, FANG KUI, XI JINGHUI, BRENNAN J.A., 2012 – *Biochemical characterization of acetylcholinesterase, cytochrome P450 and cross-resistance in an omethoate-resistant strain of Aphis gossypii Glover*. - Crop Prot.; 31: 15-20.
- SLATER R., PAUL V.L., ANDREWS M., GARBAY M., CAMBLIN P., 2012 – *Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (Myzus persicae) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain*. - Pest Manag. Sci., 68: 634-638.
- TOOR R.F.V., FOSTER S.P., ANSTEAD J.A., MITCHINSON S., FENTON B., KASPROWICZ L., 2008 – *Insecticide resistance and genetic composition of Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae) on field potatoes in New Zealand*. - Crop Prot., 27: 236-247.

RECENT ADVANCES IN UNDERSTANDING AND COMBATING INSECTICIDE RESISTANCE

IAN DENHOLM (*)

(*) *Rothamsted Research and the University of Hertfordshire, UK*; e-mail: ian.denholm@rothamsted.ac.uk

Sintesi della lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi”. Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

SYNTHESIS – In recent years, a relentless rise witnessed since the 1960s in the number of arthropod species exhibiting resistance to insecticides has slowed down, probably because there is only a finite number of species exposed to sufficiently intense selection for resistance to occur. Instead, many of those species that do encounter continued and intensive exposure to chemicals have shown a gradual broadening of resistance phenotypes caused by cross-resistance, whereby a single mechanism confers protection to several (mostly closely-related) insecticides, and by the appearance of multiple mechanisms in the same individual. The mechanisms can be diverse but most commonly involve either enhanced detoxification by enzymes encoded by multi-gene families (eg. cytochrome P450-dependent monooxygenases), or a mutation to the insecticide's target site – usually a receptor protein – that reduces toxin binding without altering its normal function. Our understanding of resistance mechanisms is benefiting hugely from advances in transcriptomics and ge-

nomics, enabling genes causing resistance to be identified, cloned, sequenced and their expression analysed far more rapidly than was possible in the past. In many cases, resolution of the underlying changes has led to rapid-throughput diagnostics for use in large-scale monitoring programmes. The tactics available for combating resistance are frequently limited by practical considerations but invariably entail reducing or diversifying selection pressures, taking advantage of compounds with contrasting modes of action and/or non-chemical options for control. Advances in theoretical approaches and computing power also have the potential to contribute to fine-tuning resistance management strategies. Numerous organisations and initiatives have been developed to promote awareness of resistance and to co-ordinate the development and implementation of anti-resistance strategies. New developments with resistance research and management will be reviewed with particular emphasis on neonicotinoid insecticides and hemipteran pest species.

LA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI NEI LEPIDOTTERI: CYDIA POMONELLA COME CASO STUDIO

GIAN CARLO MANICARDI (*) - STEFANO CASSANELLI (*)

(*) Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Cydia pomonella as a tool for the study of insecticide resistance in Lepidoptera

The codling moth, *Cydia pomonella* (Cp) is a major pest in most pome fruit orchards worldwide. Under the selective pressure caused by an increasing number of chemical treatments, Cp has developed a reduced sensitivity towards different pesticides. In this paper, we overviewed the mechanisms of insecticide resistance in Cp populations with particular emphasis on data collected in Emilia-Romagna orchards showing that the reduced susceptibility to insecticide treatments seems to be mainly caused by an increased MFO activity with a minor contribution of GST. Target-site mutations within AChE-1 seems a rare phenomenon world wide, since they were found in Spain only. Given the complexity of the mechanisms of resistance found so far in Cp, only the availability of breeding population that can be maintained under selection pressure, will allow to explore the genetic basis of resistance with greater chance of success.

The understanding of the molecular basis of the resistance mechanisms is the starting point in order to allow the adoption of novel pest management strategies directed to circumvent and/or delay resistance outbreaks and to control the insensitive pests.

KEY WORDS: codling moth; insecticide resistance; MFO; GST; Esterase; target site mutations;

L'ordine dei lepidotteri comprende oltre un centinaio di famiglie e, di queste, una ventina sono considerate dannose per agricoltura. In Italia i maggiori problemi sono relativi a 4 specie: *Cydia pomonella* (carpocapsa) e *C. molesta*, *Lobesia botrana* a cui va aggiunta la recente diffusione di *Tuta absoluta*.

In questo lavoro intendiamo soffermare la nostra attenzione sulla carpocapsa (Cp), uno degli insetti più dannosi per le Pomacee; si tratta di una specie ad origine eurasiatica che durante gli ultimi due secoli ha avuto una diffusione cosmopolita seguendo la diffusione delle sue piante ospiti (BARNES, 1991). Le sue larve, carpofaghe, danneggiano direttamente i frutti, provocando ingenti perdite produttive, sia in relazione alla qualità che alla quantità, per la frutticoltura mondiale delle Pomacee. Nei frutti di pero e melo le larve entrano attraverso un qualsiasi punto dell'epicarpo. Su frutti non maturi, la larva penetra nella zona sottoepidermica scavando una galleria spiralata, in seguito si dirige verso la zona carpellare per nutrirsi dei semi. Sui frutti maturi, la larva entra invece direttamente nella polpa, raggiunge e divora i semi. Gli attacchi sferrati dal fitofago, se non controllati tempestivamente attraverso adeguate pratiche di prevenzione, provocano gravi lesioni dei frutti che, così danneggiati, finiscono per cadere al

suolo. A causa dell'alto valore della coltura ospite e degli standard di qualità rigorosi per i mercati locali e di esportazione vi è un tolleranza zero per i danni.

Nell'intento di minimizzare le infestazioni è stato fatto un ampio uso di insetticidi col risultato di favorire la selezione di popolazioni resistenti ad una vasta gamma di prodotti chimici nelle principali zone di produzione delle pomacee (REYES *et al.*, 2007). Nonostante l'introduzione di mezzi di lotta alternativi quali l'impiego della confusione sessuale (WITZGALL *et al.*, 2008), delle applicazioni dei granulovirus (LACEY *et al.*, 2008) e, in alcuni paesi, della tecnica dell'insetto sterile (TARET *et al.*, 2010), nei programmi di gestione integrata l'applicazione di insetticidi ad ampio spettro è ancora ampiamente diffusa (CANELA *et al.*, 2000; LACEY *et al.*, 2008).

SITUAZIONE GENERALE RELATIVA ALLA COMPARS E DIFFUSIONE DELLA RESISTENZA AGLI AGROFARMACI IN CARPOCAPSA

Per molto tempo, il controllo chimico ha rappresentato il metodo di lotta più diffuso per questo fitofago. Nel corso dell'ultimo secolo l'industria agro-chimica ha subito una continua evoluzione guidata dalla necessità di fornire principi attivi ad

azione sempre più efficace nei confronti del fitofago bersaglio e, nei limiti del possibile, con effetti minori sugli insetti utili e sull'ambiente. Per quanto riguarda carpocapsa, si è così passati dall'arseniato di piombo al DDT, quindi agli esteri fosforici, carbammati e piretroidi, per arrivare ai regolatori di crescita (IGR) e ai neonicotinoidi.

I primi casi di resistenza in popolazioni di *Cp* sono stati segnalati all'inizio del secolo scorso nei confronti di arseniato di piombo (HOUGH, 1928). In seguito, sono stati identificati casi di insensibilità ai trattamenti con DDT (CUTWRIGHT, 1954) e, da allora, si sono susseguite segnalazioni di mancata efficacia praticamente a carico di ogni gruppo chimico utilizzato.

Storicamente, il controllo di *C. pomonella* è stato raggiunto attraverso l'utilizzo di insetticidi ad ampio spettro d'azione e, a partire dalla metà del secolo scorso, si è basato principalmente su insetticidi organofosforici (OP); un OP in particolare, azynphos-methyl, è stato ampiamente utilizzato sin dalla sua introduzione agli inizi degli anni '60 (BARNES e MOFFITT, 1963). Inizialmente, l'uso di azynphos-methyl ha portato alla soppressione di molti parassiti delle Pomacee, riducendo l'introduzione e l'utilizzo di altri insetticidi ad ampio spettro d'azione. Sebbene fossero disponibili OP alternativi, la loro limitata efficacia ed elevata attività residua ha fatto sì che questo principio attivo restasse il più frequentemente utilizzato.

Casi di inefficacia dell'azynphos-methyl sono stati documentati per la prima volta in California nel 1989 (VARELA *et al.*, 1993) mentre resistenza al Parathion, un altro OP, è stata riscontrata su *Cp* in meleti del Nord Carolina (BUSH *et al.*, 1993). In tali aree, i coltivatori hanno affrontato grandi difficoltà nel mantenimento del controllo di *Cp* tanto che si è reso necessario incrementare la frequenza dei trattamenti fino al limite massimo legale (VARELA *et al.*, 1993). In altri casi, per aumentare l'efficacia dell'azynphos-methyl, i coltivatori sono ricorsi all'uso addizionale di phosmet (OP), oppure esfenvalerato (piretroide). Recentemente l'azynphos-methyl è stato escluso dai disciplinari mentre è stato mantenuto chlorpyrifos, per il quale non sono stati per ora descritti casi eclatanti di ridotta sensibilità.

In Europa, gli stessi OP utilizzati per controllare la diffusione di *Cp*, hanno fornito risultati inferiori rispetto agli Stati Uniti per cui sono stati affiancati da altri principi attivi, tra i quali i piretroidi e i regolatori della crescita (IGR). Tra i piretroidi i primi casi di resistenza hanno riguardato la deltametrina (SAUPHANOR *et al.*, 1998a). Le basi molecolari della resistenza ai piretroidi sono state in parte chiarite, essendo dovute alla modificazione

del canale del sodio (mutazione *kdr*) (BRUNBARALE *et al.*, 2005). Attualmente la resistenza dovuta a mutazioni a carico del gene *kdr* risulta ampiamente diffusa essendo stata segnalata in varie nazioni europee (Bulgaria, Repubblica Ceca, Francia, Italia, Spagna, Svizzera), così come in America del Sud, Armenia, Nuova Zelanda e Stati Uniti (REYES *et al.*, 2007; 2009).

Altri potenziali sostituti dell'azynphos-methyl, nel trattamento di alberi da frutto, sono i regolatori di crescita degli insetti (IGRs), nonostante abbiano mostrato anch'essi problemi di efficacia, vista la segnalazione di ceppi resistenti (MOFFITT *et al.*, 1988; SAUPHANOR and BOUVIER, 1995; SAUPHANOR *et al.*, 1998b).

La segnalazione di popolazioni resistenti già poco tempo dopo l'utilizzo di nuovi principi attivi sia in Europa (REYES *et al.*, 2007) che negli Stati Uniti (MOTA-SANCHEZ *et al.*, 2008) suggerisce che questa scarsa efficacia sia da attribuirsi al fenomeno della cross-resistenza (fenomeno caratterizzato dallo sviluppo di resistenza anche nei confronti di un principio attivo diverso da quello al quale il fitofago è stato esposto). A questo proposito va ricordato che una potenziale cross-resistenza tra benzoylurea (IGRs), benzoilidrazina (IGRs), piretroidi ed OP è stata evidenziata su popolazioni selezionate in laboratorio con IGRs e piretroidi, (SAUPHANOR *et al.*, 1998c). Da sottolineare anche la ridotta sensibilità nei confronti di thiacloprid, insetticida appartenente alla categoria dei neonicotinoidi, rilevata in popolazioni greche poco tempo dopo la sua registrazione in questo paese (MARGARITOPOULOS *et al.*, 2011). Analoghe segnalazioni nei confronti di principi attivi introdotti di recente provengono anche dalla Francia (e.g., thiacloprid and spinosad) [REYES *et al.*, 2007] o addirittura prima della registrazione ufficiale per il tebufenozide (SAUPHANOR e BOIVIER, 1995). Considerando che i neonicotinoidi non sono ancora stati utilizzati in maniera intensive in Grecia, è molto probabile che la resistenza nei confronti del thiacloprid sia dovuta ad una resistenza metabolica non specifica. I dati precedentemente esposti mettono in evidenza l'esigenza di sviluppare studi sulla cross-resistenza, allo scopo di identificare insetticidi alternativi nella lotta ai lepidotteri.

Dal punto di vista molecolare, sono vari i meccanismi implicati nella detossificazione e metabolizzazione di xenobiotici ed in particolare di insetticidi; i principali sistemi sono: Ossidasi a funzione mista (MFO), CarbossilEsterasi (EST) e Glutathione-transferasi (GST). La resistenza ad un ampio spettro nei confronti degli insetticidi può essere dovuta ad un incremento dell'attività di

ognuno di questi meccanismi (SAUPHANOR *et al.*, 1998°; BOIVIN *et al.*, 2001; BOUVIER *et al.*, 2001; DUNLEY *et al.*, 2000) anche in relazione allo stadio larvale dell'insetto (BOUVIER *et al.*, 2002).

Dati ottenuti nel corso di uno studio sulla diffusione della resistenza in popolazioni greche di Cp (MARGAREITOPULOS *et al.*, 2011) mostrano che le EST contribuiscono alla comparsa di insensibilità nei confronti di diversi principi attivi in modo apparentemente paradossale. Infatti, è stata trovata una correlazione negativa tra attività esterasica e suscettibilità ad azinphos-methyl e/o phosalone. Dati simili sono stati segnalati anche in popolazioni spagnole (RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Questo risultato inatteso, può essere spiegato ipotizzando la presenza di isoforme di EST con attività idrolasica ridotta nei confronti di substrati specifici usati per il saggio biochimico, ma elevata nei confronti degli insetticidi (BUSH *et al.*, 1993). Altri studi mettono in evidenza correlazioni negative (BUSH *et al.*, 1993; REYES *et al.*, 2007), positive (RODRIGUEZ *et al.*, 2010; SOLENO *et al.*, 2008) ovvero assenza di correlazione (FUENTES-CONTRERAS *et al.*, 2007) tra attività EST e resistenza nei confronti di azinphos-methyl. Queste ampie variabilità di risposte possono essere determinate da specifiche differenze tra popolazioni o/e dalla presenza di diverse pressioni selettive ma non bisogna trascurare la possibilità che siano anche stati influenzate dall'uso di diversi substrati nei protocolli diagnostici (BUSH *et al.*, 1993; REYES *et al.*, 2007; 2011; RODRIGUEZ *et al.*, 2010; REUVENY e COHEN, 2004). Un possibile coinvolgimento delle esterasi nella insensibilità a tebufenozide (REYES *et al.*, 2007) e piretroidi (SAUPHANOR *et al.*, 1997; MARAGRITOPOULOS *et al.*, 2011) è stata rilevata anche in popolazioni analizzate allo stadio larvale.

L'analisi di dati di letteratura relativa allo studio dei diversi complessi enzimatici coinvolti nella cosiddetta "resistenza metabolica" mostra come essi contribuiscano in maniera diversa a seconda delle aree geografiche di origine delle popolazioni analizzate (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Per esempio, la detossificazione nei confronti di azinphos-methyl è stata associata ad un incremento dell'attività EST in popolazioni Argentine (SOLENO *et al.*, 2008), un coinvolgimento del sistema MFO è stato segnalato in Italia (IORIATTI *et al.*, 2007) delle GST in Cile (REYES *et al.*, 2004; FUENTES-CONTRERAS *et al.*, 2007). Infine, REUVENY and COHEN (2004) hanno verificato che, in popolazioni israeliane, il principale meccanismo di resistenza sia dovuto ad una scarsa affinità dell'acetilcolinesterasi (AChE) al principio attivo mentre l'attività MFO e GST non sembra essere coinvolta.

Saggi *in vivo* e saggi biochimici svolti su ceppi

francesi dal centro di riferimento internazionale dell'INRA di Avignone, fanno supporre che il meccanismo di resistenza all'azinphos-methyl consista in una modificazione della proteina bersaglio, l'acetilcolinesterasi, la quale diventa insensibile all'azione inibitoria dell'insetticida e/o a un aumento della attività di sistemi di detossificazione (EST e MFO). Analogo risultato è stato raggiunto da ricercatori israeliani (REUVENY *et al.*, 2004). Recentemente, sono stati clonati due geni che codificano per l'acetilcolinesterasi e descritta una mutazione associata alla insensibilità all'azinphos-methyl in un ceppo di origine spagnola (CASSANELLI *et al.*, 2006). Sino ad oggi questa mutazione è stata rinvenuta solo in popolazioni spagnole (REYES *et al.*, 2007; 2009). Al momento non ci sono spiegazioni inequivocabili in grado di giustificare la scarsa diffusione di questa mutazione. Un'ipotesi che si può proporre è che i costi in termini di riduzione di fitness della resistenza metabolica (ampiamente presente a seguito del largo uso di organofosforici) possano essere inferiori rispetto a quelli indotti dalla resistenza target site.

Nonostante l'introduzione di mezzi di lotta alternativi quali l'impiego della confusione sessuale (WITZGALL *et al.*, 2008), delle applicazioni dei granulovirus (LACEY *et al.*, 2008) e, in alcuni paesi della tecnica dell'insetto sterile (TARET *et al.*, 2010), nei programmi di gestione integrata l'applicazione di insetticidi ad ampio spettro è ancora ampiamente diffusa (CANELA *et al.*, 2000, LACEY *et al.*, 2008).

L'analisi dei dati sopra riportati mette in evidenza che l'impiego di prodotti ad ampio spettro d'azione ha favorito lo sviluppo sia di resistenza multipla che di resistenza crociata (SAUPHANOR *et al.*, 1998; STARA e KOCOUREK, 2007; MOTA-SANCHEZ *et al.*, 2008; KNIGHT, 2010), e conseguentemente sono stati segnalati numerosi casi di resistenza sia in Europa che in regioni extraeuropee (REYES *et al.*, 2007, 2009). La Cp può essere considerata un caso speciale tra gli insetti di interesse agrario, dal momento che presenta casi di resistenza/tolleranza praticamente nei confronti di tutti i principi attivi sinora utilizzati per il suo controllo e questo costituisce un problema anche nella fase di sviluppo di nuovi agro farmaci.

LA SITUAZIONE DELLA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI IN EMILIA ROMAGNA

A partire dal 1997 nelle province di Bologna, Modena e Ferrara si sono segnalati numerosi casi di aziende con elevati danni alla raccolta di pere causati da carpocapsa, nonostante il progressivo aumento del numero degli interventi difensivi con insetticidi organofosforici (OP). È stata così ipo-

tizzata la presenza di popolazioni resistenti al trattamento effettuato con azynphos-methyl, un OP dell'ultima generazione, largamente utilizzato nella lotta alla carpocapsa (BOSELLI, 2002).

Il Servizio fitosanitario regionale ha pertanto avviato un'attività di monitoraggio della resistenza agli insetticidi fosfororganici (OPs) e ai regolatori della crescita (IGRs) in popolazioni emiliano-romagnole di *C. pomonella*, mediante l'impiego combinato di analisi biochimiche, volte a saggiare le principali attività detossificanti, e di analisi genetiche, che prevedono la ricerca di eventuali mutazioni nel gene che codifica per l'acetilcolinesterasi 1 (AChE-1) CASSANELLI *et al.*, 2008; 2010).

Per quanto riguarda le popolazioni di campo, la ridotta suscettibilità ai trattamenti sembra essere attribuibile principalmente alle MFO e in seconda battuta alle GST mentre le EST sembrano avere un coinvolgimento marginale (Fig.1). Da sottolineare l'elevata variabilità intra-popolazione che può essere spiegata sia sulla base della eterogeneità genetica che della diversa pressione selettiva esercitata in campo (CASSANELLI *et al.*, 2010). Il profilo metabolico riscontrato concorda con quanto riportato in letteratura per le popolazioni europee di carpocapsa con una ridotta sensibilità ai trattamenti, che prevedono l'uso alternato di OP e IGR (REYES *et al.*, 2007). Il ruolo prevalente della attività detossificante a carico delle MFO è probabilmente riconducibile ad una maggiore copertura offerta da questo sistema detossificante, garantita da un numero più elevato di geni e da una maggiore flessibilità nei confronti del substrato, rispetto alla famiglia delle GST e delle EST.

In generale l'utilizzo dei test biochimici mostra una buona sensibilità (l'aumento delle attività metaboliche in genere si accompagna ad una ridotta efficacia di uno o più principi attivi) ma una ridotta specificità che si traduce nell'impossibilità di associare l'incremento di una o più attività detossificanti con la ridotta suscettibilità ad un singolo principio attivo. Sulla base di queste considerazioni si può affermare che i test biochimici sono strumenti predittivi della ridotta suscettibilità all'agrofarmaco se impiegati a supporto delle prove di campo ma non orientativi nell'utilizzo dei principi alternativi efficaci.

Per aumentare specificità e capacità di orientamento all'uso dei principi alternativi dei test di laboratorio, è richiesta l'identificazione dei singoli geni della famiglia del sistema detossificante prevalente associato al quadro di resistenza.

Queste considerazioni sottolineano l'esigenza di semplificare lo studio dei meccanismi di resistenza mediante la creazione di popolazioni modello selezionate in laboratorio, che permettano di isolare i marcatori funzionali legati effettivamente al fenotipo insensibile dal rumore di fondo imposto dalla variabilità genetica.

A questo proposito, dati raccolti nell'ambito del progetto regionale precedentemente citato mostrano che tre cicli di selezione con tebufenozide (Mimic) condotti su una popolazione romagnola inducono un aumento significativo della attività MFO (circa 4 volte), col dosaggio del principio attivo meno elevato mentre l'incremento è ridotto a circa 2,5 volte nella larve selezionate col dosaggio di 6 mg di p.a./l (Fig. 2) (CASSANELLI *et al.*, 2010). Questo risultato potrebbe essere causato da un effetto tos-

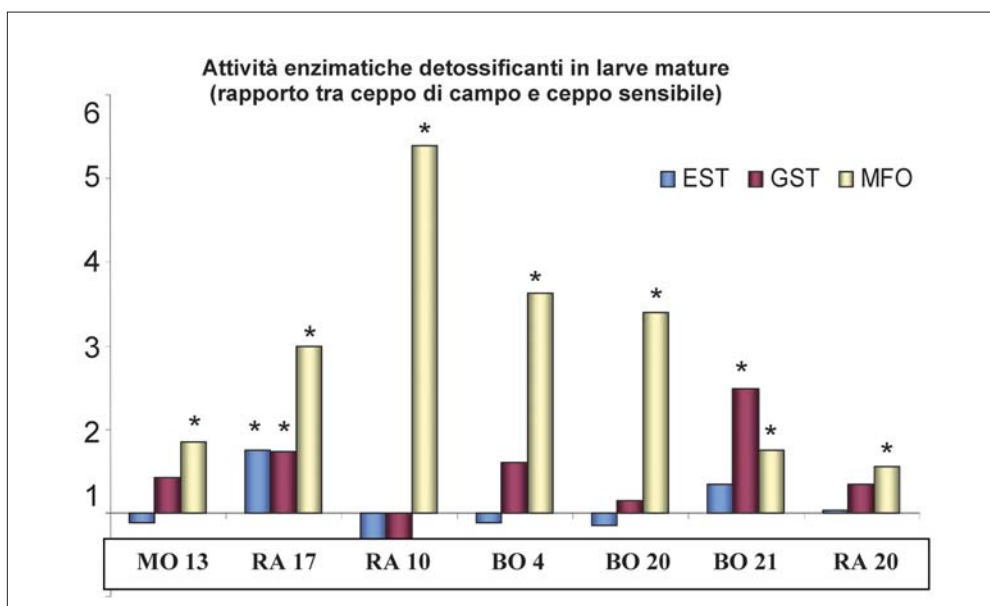


Fig. 1
Attività enzimatiche rispetto ad un ceppo sensibile valutate in diverse popolazioni emiliane di *Cp*. Differenze statisticamente significative sono indicate con un asterisco ($p < 0,05$; Mann-Whitney test).

sico del principio attivo applicato al dosaggio più elevato non totalmente compensato dalle maggiori capacità di detossificazione degli individui resistenti. Questa ipotesi è supportata dall'evidente ritardo nei tempi maturazione larvale che si verifica all'aumentare del dosaggio del principio attivo.

La selezione topica con chlorpyrifos evidenzia una lieve riduzione dell'attività esterasica (circa 1,7 volte) rispetto al controllo (Fig. 3) (CASSANELLI *et al.*, 2010). Questo dato, peraltro già segnalato in popolazioni greche (MARGARITOPOULOS *et al.*, 2011) può essere spiegato ipotizzando che il trattamento con chlorpyrifos abbia selezionato isoforme esterasiche modificate con una bassa affinità per il substrato usato per l'analisi, ma probabilmente dotate di una migliore capacità metabolica nei confronti dell'insetticida.

Non sono state evidenziate mutazioni nel gene *AChE-1* potenzialmente responsabili della resistenza

“target site” (sostituzioni aminoacidiche) (CASSANELLI *et al.*, 2010). Sono invece state individuate mutazioni sinonime (sostituzioni nucleotidiche) che non comportano variazioni nella sequenza aminoacidica nella *AChE-1* ma che possono contribuire alla realizzazione di un panel di marcatori genetici per monitorare variazioni nella composizione della popolazione in risposta ai trattamenti

Data la complessità dei meccanismi di resistenza che sono stati sinora evidenziati in Cp, risulta di importante la disponibilità di popolazione in allevamento sotto selezione, in modo tale da:

- a) consentire una precisa identificazione, seguita dal clonaggio dei geni dei sistemi detossificanti prevalenti per ottenere marcatori genetici specifici per la ridotta suscettibilità al principio attivo utilizzato per la selezione;
- b) tracciare il profilo biochimico MFO, GST e EST nei diversi stadi di sviluppo;
- c) verificare l'eventuale co-selezione della resistenza ad altri principi attivi presenti nella popolazione di campo originaria;
- d) valutare l'efficacia di nuovi principi attivi.

BIBLIOGRAFIA

- BARNES M.M., 1991 – *Codling moth occurrence, host race formation and damage*. In: Van der Geest L.P.S., Evenhuis H.H. (Eds.) *Tortricid Pests. Their Biology, Natural Enemies and Control*. - Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 313–328.
- BARNES M.M., MOFFITT H.R., 1963 – *Resistance to DDT in the adult codling moth and reference curves for guthion and carbaryl*. - J. Econ. Entomol. 56: 722-725.
- BOIVIN T., CHABERT D'HIERES C., BOUVIER J.C., BESLAY D., SAUPHANOR B., 2001 – *Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, Cydia pomonella*. - Entomol. Exp. Appl., 99: 381-386.
- BOSELLI M., 2002 – *I metodi alternativi nella lotta alla Carpocapsa*. - Agricoltura 3: 58-59.
- BOUVIER J.C., BUÈS-R., BOIVIN T., BOUDINHON L., BESLAY D., SAUPHANOR B., 2001 – *Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved*. - Heredity, 87: 456-462.
- BOUVIER J.C., BOIVIN T., BESLAY D., SAUPHANOR B., 2002 – *Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae*. - Arch. Insect Biochem, Physiol., 51: 55-66.
- BRUN-BARALE A., BOUVIER J.C., PAURON D., BERGE J.B., SAUPHANOR B., 2005 – *Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in Cydia pomonella L, and development of a diagnostic test*. - Pest Manag. Sci., 61: 549-554.
- BUSH M.R., ABDEL AAL Y.A.I., ROCK G.C., 1993 – *Parathion resistance and esterase activity in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Nord Carolina*. - J. Econ. Entomol., 86: 660-666.
- CANELA, R., BALCELLS M., DALMAU L., AVILLA, J., 2000 – *Ovicidal, larvicidal and juvenilizing activity of a picolinephenoxylanilide against Cydia pomonella*. - Pest Manag. Sci., 56: 586-590.
- CASSANELLI S., REYES M., RAULT M., MANICARDI G.C., SAUPHANOR B., 2006 – *Acetylcholinesterase mutation in an*

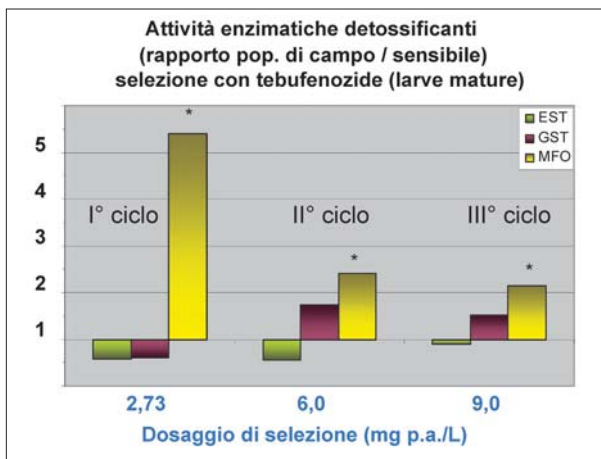


Fig. 2

Attività enzimatiche rispetto ad un ceppo sensibile valutate in una popolazione di Cp sottoposta a selezione con tebufenozide. Differenze statisticamente significative sono indicate con un asterisco ($p < 0,05$; Mann-Whitney test).

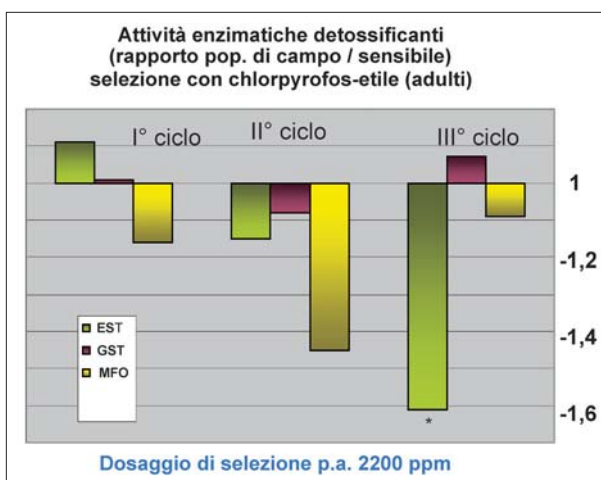


Fig. 3

Attività enzimatiche rispetto ad un ceppo sensibile valutate in una popolazione di Cp sottoposta a selezione con chlorpyrifos-etile. Differenze statisticamente significative sono indicate con un asterisco ($p < 0,05$; Mann-Whitney test).

- insecticide resistant population of the codling moth Cydia pomonella (L.)*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 6: 642-653.
- CASSANELLI S., FARINELLI V., ANCeschi E., BUTTURINI A., CAROLI L., MANICARDI G.C., 2008 – *Analisi biochimiche e molecolari applicate allo studio della resistenza agli agrofarmaci di carpocapsa in Emilia-Romagna*. - Atti Giornate Fitopatologiche 2008, I, 93-100 2008
- CASSANELLI S., RIVI M., BUTTURINI A., MELANDRI M., CASALI G., ZANZI L., PAGNI M.A., PRADOLESI G., MANICARDI G.C., 2010 – *Monitoraggio delle resistenze agli insetticidi in popolazioni emiliano-romagnole di carpocapsa con metodi biochimici e molecolari*. - Atti Giornate Fitopatologiche 2010, 1: 31-38
- CUTWRIGHT C.R., 1954 – *A codling moth population resistance to DDT*. - J. Econ. Entomol., 47: 189-190
- DUNLEY J.E., WELTER S.C., 2000 – *Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera: Tortricidae)*. - J. Econ. Entomol. Jun. 2000, 93 (3): 955-62.
- FUENTES-CONTRERAS E., REYES M., BARROS W., SAUPHANOR B., 2007 – *Evaluation of azinphosmethyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile*. - J. Econ. Entomol., 100: 551-556.
- HOUGH W.S., 1928 – *Relative resistance to arsenical poisoning of two codling moth strains*. - J. Econ. Entomol., 221: 325-329.
- KNIGHT A.L., 2010 – *Cross-resistance between azinphosmethyl and acetamiprid in populations of codling moth, Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), from Washington State*. - Pest Manag. Sci., 66: 865-874
- IORIATTI C., TASIN M., CHARMILLOT P.J., REYES M., SAUPHANOR B., 2007 – *Early resistance to tebufenozide in field populations of Cydia pomonella L.: methods and mechanisms*. - J. Appl. Entomol. 131: 453-459.
- LACEY L.A., THOMSON D., VINCENT C., ARTHURS. S.P., 2008 – *Codling moth granulovirus: a comprehensive review*. - Biocontrol Sci. Technol., 18: 639-663.
- VOUDOURIS C.C., SAUPHANOR B., FRANCK P., REYES M., MAMURIS Z., TSITSIPIS J.A., VONTAS J., MARGARITOPOULOS J.T., 2011 – *Insecticide resistance status of the codling moth Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece*. - Pesticide Biochem. Physiol., 100: 229-238.
- MOTA-SANCHEZ D., WISE J.C., POPPEN R.V., GUT L.J., HOLLINGWORTH R.M., 2008 – *Resistance of codling moth, Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), larvae in Michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity*. - Pest. Manag. Sci., 64: 881-890
- MOFFITT H.R., WESTIGARD P.H., MANTEY K.D., VAN DE BAAN H.E., 1988 – *Resistance to diflubenzuron in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae)*. - J. Econ. Entomol., 81: 1511-1515.
- REUVENY H., COHEN E., 2004 – *Evaluation of mechanisms of azinphos-methyl resistance in the codling moth Cydia pomonella (L.)*. - Arch. Insect. Biochem., 57: 92-100.
- REYES M., BOUVIER J.C., BOIVIN T., FUENTES-CONTRERAS E., SAUPHANOR B., 2004 – *Susceptibilidad a insecticidas y actividad enzimática de Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae) provenientes de tres huertos de manzano de la región del Maule*. - Chile Agric. Tecnol., 64: 229-237.
- REYES M., FRANCK P., CHARMILLOT P.J., IORIATTI C., OLIVARES J., PASQUALINI E., SAUPHANOR B., 2007 – *Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, Cydia pomonella*. - Pest Manag. Sci., 63: 890-902.
- REYES M., FRANCK P., OLIVARES J., MARGARITOPOULOS J., KNIGHT A., SAUPHANOR B., 2009 – *Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae)*. - Bull. Entomol. Res. 99: 359-369.
- REYES M., COLLANGE B., RAULT M., CASSANELLI S., SAUPHANOR B., 2011 – *Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)*. - Pestic. Biochem. Physiol., 99: 25-35.
- RODRÍGUEZ M., BOSCH D., SAUPHANOR B., AVILLA J., 2010 – *Susceptibility to organophosphate insecticides and activity of detoxifying enzymes in Spanish populations of Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)*. - J. Econ. Entomol., 103: 482-491.
- RODRÍGUEZ M., BOSCH D., AVILLA J., 2012 – *Azinphosmethyl and carbaryl resistance in adults of the codling moth (Cydia pomonella (L.), Lepidoptera: Tortricidae) from Northeastern Spain*. - Pesticide Biochem. Physiol., 103: 43-48
- SAUPHANOR B., BOUVIER J.C., 1995 – *Cross resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, Cydia pomonella L.* - Pestic. Sci., 45: 369-75.
- SAUPHANOR B., CUANY A., BOUVIER J.C., BROSE V., BERGE J.B., 1997 – *Mechanism of resistance to deltamethrin in field populations of Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae)*. - Pesticide Biochem. Physiol., 58: 109-117.
- SAUPHANOR B., AVILLA J., CHARMILLOT P.J., IORIATTI C., MATIAS C., WALDNER W., 1998a – *Coping with insecticide resistance in fruit production: the example of codling moth resistance in Europe*. 6th European Congress of Entomology. Budejovic, Czech Republic 23-29-8-1998. In: Brunnhofer V. and Solden T. Eds. Inst. Entom. Acad. Sc. Czech Rep. And UN. South Bohemia, Jernonymova: 619-620.
- SAUPHANOR B., BOUVIER J.C., BROSE V., 1998b – *Spectrum of Insecticide Resistance in Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae) in Southeastern France*. - J. Econ. Entomol., 91, 1225-1231.
- SAUPHANOR B., BROSE V., MONIER C., BOUVIER J.C., 1998c – *Differential ovicidal and larvicidal resistance to benzoylureas in the codling moth, Cydia pomonella*. - Entomol. Exp. Appl., 88: 247-53.
- SOLEÑO J., ANGUIANO L., DE D'ANGELO A.P., CICHÓN L., FERNÁNDEZ D., MONTAGNA C., 2008 – *Toxicological and biochemical response to azinphos-methyl in Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae) among orchards from the Argentinian Patagonia*. - Pest Manag. Sci., 64: 964-970.
- STARÁ J., KOCOUREK F., 2007 – *Insecticidal resistance and cross-resistance in populations of Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae) in Central Europe*. - J. Econ. Entomol., 100: 1587-1595
- TARET G., SEVILLA M., WORNOPORN V., ISLAM A., AHMAD S., CACERES C., ROBINSON A. S., VREYSEN M.J.B., 2010 – *Mating compatibility among populations of codling moth Cydia pomonella Linnaeus (Lepidoptera: Tortricidae) from different geographic origins*. - J. Appl. Entomol., 134: 207-215
- VARELA L.G., WELTER S.C., JONES V.P., BRUNNER J.F., RIEDL H., 1993 – *Monitoring and characterization of insecticide resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in four western states*. - J. Econ. Entomol., 86: 1-10.
- WITZGALL P., STELINSKI L., GUT L., THOMSON D., 2008 – *Codling moth management and chemical ecology*. - Annu. Rev. Entomol., 53: 503-522.

LA RESISTENZA AI PRODOTTI FITOSANITARI IN ACARI FITOFAGI E PREDATORI: ESPERIENZE E CASI DI STUDIO

CARLO DUSO (*) - ALBERTO POZZEBON (*) - STEFANO CASSANELLI (**)
PAOLA TIRELLO (*) - THOMAS VAN LEEUWEN (***)

(*) Dipartimento DAFNAE, Università di Padova, Italia.

(**) Dipartimento di Scienze della vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Italia.

(***) Department of Crop Protection, University of Gent, Belgium.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Resistance to pesticides in phytophagous and predatory mites with case-studies in Italy

The spread of mite populations that evolved resistance to pesticides and the detrimental effects of most pesticides to their natural enemies are major factor affecting spider mite outbreaks. *Tetranychus urticae* has been reported as the most resistant pest worldwide. The spread of resistance in spider mite populations as well as resistance mechanisms have been investigated. Problems associated with resistant populations of *T. urticae* in Italy are reviewed. Resistance management should include biological control using predatory mites but knowledge on pesticide side-effects is essential. Progress in toxicological procedures and will improve knowledge on the compatibility of pesticides and beneficials. Resistance in predatory mites has also been investigated and represents a key factor in IPM tactics.

KEY WORDS: Resistance, pesticides, Acari, Tetranychidae, Phytoseiidae.

ALLE ORIGINI DEI PROBLEMI CON GLI ACARI FITOFAGI

I primi documenti scientifici sull'importanza economica degli acari fitofagi in Italia sembrano risalire alla seconda metà dell'Ottocento. CANESTRINI & FANZAGO (1876, 1877) riportarono numerose entità tra i Tetranychidi, in particolare *Tetranychus lintearius* Dufour e *Tetranychus pilosus* Canestrini & Fanzago. La prima specie, posta successivamente in sinonimia con *Tetranychus telarius* da RICCARDO CANESTRINI (1890), era considerata dannosa alla vite, al mais e al sorgo. Le diffuse infestazioni di *T. telarius* nei vigneti dell'Italia settentrionale e in altri Paesi europei attirarono l'interesse di vari autori (TARGIONI-TOZZETTI, 1876; BERLESE, 1886; LUNARDONI, 1890; CUBONI, 1891). Successivamente, BERLESE (1901) pubblicò una monografia sugli acari di interesse agrario, in cui *T. telarius* era considerata la specie più comune e dannosa tra gli acari fitofagi; con ogni probabilità si trattava di *Tetranychus urticae* Koch. La presenza di *Tetranychus pilosus* Canestrini & Fanzago nei vigneti fu riscontrata da TARGIONI-TOZZETTI (in CUBONI, 1891) e PINOLINI (1896); successivamente, questa specie fu posta in

sinonimia con *Panonychus ulmi* (Koch) (ROTA, 1962). Tra gli Eriofioidei, era noto ma non ritenuto dannoso l'agente dell'erinosi della vite *Colomerus vitis* Pagenstecher (TARGIONI-TOZZETTI, 1870; BRIOSI, 1876; CANESTRINI, 1892). Tra gli autori attivi tra la fine dell'Ottocento e l'inizio del Novecento, solo BERLESE (1901) e RIBAGA (1904) si dedicarono allo studio degli acari predatori, in particolare dei Fitoseidi.

L'interesse nei confronti degli acari fitofagi sembrò affievolirsi nei primi decenni del Novecento. L'impiego dello zolfo si era affermato nel controllo dell'oidio della vite e di altre colture dimostrando una certa attività acaricida. Tuttavia, alcuni ricercatori avevano segnalato una diminuzione dell'efficacia acaricida dello zolfo in alcuni areali viticoli (RATHAY, 1894 in GIROLAMI *et al.*, 1991). Tale fenomeno potrebbe essere stato all'origine delle prime infestazioni di *T. urticae* dato che lo zolfo manifesta, a seconda dei formulati, delle dosi e delle condizioni ambientali, effetti negativi sui predatori dei Tetranychidi (BEERS *et al.*, 2009). Lo sviluppo della resistenza allo zolfo negli acari predatori potrebbe aver ridotto l'entità dei problemi legati ai Tetranychidi della vite nella prima metà del Novecento (GIROLAMI *et al.*, 1991).

L'importanza dei Tetranychidi in frutticoltura raggiunse livelli elevati negli anni '50. Nel 1956, gli specialisti europei riuniti a Wageningen per trattare l'argomento posero in evidenza la crescente dannosità di *T. urticae* e di *P. ulmi* in frutticoltura e l'improvvisa comparsa di *Eotetranychus carpini* (Oudemans) in viticoltura (GASSER, 1956). Il quadro relativo ai Tetranychidi dannosi in frutticoltura in Italia fu delineato con precisione negli anni '60 (ROTA, 1962; ZANGHERI & MASUTTI, 1962; NUCIFORA & INSERRA, 1967). Gli effetti negativi di clororganici ed esteri fosforici sugli antagonisti naturali dei Tetranychidi sono stati evocati tra le principali cause di pullulazione di questi fitofagi (VAN DE VRIE *et al.*, 1972) ma il ruolo dei ditiocarbammati e di altri fungicidi in tale contesto è apparso altrettanto importante (GIROLAMI, 1981; GRUYS, 1982). Alcuni insetticidi e fungicidi sono stati impiegati contro gli stessi Tetranychidi con effetti insoddisfacenti o di apparente stimolazione delle infestazioni. I prodotti "acarostimolanti" furono al centro di un dibattito che aveva l'obiettivo di fornire indicazioni applicative ma che rimase sterile, anche se i ricercatori continuano a interrogarsi sui meccanismi che possono causare tali fenomeni (COHEN, 2006). Data l'inefficacia dello zolfo, degli oli minerali e di molti insetticidi si rese necessaria la disponibilità di prodotti caratterizzati da spiccata attività acaricida nel tentativo di porre un freno all'aggressività dei Tetranychidi.

COMPARSA DEGLI ACARICIDI E LORO EVOLUZIONE NEL TEMPO

Negli anni '50 e '60 l'industria sintetizzò i primi acaricidi specifici tra cui alcuni clororganici (ad es. chlorbenseide, dicofol, dienochlor), solfororganici (ad es. aramite, tetradifon, propargite) e poi stannorganici (ad es. cyhexatin, fenbutatin oxide). L'avvento degli esteri fosforici e dei carbammati non è stato associato a molecole efficaci nei confronti dei Tetranychidi e la resistenza a queste molecole è comparsa rapidamente (nel 1947 per il parathion). Nel corso del tempo l'impiego degli acaricidi si è esteso dal contesto agrario a quelli medico-veterinario e urbano incontrando difficoltà crescenti in termini di efficacia.

Un'interessante ricostruzione storica degli eventi relativi alla comparsa e all'evoluzione della resistenza su melo (*P. ulmi*) e specie ornamentali (*T. urticae*) è riportata in CRANHAM & HELLE (1985). È disponibile un database (pesticideresistance.org) sui casi di resistenza agli insetticidi/acaricidi incontrati nei più disparati contesti (WHALON *et al.*, 2013) da cui sono state stilate

delle classifiche delle specie di artropodi maggiormente coinvolte nei fenomeni di resistenza (ad es. VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). Da un'elaborazione sviluppata considerando il numero di sostanze attive coinvolte in casi di resistenza, il primato in questa speciale classifica spetta a *T. urticae* (resistente a 92 sostanze attive) e nei primi dieci posti risiedono anche *P. ulmi* (46) e l'acaro ematofago *Rhipicephalus microplus* Canestrini (45). In *T. urticae* la resistenza a carico dei principali gruppi di insetticidi e acaricidi è stata riportata in 389 casi (WHALON *et al.*, 2013). La rapidità con cui la resistenza sviluppa in questa specie è alla base delle difficoltà che si incontrano nel suo controllo. La resistenza di *P. ulmi* agli acaricidi è diffusa (189 casi riportati) e interessa abamectin, benzoximate, chlorpyrifos, clofentezine, cyhexatin, fenpyroximate, hexythiazox, propargite, spiroticlofen e altre sostanze attive (WHALON *et al.*, 2013). Studi effettuati in Europa hanno rivelato la presenza di ceppi di *P. ulmi* resistenti a chlorpyrifos, clofentezine e hexythiazox (NAUEN *et al.*, 2001). Tale situazione è stata confermata in Italia (ANGELI *et al.*, 1994; AHMAD S. *et al.*, dati non pubblicati). La necessità di arginare i fenomeni di resistenza ha suggerito di intraprendere studi dettagliati sui meccanismi di azione degli acaricidi. L'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) ha classificato gli acaricidi in gruppi accomunati dallo stesso meccanismo di azione (Tabella 1). Questa classificazione è inserita in quella più vasta riguardante le modalità di azione degli insetticidi e comprende anche alcune sostanze ad attività insetticida-acaricida non più impiegate in Italia o ritirate dal mercato. Tale approccio può risultare utile nella comprensione dei fenomeni associati alla resistenza, nella loro prevenzione e gestione mediante appropriate strategie anti-resistenza.

FATTORI COINVOLTI NELLA RESISTENZA AGLI ACARICIDI IN *T. URTICAE*

I problemi connessi alla resistenza agli acaricidi in *T. urticae* sono stati affrontati sia in Europa (ad es. TSAGKARAKOU *et al.*, 1999; NAUEN *et al.*, 2001; STUMPF & NAUEN, 2001, 2002; VAN LEEUWEN *et al.*, 2010) sia in contesti extraeuropei (ad es. HERRON *et al.*, 1994; FUNAYAMA & TAKAHASHI, 1995; HERRON *et al.*, 1997; BEERS *et al.*, 1998; HERRON & ROPHAIL, 1998, 2003; HERRON *et al.*, 1998). Relativamente all'Italia, le informazioni su tale argomento sono state limitate per molto tempo ad uno studio di ROSSI & CONTI (1997) in cui è stata dimostrata la resistenza di *T. urticae* nei confronti di alcuni prodotti acaricidi (dicofol e tetradifon) e

Tabella 1 – Modalità di azione dei principali acaricidi secondo la classificazione IRAC (www.irac-online.org).

Modalità d'azione (Gruppo IRAC)	Sottogruppo (Gruppo chimico)	Sostanze attive (esempi)
Effetti sul sistema nervoso e muscolare		
1 - Inibitori dell'acetilcolinesterasi	A (Carbammati) B (Organofosfati)	Methomyl Pirimiphos-methyl Endosulfan
2 - Antagonisti interazioni GABA-canali del Cl	A (Cloroderivati ciclodienici)	Bifenthrin, Fluvalinate
3 - Modulatore dei canali del Na	A (Piretrine e Piretroidi)	Abamectin, Milbemectin
6 - Attivatori dei canali del Cl	A (Avermectine e Milbemectine)	Amitraz
19 - Agonisti dei recettori della octopamina		
Effetti sulla respirazione muscolare		
12 - Inibitori della ATP-sintetasi	A B (Stannorganici) C	Diafenthion Azocyclotin, Fenbutatin oxide Propargite
13 - Disaccoppianti della fosforilazione ossidativa (effetti sul flusso protonico)		Chlorfenapyr Acequinocyl
20 - Inibitori del complesso mitocondriale III	B	Pyridaben, Tebufenpyrad
21 - Inibitori del complesso mitocondriale I	A (METI)	Cyenoptyrafen, Cyflumetofen
25 - Inibitori del complesso mitocondriale II	Derivati del beta-ketonitrile	
Effetti sullo sviluppo		
10 - Inibitori dello sviluppo degli acari	A B (Benzoyluree)	Clofentezina, Hexythiazox Etoxazole Flucycloxuron, Flufenoxuron
15 - Inibitori della chitina-sintetasi tipo 0		
23 - Inibitori della acetil-CoA carbossilasi - Sintesi dei lipidi, regolazione della crescita	(Acidi tetronici e tetramici)	Spirodiclofen, Spiromesifen
Acaricidi con modalità d'azione sconosciuta		Benzoximate Chinomethionate Dicofol Bifenazate

insetticidi (fenitrothion e deltamethrin). In seguito, NAUEN *et al.* (2001) hanno riportato l'esistenza di ceppi italiani di *T. urticae* resistenti a clofentezina e hexythiazox.

Lo sviluppo della resistenza negli acari è influenzato da fattori genetici e bio-ecologici e dalle strategie di controllo chimico. Gli adattamenti che consentono ad un acaro di sopravvivere a dosi considerate letali di un insetticida/acaricida possono derivare da una diminuzione della risposta (interazioni prodotto-sito bersaglio) e/o da una ridotta esposizione (es. penetrazione, distribuzione, metabolismo ed escrezione). In molti casi la ridotta sensibilità ad una sostanza attiva si instaura in seguito a variazioni nel sito bersaglio dovute a mutazioni puntiformi e/o ad aumentate capacità di detossificazione di un prodotto (es. esterasi, P450 monossigenasi, glutatione-S-transferasi).

Tra i fattori che hanno favorito lo sviluppo di ceppi resistenti agli acaricidi in *T. urticae* vi sono il breve ciclo di sviluppo ad alte temperature, l'elevata fecondità, la partenogenesi arrenotoca, la polifagia (circa 1100 piante ospiti tra cui orticole, ornamentali, fruttiferi, vite, mais e soia), la limitata mobilità e la tendenza all'imbreding. Queste caratteristiche, unite ad una elevata pressione selettiva, hanno aumentato la comparsa e la diffusione di ceppi resistenti agli acaricidi (GEORGHIOU & LAGUNES-TEJEDA 1991; VAN LEEUWEN *et al.*, 2009, 2010). Le difficoltà insorte nel controllo di *T.*

urticae, così come di *P. ulmi* o *Panonychus citri* (McGregor) sono associate alla comparsa di ceppi multi-resistenti (CRANHAM & HELLE, 1985; KHAJEHALI *et al.*, 2011). Lo studio delle vie di detossificazione dei prodotti fitosanitari può contribuire alla conoscenza di questi fenomeni.

Il sequenziamento del genoma di *T. urticae* ha rivelato straordinari meccanismi di adattamento alla fitofagia che possono contribuire a spiegare la capacità di sviluppare resistenza agli acaricidi mediante meccanismi di detossificazione (GRBIC *et al.*, 2011; DERMAUW *et al.*, 2013). Sono stati individuati numerosi geni per la cisteina peptidasi (digestione proteolitica), 86 geni per il citocromo P450 (espansione dei geni CYP2), 71 geni per le esterasi (CCEs), due nuove cladi CCEs, un unico gene per l'acetilcolinesterasi, un nuovo gruppo di glutatione-S-transferasi (GSTs). L'espressione della maggior parte di questi geni è più elevata che negli insetti e nei mammiferi. Inoltre, sono state individuate 39 proteine per la resistenza a sostanze tossiche (ABC transporters).

Tetranychus urticae ha sviluppato resistenza ad almeno 30 diversi esteri fosforici e carbammati. Sono state riscontrate mutazioni puntiformi nelle acetilcolinesterasi (AChE) divenute «insensibili» (ad es. F331W in AChE1 osservata in ceppi europei e asiatici della specie) (VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). In alcuni ceppi resistenti agli esteri fosforici è stata evidenziata anche la duplicazione

del gene per l'ACHE. La resistenza ai piretroidi in *T. urticae* è stata associata all'aumentata attività di esterasi e monossigenasi. Tra i casi di resistenza *target site* si segnala la mutazione F1538I relativa ai canali del Na riscontrata anche in *Musca domestica* L. e *R. microplus* (TSAGKARAKOU *et al.*, 2009).

Il dicofol è un acaricida che agisce nei confronti di tutti gli stadi di sviluppo degli acari inibendo il complesso mitocondriale II della catena respiratoria (TOMLIN, 2003). La resistenza a dicofol è stata associata a fenomeni di tipo metabolico, che coinvolgono in particolare le monoossigenasi (FERGUSON-KOLMES *et al.*, 1991; KIM *et al.*, 2007).

Gli acaricidi stannorganici agiscono mediante l'inibizione della sintesi dell'ATP a livello mitocondriale. La resistenza nei confronti di questa classe di acaricidi è conferita da mutazioni a livello delle ATPasi (KNOWLES, 1997).

Avermectine e milbemicine agiscono sui canali transmembrana per lo ione Cl dipendenti dal glutammato (Tu_GluCl) o dal GABA (acido gamma-amminobutirrico). Più meccanismi concorrono nel conferire la resistenza ad abamectin: rallentamento nell'assorbimento, aumento nell'escrezione, incremento del metabolismo (VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). In lavori più recenti sono stati approfonditi gli aspetti associati al metabolismo (esterasi, monossigenasi) e riportate tre mutazioni relative ai canali Tu_GluCl (KWON *et al.*, 2010a,b; DERMAUW *et al.*, 2012).

Gli acaricidi appartenenti al gruppo dei METI (Mitochondrial Electron Transport Inhibitors) inibiscono il complesso I della catena respiratoria. Ne fanno parte alcuni prodotti largamente impiegati contro Tetranychidi ed Eriofidi (pyridaben, tebufenpyrad e fenpyroximate) che hanno perso rapidamente efficacia. Nei fenomeni di resistenza sono coinvolti meccanismi di tipo metabolico (P450 monossigenasi) e probabilmente di tipo *target site* (mutazioni che interessano subunità dell'enzima NADH ubiquinone ossidoriduttasi) (VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). L'attività di chlorfenapyr si esplica in seguito alla produzione di un metabolita che agisce come disaccoppiante mitocondriale (BLACK *et al.*, 1994). La resistenza a questo acaricida è stata associata all'aumento delle attività delle esterasi e delle monossigenasi (VAN LEEUWEN *et al.*, 2006b).

Bifenazate, uno dei prodotti più recenti, agisce sul canale ionico per il Cl dipendente dal GABA (GABA_AR) (HIRAGAKI *et al.*, 2012). Alcuni studi hanno dimostrato come la resistenza a bifenazate sia associata a mutazioni del citocromo b del sito Qo del complesso III della catena di trasporto degli elettroni (VAN LEEUWEN *et al.*, 2006a, 2008, 2010, 2011; VAN NIEUWENHUYSE *et al.*, 2009,

2012). Tale acquisizione è stata suffragata dai fenomeni di resistenza incrociata tra bifenazate e acequinocyl, un acaricida inibitore del complesso III. Gli incroci tra ceppi resistenti e sensibili hanno dimostrato un'ereditarietà di tipo materno e il coinvolgimento dei mitocondri (l'attività del bifenazate riduce la sintesi di ATP nei ceppi sensibili).

Clofentezine e hexythiazox interferiscono con lo sviluppo delle uova degli acari. La resistenza a questi acaricidi è stata associata all'aumento delle attività enzimatiche, in particolare delle esterasi (AY & KARA, 2011). Il locus associato a resistenza a etoxazole è localizzato in un piccolo intervallo genomico che coincide con quello della chitinosintetasi (CHS1) espressa negli stadi più sensibili all'acaricida (VAN LEEUWEN *et al.*, 2012).

Lo spiroadiclofen interferisce con la biosintesi dei lipidi degli artropodi bersaglio, in particolare con la sintesi dell'acetil-CoA carbossilasi (BRETSCHNEIDER *et al.*, 2007). Inibisce la schiusura delle uova mentre ha una limitata tossicità nei confronti degli adulti pur riducendo la fecondità e la fertilità delle femmine (MARCIC *et al.*, 2010; VAN POTTEMBERGE *et al.*, 2008a; 2008b, 2009). La resistenza in *T. urticae*, ottenuta mediante selezione in laboratorio, ha basi metaboliche (P450 monossigenasi) (RAUCH & NAUEN, 2003; DEMAEGHT *et al.*, 2013).

LA RESISTENZA DI *TETRANYCHUS URTICAE* AGLI ACARICIDI IN ITALIA

In Italia, le infestazioni di *T. urticae* sono frequenti in coltura protetta ma possono verificarsi anche su mais, soia, colture orticole e arboree soprattutto in condizioni di elevata temperatura e bassa umidità relativa. La resistenza di *T. urticae* agli acaricidi in Italia è stata oggetto di progetti PRIN dedicati allo studio della resistenza in fitofagi di importanza economica quali Emitteri (afidi e aleurodidi), Lepidotteri (tortricidi) e Acari. Nel corso di un'indagine, svolta nel 2003 in alcune aree di coltivazione della rosa in serra (Liguria, Lazio, Sicilia e Veneto), sono stati riscontrati danni causati da *T. urticae* nonostante l'applicazione di oltre 10 trattamenti acaricidi per ciclo produttivo. Una situazione simile è stata riportata anche in altri Paesi europei (STAVRINIDES & HADJISTYLLI 2009; KHAJEHALI *et al.* 2011). Ceppi di *T. urticae* raccolti su rosa in coltura protetta e su colture orticole in pieno campo sono stati posti in allevamento presso il Dipartimento DAAPV dell'Università di Padova (attualmente Dipartimento DAFNAE) per indagare sulla loro risposta nei confronti di alcuni acaricidi (TIRELLO *et al.*, 2012b). In una prima serie di

biosaggi è stata riscontrata una marcata resistenza a abamectin, bromopropilate, tebufenpyrad e fenpyroximate. La risposta di questi ceppi agli acaricidi è stata confrontata con quella di un ceppo raccolto in Sardegna su piante orticole non trattate con prodotti fitosanitari. In seguito lo studio si è concentrato su due ceppi raccolti in Veneto (PSE) e Liguria (SAN), mantenuti in allevamento per alcuni mesi senza ulteriore esposizione a prodotti fitosanitari. I biosaggi sono stati condotti su femmine e uova di *T. urticae* impiegando acaricidi largamente impiegati nel controllo dei Tetranychidi (abamectin, bifenazate, clofentezine, etoxazole, fenpyroximate, flufenoxuron, hexythiazox, spirodiclofen, tebufenpyrad). Le femmine sono state trattate mediante microimmersione nella soluzione da saggiare e allevamento in celle chiuse (DENNEHY *et al.*, 1993; DUSO *et al.*, 2008a), le uova mediante immersione delle foglie nella soluzione (CASTAGNOLI *et al.*, 2005). I ceppi PSE e SAN hanno esibito resistenza a numerosi acaricidi e i valori delle dosi letali sono risultati spesso superiori alle dosi di campo. I fattori di resistenza (RR_{50}) dei ceppi PSE e SAN sono stati elevati per abamectin (> 1290 per PSE) e significativi per tebufenpyrad (> 163 per PSE), fenpyroximate (> 74 per SAN) e bifenazate (> 33 per PSE). I biosaggi condotti sulle uova dei ceppi PSE e SAN hanno posto in luce elevati fattori di resistenza nei confronti di hexythiazox (> 70000) e clofentezine (> 66000) mentre sono emersi valori significativi per flufenoxuron (> 61) e etoxazole (> 63 per PSE). Non sono emersi indizi di resistenza a spirodiclofen.

È stata condotta anche un'indagine sull'attività degli enzimi esterasi (ESTs), glutathione-S-transferasi (GSTs) e citocromo P450 monossigenasi (MFOs) seguendo procedure messe a punto da STUMPF & NAUEN (2002) e VAN LEEUWEN & TIRRY (2007). I saggi enzimatici hanno posto in evidenza un aumento significativo delle attività delle monossigenasi nei ceppi resistenti SAN e PSE (rispettivamente 2,66 e 1,95 volte rispetto al ceppo sensibile). L'attività delle glutathione-S-transferasi è risultata significativamente più elevata nel ceppo SAN (2,12 volte rispetto al ceppo sensibile) mentre una tendenza simile è emersa per le esterasi del ceppo PSE (1,69 volte rispetto al ceppo sensibile).

Prove condotte su altri ceppi di *T. urticae* raccolti in Sicilia e Lazio hanno posto in evidenza una diffusa resistenza a vari acaricidi che conferma le gravi difficoltà incontrate nel controllo di questo fitofago; a titolo di esempio è stato calcolato un $RR > 31000$ nei confronti di abamectin in una popolazione raccolta nel Lazio (DUSO *et al.*, dati non pub-

blicati). La resistenza nei confronti di abamectin indica una situazione osservata anche in altri Paesi ed il ruolo degli enzimi detossificanti è stato suggerito quale meccanismo alla base di questo fenomeno (STUMPF & NAUEN, 2002; KWON *et al.*, 2010a). In realtà l'aumentata attività delle monossigenasi e delle esterasi nei ceppi resistenti considerati non spiega in modo convincente gli elevati fattori di resistenza osservati nello studio. È stato ipotizzato il coinvolgimento di mutazioni (es. G323D) a carico dei canali del Cl dipendenti dal glutammato (KWON *et al.*, 2010b) ma questa mutazione non è stata riscontrata nel ceppo più resistente (VAN LEEUWEN, dati non pubblicati). Relativamente a tebufenpyrad, i valori delle DL_{90} sono risultati di almeno 5 volte superiori alla dose di campo. L'indagine sembra confermare il ruolo dei meccanismi di degradazione ossidativa posti in evidenza in precedenti studi effettuati su questa sostanza attiva e su altri METI (STUMPF & NAUEN 2001; KIM *et al.*, 2004; VAN POTTENBERGE *et al.* 2009a). La resistenza a bifenazate sta diffondendosi in Europa (VAN LEEUWEN *et al.*, 2008, VAN NIEUWENHUYSE *et al.*, 2009) e i valori delle DL_{90} per i ceppi PSE e SAN non sono lontani dalle dosi di campo proposte per questo acaricida. Pertanto, i dati riportati indicano che l'impiego del principio attivo non è esente da rischi. L'elevata resistenza a hexythiazox e clofentezine rappresenta uno dei fattori alla base degli insuccessi osservati nel controllo dei Tetranychidi in varie parti del Mondo (VAN LEEUWEN *et al.*, 2009; HERRON & ROPHAIL 1993; NAUEN *et al.*, 2001; PREE *et al.*, 2002) e tale evento è apparso evidente nelle serre indagate. Flufenoxuron è stato impiegato in alternativa a questi due ovicidi ma i dati ottenuti ne dimostrano la limitata efficacia acaricida a differenza di quanto emerso per spirodiclofen. I dati relativi a etoxazole suggeriscono che tale sostanza attiva sia ancora efficace a differenza di quanto osservato in Giappone (KOBAYASHI *et al.*, 2001; UESUGI *et al.*, 2002), Corea del Sud (LEE *et al.*, 2004) e Olanda (KHAIJEHALI *et al.*, 2011). In seguito all'applicazione dell'acaricida, è stata conseguita un'elevata mortalità delle uova anche a basse concentrazioni e le dosi letali riportate sono molto inferiori alla dose di campo. Non è stata riscontrata resistenza incrociata tra etoxazole e hexythiazox evidenziata in precedenti indagini (ASAHARA *et al.*, 2008).

STRATEGIE ANTI-RESISTENZA

L'obiettivo di prevenire la resistenza dev'essere perseguito mediante l'alternanza, la disposizione sequenziale o la rotazione di acaricidi a differente

modalità di azione. Tuttavia, i meccanismi di resistenza metabolica possono conferire resistenza in gruppi di acaricidi a diversa modalità di azione. In tal caso, l'efficacia di specifiche alternanze o rotazioni è destinata a diminuire. I meccanismi di ridotta penetrazione dell'acaricida o il cambio di comportamento dell'acaro possono creare anch'essi resistenza a gruppi differenti di prodotti rendendo necessario un cambio di strategia. Rientrano nelle possibili strategie anti-resistenza anche l'impiego di antagonisti naturali (predatori ed entomopatogeni), l'impiego di estratti vegetali e oli essenziali, la messa a punto di metodi colturali che riducono la vigoria delle piante, come la corretta gestione della concimazione minerale (OPIT *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007; CHOW *et al.*, 2009) o che modificano le condizioni climatiche come il *fogging* (DUSO *et al.*, 2004).

Nell'ambito delle strategie anti-resistenza, vanno considerati con grande attenzione la salvaguardia e/o il potenziamento degli antagonisti naturali di *T. urticae*. Nelle colture protette, l'attenzione dei ricercatori si è concentrata soprattutto su *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, specialista caratterizzato da elevato potenziale demografico (HELLE & SABELIS, 1985) mentre i generalisti come *Neoseiulus californicus* (McGregor) sono stati considerati in tempi più recenti (CASTAGNOLI & SIMONI, 1999; SCHAUSBERGER & WALZER, 2001; RHODES *et al.*, 2006). I lanci inoculativi o inondativi dei Fitoseidi non sortiscono sempre l'effetto sperato in quanto la difesa contro altri fitofagi e le malattie fungine implica l'impiego di prodotti che possono risultare dannosi ai predatori. Le informazioni sugli effetti indesiderati dei prodotti fitosanitari su *P. persimilis* fanno riferimento a ceppi commerciali che sono stati spesso selezionati per la resistenza nei confronti di insetticidi tradizionali (ad es. esteri fosforici). Recenti indagini hanno dimostrato l'elevata sensibilità di ceppi diversi di *P. persimilis* (selvatici o commerciali) nei confronti sia di prodotti organici di sintesi sia di prodotti a base di estratti vegetali (DUSO *et al.*, 2008b, 2009). Recentemente, le interazioni tra prodotti fitosanitari e predatori sono state studiate considerando le principali vie di esposizione (residuale, topica o per ingestione) degli acari ai prodotti. Uno studio comparato su predatori e prede può contribuire a spiegare l'impatto di un prodotto sulle comunità associate ad una determinata coltura (POZZEBON *et al.*, 2011).

La tutela degli antagonisti naturali richiede un continuo aggiornamento dei database sulla selettività dei prodotti fitosanitari. Questi dovrebbero includere sia i dati relativi a prodotti di recente commercializzazione sia quelli che provengono

dalla revisione dei dati pregressi alla luce di nuovi approcci metodologici (HASSAN *et al.*, 1994; BIONDI *et al.*, 2012). Gli studi sulla selettività dei prodotti fitosanitari sono compresi nei dossier necessari all'autorizzazione all'uso. Questi studi sono eseguiti in ottemperanza alla normativa europea (Reg. 1107/2009/EU) che contempla protocolli definiti per le diverse specie di artropodi "non bersaglio" (tra gli acari Fitoseidi *Typhlodromus pyri* Scheuten). Lo studio dell'impatto dei prodotti fitosanitari nei confronti di antagonisti naturali importanti negli ambienti mediterranei e lo sviluppo di nuove metodologie d'indagine sono stati condotti soprattutto da ricercatori indipendenti. Ne costituiscono un esempio gli studi su *Kampimodromus aberrans* (Oudemans), specie di primaria importanza nei vigneti e frutteti dell'Europa meridionale. Le ricerche sulla biologia della specie (KASAP, 2005; OZMAN-SULLIVAN, 2006; LORENZON *et al.*, 2012) hanno consentito di mettere a punto un metodo di allevamento e una procedura per saggiare gli effetti dei prodotti fitosanitari in laboratorio (TIRELLO *et al.*, 2012a; TIRELLO *et al.*, dati non pubblicati). Lo sviluppo di procedure di laboratorio adeguate ha consentito di produrre dati affidabili sulla selettività dei prodotti fitosanitari nei confronti di *P. persimilis* e della sua preda *T. urticae*, ottenendo informazioni sul possibile effetto di un prodotto sul rapporto predatore-preda (DUSO *et al.*, 2008a, 2008b). L'analisi comparativa della risposta demografica di acari fitofagi e predatori in esperimenti di mesocosmo costituisce infatti un altro strumento nello studio dell'impatto dei prodotti fitosanitari sul rapporto predatore-preda (STAVRINIDES & MILLS, 2009). Questo approccio ha il vantaggio di offrire una visione complessiva dell'impatto dei prodotti fitosanitari cercando di simulare quanto avviene in condizioni realistiche d'impiego (STARK & BANKS, 2003). Talvolta, l'impatto di un prodotto fitosanitario nei confronti degli acari predatori va considerato all'interno di complesse relazioni ecologiche. Ad esempio, l'effetto di un fungicida sugli acari predatori generalisti può essere diretto, se dovuto alla tossicità intrinseca del prodotto, oppure indiretto se è mediato dall'effetto del fungicida sull'abbondanza di micelio fungino che costituisce un alimento alternativo per gli acari predatori (POZZEBON *et al.*, 2010). Anche la disponibilità di polline, alimento alternativo per gli acari predatori, può influenzare l'effetto dei prodotti fitosanitari nei confronti degli acari Fitoseidi generalisti: un'elevata disponibilità di polline può favorire la resilienza delle popolazioni di acari Fitoseidi dopo un trattamento insetticida (AHMAD, 2013). La piena comprensione di questi meccanismi necessita di

indagini a diversa scala dimensionale. Infatti, è possibile misurare con precisione la tossicità intrinseca di un prodotto (effetti letali e sub-letali) solo a livello di singolo individuo e in condizioni controllate. Tra gli effetti sub-letali dei prodotti sugli acari Fitoseidi sono considerati soprattutto quelli sulla fecondità (CASTAGNOLI *et al.*, 2005; URBANEJA *et al.*, 2008; LEFEBVRE *et al.*, 2012), sulla risposta funzionale nei confronti della preda (POLETTI *et al.*, 2007), sul tasso di fuga (BOSTANIAN *et al.*, 2009). Lo studio della tossicità letale in laboratorio può essere eseguito mediante biosaggi finalizzati al calcolo della relazione dose-mortalità con la possibilità di evidenziare eventuali fenomeni di resistenza ai prodotti fitosanitari anche tra gli acari predatori.

RESISTENZA NEGLI ACARI PREDATORI

La resistenza ai prodotti fitosanitari può interessare anche gli entomofagi. CROFT (1990) riporta almeno 31 specie di entomofagi (11 specie tra i Fitoseidi) per le quali sono noti casi di resistenza agli insetticidi. Attualmente, sono almeno 15 le specie di Fitoseidi di cui è nota l'esistenza di ceppi resistenti a insetticidi. Le prime segnalazioni di resistenza negli acari predatori risalgono alla fine degli anni '60 quando *M. occidentalis* aveva evidenziato una diffusa insensibilità nei confronti degli esteri fosforici nei frutteti dell'America del Nord; alcuni anni dopo fu dimostrata la resistenza allo zolfo in ceppi di *M. occidentalis* provenienti dai vigneti californiani. Questi eventi hanno contribuito a far raggiungere a tale specie un ruolo di primo piano nel contesto della lotta integrata agli acari fitofagi al punto da promuovere l'introduzione di ceppi resistenti di *M. occidentalis* in Australia (HOY, 2011). Tra le altre specie coinvolte in fenomeni di resistenza nel Nord America si segnalano anche *Neoseiulus falcis* (Garman), *Amblyseius hibisci* (Chant), *Amblyseius andersoni* (Chant) e *T. pyri* (CROFT, 1990). In Europa, la prima segnalazione di Fitoseidi resistenti ha riguardato un ceppo di *A. andersoni* in grado di tollerare ripetuti interventi con esteri fosforici nei frutteti (IVANCICH GAMBARO, 1975). I livelli di resistenza a esteri fosforici e carbammati esibiti da vari ceppi di *A. andersoni* raccolti nell'Italia settentrionale sono apparsi sorprendenti (DUSO *et al.*, 1992). In Europa sono stati riscontrati ceppi resistenti a insetticidi e a fungicidi anche in altri predatori generalisti come *T. pyri*, *K. aberrans* e *T. exbilaratus* Ragusa (OVERMEER & VAN ZON, 1983; DUSO *et al.*, 1992; VIDAL & KREITER, 1995; AUGER *et al.*, 2004; BONAFOS *et al.*, 2007; TIRELLO *et al.*, 2012a). La resistenza agli esteri fosforici è stata documentata anche in *P. persimilis* (CROFT,

1990). Le segnalazioni di ceppi resistenti in Asia riguardano soprattutto *Amblyseius womersleyi* Schicha (MOCHIZUKI, 1997; SATO *et al.*, 2001, 2004). Lo sviluppo di resistenza ai piretroidi sembra coinvolgere anche specie presenti nell'America del Sud, come *Phytoseiulus macropilis* (Banks), con possibili implicazioni di vasta portata (POLETTI & OMOTO, 2012).

La colonizzazione naturale dei vigneti e dei frutteti da parte dei Fitoseidi può richiedere tempi lunghi. Nel corso degli anni '80 sono state messe a punto delle tecniche di immissione di Fitoseidi che consentono una colonizzazione progressiva di ambienti soggetti a infestazioni di Tetranychidi ed Eriofidi (GIROLAMI, 1981). L'immissione di ceppi di Fitoseidi resistenti ai prodotti fitosanitari è opportuna nei vigneti inseriti in programmi di lotta obbligatoria per contenere la diffusione di dannose fitoplasmosi (ad es. la Flavescenza dorata della vite). Il successo delle immissioni di ceppi di Fitoseidi resistenti ai prodotti fitosanitari può essere influenzato dai meccanismi di resistenza. La resistenza nei confronti degli esteri fosforici e dei piretroidi può essere di tipo metabolico, ad esempio modificare l'attività della monossigenasi P450, o *target site* ossia essere associata a modificazioni dell'acetilcolinesterasi (ANBER & OVERMEER, 1988; ANBER & OPPENOORTH, 1989; VAN de BAAN *et al.*, 1985; FITZGERALD & SOLOMON, 1999; SATO *et al.*, 2006, 2007). Si può affermare che gli studi condotti su questo argomento a livello molecolare siano piuttosto scarsi a differenza di quanto sviluppato per i Tetranychidi.

UN CASO DI STUDIO: LE BASI MOLECOLARI DELLA RESISTENZA A CHLORPYRIFOS IN *K. ABERRANS*

I meccanismi di resistenza a chlorpyrifos negli artropodi riguardano principalmente la modificazione strutturale della proteina bersaglio, l'acetilcolinesterasi (AChE), alla quale può affiancarsi l'aumento dell'attività metabolica detossificante delle esterasi (OAKESHOTT *et al.*, 2005; AIKI *et al.*, 2005; OH *et al.*, 2006; ALOUT *et al.*, 2007; KHAJEHALI *et al.*, 2007; ZANG *et al.*, 2013).

La riduzione della suscettibilità dell'acetilcolinesterasi al chlorpyrifos è dovuta a due mutazioni puntiformi non silenti ricorrenti nelle diverse specie, che portano alla sostituzione di una glicina o di una fenilalanina, la cui posizione è conservata evolutivamente, con un diverso amminoacido, variabile da specie a specie. La conseguenza è una riduzione dell'accessibilità degli esteri fosforici al sito catalitico dell'acetilcolinesterasi che diventa insensibile alla loro azione inibitoria. Tuttavia, all'insensibilità è associato un costo di *fitness*, imputabile alla diminuzione dell'affinità dell'enzima per il substrato

naturale, il neurotrasmettitore acetilcolina (OH *et al.*, 2006, KWON *et al.*, 2010a, 2012). Negli acari, le basi molecolari della resistenza di tipo *target site* specifica sono state caratterizzate solo nei Tetranychidi (*T. urticae* e *T. kanzawai*). In questa famiglia l'acetilcolinesterasi è codificata da un singolo gene e le mutazioni consistono nella sostituzione del residuo di glicina con una serina (G228S) o della fenilalanina con un triptofano (F439W) (AIKI *et al.*, 2005; KHAJEHALI *et al.*, 2010). In *T. urticae* la mutazione G228S è associabile a un moderato fattore di resistenza al chlorpyrifos, con un rapporto delle LD50 (RR₅₀) di circa 31 rispetto al ceppo di riferimento sensibile. La mutazione F439W è stata descritta in popolazioni di *T. urticae* e *T. kanzawai* con fattore di resistenza più elevato e variabile fra 78 e 586, suggerendo il contributo di ulteriori meccanismi, oltre a quello *target site*. L'entità della riduzione della sensibilità al chlorpyrifos descritta in alcune popolazioni di *K. aberrans* (RR₅₀ = 539,6 ÷ 145,6; TIRELLO *et al.*, 2012a) è compatibile con l'esistenza di un'acetilcolinesterasi modificata, insensibile all'insetticida. Per verificare quest'ipotesi si è proceduto al clonaggio in *K. aberrans* del gene AChE ortologo a quello in *T. urticae* e all'accertamento, per sequenziamento diretto, della presenza di mutazioni non silenti associate al fenotipo resistente (CASSANELLI *et al.*, in preparazione). Non essendo ancora note sequenze clonate nei Fitoseidi codificanti l'AChE, si è ricorso all'annotazione dei geni *in-silico* nel progetto genoma del fitoseide *M. occidentalis* (HOY, 2009). Sulla base della conservazione di domini funzionali tipici di questa classe enzimatica, nel genoma di *M. occidentalis* l'analisi bioinformatica ha predetto oltre una decina di geni potenzialmente codificanti acetilcolinesterasi. L'esame del trascrittoma in *M. occidentalis* conferma che almeno sette geni AChE sono attivamente trascritti (HOY *et al.*, 2013). Data la prossimità filogenetica dei due Fitoseidi è probabile che anche in *K. aberrans* più geni codifichino per l'AChE, come avviene anche per gli ectoparassiti ematofagi *R. microplus* e *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) (TEMEYER *et al.*, 2010; Vector base: assembly IscaW1.2). Esaminando i domini amminoacidici conservati nelle AChE annotate nel genoma di *M. occidentalis* simili all'AChE del *T. urticae*, è stata impostata la strategia di clonaggio del trascritto prodotto dal gene ortologo in *K. aberrans*. Il sequenziamento di questo trascritto in popolazioni sensibili (LE) e resistenti (PO) al chlorpyrifos in *K. aberrans* (TIRELLO *et al.*, 2012a) ha individuato una mutazione associata in omozigosi al fenotipo resistente, che comporta la sostituzione di un residuo di glicina con una serina in posizione 191 (G191S). Tale sostituzione è analoga a quella (G228S) riscontrata nella popolazione di *T. urticae* moderatamente resistente

al chlorpyrifos (KHAJEHALI *et al.*, 2010). Pur condividendo la medesima sostituzione amminoacidica, la popolazione resistente di *K. aberrans* mostra un fattore di resistenza di gran lunga superiore a quella resistente di *T. urticae* (RR₅₀ 539,6 vs. 31). E' probabile quindi che la mutazione G191S non sia l'unico determinante genetico del fenotipo resistente al chlorpyrifos in *K. aberrans*. Dopo il sequenziamento del trascritto in altre tre popolazioni resistenti e due sensibili di *K. aberrans* non correlate alle precedenti, né fra loro, la sostituzione G191S si è confermata associata in omozigosi al solo fenotipo resistente, rappresentandone di conseguenza, un affidabile marcatore molecolare. Non è da escludere che nei Fitoseidi, dove apparentemente sono presenti più geni per l'AChE, la resistenza bersaglio specifica ricalchi quella caratterizzata in *R. microplus*, dove il fenotipo resistente è dovuto sia a mutazioni puntiformi ripartite fra diversi geni AChE che all'amplificazione selettiva di alcuni loci (TEMEYER *et al.*, 2013). Del resto, l'amplificazione genica a partire da unico locus AChE è stata riscontrata anche in ceppi resistenti al chlorpyrifos in *T. urticae* (KWON *et al.*, 2010b). Tale soluzione evolutiva è probabilmente privilegiata, perché nei ceppi resistenti dotati di un genoma con multiloci per la proteina bersaglio, l'espressione di più acetilcolinesterasi, consentirebbe di alleggerire il costo di *fitness* associato a forme modificate dell'enzima, insensibili all'insetticida ma con una minore affinità per l'acetilcolina (KWON *et al.*, 2012). La coesistenza di acetilcolinesterasi normali e mutate, e la ripartizione di più mutazioni su diversi loci, consentirebbe di ottenere il miglior compromesso fra il pieno mantenimento della funzionalità neurologica e la necessità di contrastare la pressione selettiva esercitata dall'insetticida. I Fitoseidi, come *M. occidentalis* e *K. aberrans*, provvisti probabilmente di AChE multilocus, potrebbero adottare meccanismi simili. In effetti, nel progetto genoma di *M. occidentalis*, sono riscontrabili geni AChE, annotati *in silico*, con sequenza amminoacidica divergente rispetto a quella caratterizzata in *T. urticae*, ma più simili alle AChE clonate in *R. microplus*, di tipo 1 e 3. Nella zecca, mutazioni puntiformi di queste AChE, sono state associate alla ridotta sensibilità agli esteri fosforici (TEMEYER *et al.*, 2013). Confidando sull'elevata omologia di sequenza riscontrata fra l'acetilcolinesterasi clonata in questo studio e quella annotata nel progetto genoma di *M. occidentalis*, è in corso di svolgimento la caratterizzazione di ulteriori copie di acetilcolinesterasi nelle popolazioni resistenti di *K. aberrans*. In conclusione, la resistenza di tipo *target site* specifica agli esteri fosforici nei Fitoseidi, è apparentemente molto più articolata di quella riportata in *T. urticae*, dove è presente di norma, una sola copia

del gene AChE. La disponibilità del progetto genoma di *M. occidentalis* si è dimostrata una valida risorsa per risolvere questa complessità e probabilmente lo sarà anche per lo studio dei meccanismi ausiliari di resistenza al clorpirifos in *K. aberrans*, quali l'incremento d'espressione di esterasi. Il trascritto isolato in *K. aberrans* è la prima sequenza AChE completa, caratterizzata in vivo e non solo *in silico*, nei Fitoseidi. Una mutazione che comporta la sostituzione G191S in questa AChE, appare fortemente associata alla resistenza al clorpirifos. Dato che la ridotta suscettibilità all'insetticida rappresenta una caratteristica desiderabile nel predatore, la disponibilità di un suo marcatore molecolare potrà trovare diversi utilizzi. Ad esempio, per tracciare il fenotipo resistente durante la selezione di laboratorio e per verificarne la stabilità in condizioni di campo, quando diverse pressioni selettive o condizioni ambientali potrebbero far emergere costi di *fitness*. Oppure, il marcatore potrà essere impiegato nei programmi di miglioramento genetico del predatore tramite introgressione di ulteriori caratteristiche fenotipiche utili, quali la resistenza ad altri principi attivi o legati al miglioramento della *fitness*, ricorrendo all'incrocio con nuovi ceppi preselezionati in laboratorio o selvaggi. Alternativamente, la mutazione consentirà di seguire il destino della popolazione resistente una volta rilasciata in campo per studi ecologici o di lotta biologica in presenza di popolazioni autoctone che potrebbero "diluire" il fenotipo migliorato.

RIASSUNTO

La diffusione di popolazioni di acari fitofagi resistenti ai prodotti fitosanitari e la tossicità di questi ultimi nei confronti degli acari predatori sono considerate le principali cause scatenanti le pullulazioni dei Tetranychidi. A *Tetranychus urticae* spetta il primato per quanto riguarda il numero di sostanze attive coinvolte in casi di resistenza. La ricerca si è interessata sia alla comparsa e diffusione della resistenza sia allo studio dei meccanismi e delle basi genetiche della resistenza. Un'indagine svolta in Italia ha evidenziato le principali problematiche legate alla resistenza in *T. urticae*. Le strategie anti-resistenza sono basate sulla rotazione e sull'alternanza di sostanze attive a differente modalità di azione ma anche sulla salvaguardia degli antagonisti naturali degli acari fitofagi, in particolare dei Fitoseidi. Sono state messe a punto procedure per la valutazione degli effetti collaterali dei prodotti fitosanitari su numerose specie di Fitoseidi. La resistenza ai prodotti fitosanitari negli acari Fitoseidi è stata oggetto di ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

AIKI Y., KOZAKI T., MIZUNO H., KONO Y., 2005 – *Amino acid substitution in Ace paralogous acetylcholinesterase accompanied by organophosphate resistance in the spider mite Tetranychus kanzawai*. - Pestic. Biochem. Physiol., 82: 154-161.

AHMAD S., 2013 – *The impact of pesticides on apple mite communities*. Doctoral Thesis, Doctoral School of Crop Sciences, University of Padua.

ALOUT H., BERTHOMIEU A., CUI F., TAN Y., BERTICAT C., QIAO C., WEILL M., 2007 – *Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in Culex vishnui and Culex tritaeniorhynchus (Diptera: Culicidae) mosquitoes from China*. - J. Med. Entomol., 44: 463-469.

ANBER H. A. I., OVERMEER W. P. J., 1988 – *Resistance to organophosphates and carbamates in the predacious mite Amblyseius potentillae (Garman) due to insensitive acetylcholinesterase*. - Pestic. Biochem. Physiol., 31: 91-98.

ANBER H.A.I., OPPENOORTH F.J., 1989 – *A mutant esterase degrading organophosphates in a resistant strain of the predacious mite Amblyseius potentillae (Garman)*. - Pestic. Biochem. Physiol., 33: 283-297.

ANGELI G., IORIATTI C., FORTI D., MAINES R., 1994 – *Valutazione della sensibilità a clofentezina di 4 ceppi di Panonychus ulmi Koch (Piemonte, Trentino-Alto Adige)*. - Inf. Fitopat., 44: 38-41.

ASAHARA M., UESUGI R., OSAKABE M.H., 2008 – *Linkage between one of the polygenic hexythiazox resistance genes and an etoxazole resistance gene in the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae)*. J. Econ. Entomol., 101: 1704-1710.

AUGER P., BONAFOS R., KREITER S., 2004 – *Mancozeb resistance patterns among Kampimodromus aberrans and Typhlodromus pyri strains from French vineyards*. - Can. Entomol., 136: 663-673.

AY R., KARA F.E., 2011 – *Toxicity, inheritance and biochemistry of clofentezine resistance in Tetranychus urticae*. Insect Sci., 18: 503-511.

BEERS E.H., MARTINEZ-ROCHA L., TALLEY R.R., DUNLEY J.E., 2009 – *Lethal, sublethal, and behavioral effects of sulfur-containing products in bioassays of three species of orchard mites*. - J. Econ. Entomol., 102: 324-335.

BEERS E.H., RIEDL H., DUNLEY J.E., 1998 – *Resistance to abamectin and reversion to susceptibility to fenbutatin oxide in spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in the Pacific Northwest*. - J. Econ. Entomol., 91: 352 - 360.

BERLESE A., 1886 – *Acari dannosi alle piante coltivate*. Premiata Tipografia Sacchetto, Padova, pp. 31.

BERLESE A., 1901 – *Gli acari agrari*. - Riv. Pat. veg. VIII: 227-294.

BIONDI A., MOMMAERTS V., SMAGGHE G., VINUELA E., ZAPPALA L., DESNEUX N., 2012 – *The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods*. - Pest. Manag. Sci., 68: 1523-1536.

BLACK B.C., HOLLINGWORTH R.M., AHAMMADSAHIB K.I., KUKEL C.D., DONOVAN S., 1994 – *Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC303,630 and related halogenated pyrroles*. - Pestic. Biochem. Physiol., 50: 115-128.

BONAFOS R., SERRANO E., AUGER P., KREITER S., 2007 – *Resistance to deltamethrin, lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos-ethyl in some populations of Typhlodromus pyri Scheuten and Amblyseius andersoni (Chant) (Acari: Phytoseiidae) from vineyards in the south-west of France*. - Crop. Prot., 26: 169-172.

BOSTANIAN N. J., THISTLEWOOD H. A., HARDMAN J. M., LAURIN M. C., RACETTE G., 2009 – *Effect of seven new orchard pesticides on Galendromus occidentalis in laboratory studies*. - Pest. Manag. Sci., 65: 635-639.

BRETSCHNEIDER T., FISCHER R., NAUEN R., 2007 – *Inhibitors of lipid synthesis: acetyl-CoA-carboxylase*

- inhibitors*. In: Modern Crop Protection Compounds, Krämer W., Schirmer U. Ed., Wiley-WCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, pp. 909 - 925.
- BRIOSI G., 1876 - *Sulla Phytotossi della vite* (Phytoptus vitis Landois). - Ann. Vitic. Enol. It., X: 23-39.
- CANESTRINI G., 1892 - *Prospetto dell'acarofauna italiana. Famiglia dei Phytoptini*. Atti Soc. Ven. Trent. Sci. Nat., Ser. II, 1: 543-557.
- CANESTRINI G., FANZAGO F., 1876 - *Nuovi acari italiani (seconda serie)*. Atti Soc. Ven. Trent. Sci. Nat., 5: 130-142.
- CANESTRINI G., FANZAGO F., 1877 - *Intorno agli acari italiani*. Atti R. Ist. Ven. Scienze Lettere Arti, ser. V, IV: 69-208.
- CANESTRINI R., 1890 - *Prospetto dell'acarofauna italiana. Famiglia dei Tetranychini*. Atti R. Ist. Ven. Trent., ser. IV, VII: 491-537.
- CASTAGNOLI M., LIGUORI M., SIMONI S., DUSO C., 2005 - *Toxicity of some insecticides to Tetranychus urticae, Neoseiulus californicus and Tydeus californicus*. - Biocontrol, 50: 611-622.
- CASTAGNOLI M., SIMONI S., 1999 - *Effect of long-term feeding history on functional and numerical response of Neoseiulus californicus (Acari: Phytoseiidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 23: 217-234.
- CHEN Y., OPIT G. P., JONAS V. M., WILLIAMS K. A., NECHOLS J. R., MARGOLIES D. C., 2007 - *Twospotted spider mite population level, distribution, and damage on ivy geranium in response to different nitrogen and phosphorus fertilization regimes*. - J. Econ. Entomol., 100: 1821-1830.
- CHOW A., CHAU A., HEINZ K. M., 2009 - *Reducing fertilization for cut roses: effect on crop productivity and twospotted spider mite abundance, distribution, and management*. - J. Econ. Entomol., 102: 1896-1907.
- COHEN E., 2006 - *Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods*. - Pestic. Biochem. Phys. 85: 21-27.
- CRANHAM J.E., HELLE W., 1985 - *Pesticide resistance in Tetranychidae*. In: Spider Mites: Their Biology, vol. 1, Natural Enemies and Control, Helle W. & Sabelis M.W. Ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 405-421.
- CROFT B.A., 1990 - *Arthropod biological control agents and pesticides*. Wiley, N. Y., pp 723.
- CUBONI G., 1891 - *Il rossore della vite e il Tetranychus telarius L.* - Boll. Soc. gen. Vitic. It., 21: 492-495.
- DEMAEGHT P., DERMAUW W., TSAKIRELI D., KHAJEHALI J., NAUEN R., TIRRY L., VONTAS J., LÜMMEN P., VAN LEEUWEN T., 2013 - *Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetrone acids in Tetranychus urticae: CYP392E10 metabolizes spiropdiclofen, but not its corresponding enol*. - Insect Biochem. Mol. Biol., <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.007>.
- DENNEHY T.J., FARNHAM A.W., DENHOLM I., 1993 - *The microimmersion bioassay: a novel method for topical application of pesticides to spider mites*. - Pestic. Sci., 39: 47-54.
- DERMAUW W., ILIAS A., RIGA M., TSAGKARAKOU A., GRBI M., TIRRY L., VAN LEEUWEN T., VONTAS J., 2012 - *The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of Tetranychus urticae: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 42:455-465.
- DERMAUW W., WYBOUW N., ROMBAUTS S., MENTEND B., VONTAS J., GRBI M., CLARK M.R., FEYEREISEN R., VAN LEEUWEN T., 2013 - *A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite Tetranychus urticae*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 110: E113-E122.
- DUSO C., CAMPORESE P., VAN DER GEEST L.P.S., 1992 - *Toxicity of a number of pesticides to strains of Typhlodromus pyri and Amblyseius andersoni (Acari: Phytoseiidae)*. - Entomophaga 37: 363-372.
- DUSO C., FANTI M., POZZEBON A., ANGELI G., 2009 - *Is the predatory mite Kampimodromus aberrans a candidate for the control of phytophagous mites in European apple orchards?* - Biocontrol, 54: 369-382.
- DUSO C., MALAGNINI V., POZZEBON A., BUZZETTI F.M., TIRELLO P., 2008 - *A method to assess the effects of pesticides on the predatory mite Phytoseiulus persimilis (Acari Phytoseiidae) in the laboratory*. - Biocontrol Sci. Technol., 18: 1027-1040.
- FERGUSON-KOLMES L.A., SCOTT J.G., DENNEHY T.J., 1991 - *Dicofol resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and pharmacokinetics*. - J. Econ. Entomol., 84: 41-48.
- FITZGERALD J.D., SOLOMON M.G., 1999 - *The predatory mite Typhlodromus pyri: biological characteristics and resistance to insecticides in different mite strains*. - IOBC/WPRS Bull., 22(6): 161-167.
- FUNAYAMA K., TAKAHASHI Y., 1995 - *Resistance to fenpyroximate and pyridaben in two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) in southern Akita Prefecture*. - Bull. Akita Fruit Tree Exp. Sta., 25:19-30.
- GASSER R., 1956 - *Il problema degli acari in frutticoltura, viticoltura e floricoltura*. - Boll. Zool. agr. Bachic., XXII: 81-142.
- GEORGHIOU G.P., LAGUNES-TEJEDA A., 1991 - *The occurrence of resistance to pesticides in arthropods; an index of cases reported through 1989*. FAO, Rome, Italy.
- GIROLAMI V., 1981 - *Danni, soglie di intervento, controllo degli acari della vite*. Atti "III incontro su la difesa integrata della vite," Latina, 3-4 dicembre 1981, Regione Lazio, pp. 111-143.
- GIROLAMI V., PAVAN F., ZANDIGIACOMO P., 1991 - *La fillossera della vite ed altri fitofagi della vite in Friuli e regioni limitrofe nell'ultimo secolo*. - Cong. Int. "Gorizia 1891-1991: cento anni di enologia e di viticoltura", Gorizia, 28.11-1.12.1991, 1- 27.
- GRBIC M., VAN LEEUWEN T., CLARK R.M., ROMBAUTS S., ROUZÉ P., GRBI V., OSBORNE E.J., DERMAUW W., NGOC P.C., ORTEGO F., HERNÁNDEZ-CRESPO P., DIAZ I., MARTINEZ M., NAVAJAS M., SUCENA É, MAGALHÃES S., NAGY L., PACE R.M., DJURANOVI S., SMAGGHE G., IGA M., CHRISTIAENS O., VEENSTRA J.A., EWER J., VILLALOBOS R.M., HUTTER J.L., HUDSON S.D., VELEZ M., YI S.V., ZENG J., PIRES-DA-SILVA A., ROCH F., CAZAUX M., NAVARRO M., ZHUROV V., ACEVEDO G., BJELICA A., FAWCETT J.A., BONNET E., MARTENS C., BAELE G., WISSLER L., SANCHEZ-RODRIGUEZ A., TIRRY L., BLAIS C., DEMEESTERE K., HENZ S.R., GREGORY T.R., MATHIEU J., VERDON L., FARINELLI L., SCHMUTZ J., LINDQUIST E., FEYEREISEN R., VAN DE PEER Y., 2011 - *The genome of Tetranychus urticae reveals herbivorous pest adaptations*. - Nature, 479: 487- 492.
- GRUYS P., 1982 - *Hits and misses. The ecological approach to pest control in orchards*. - Ent. Exp. Appl. 31: 70-87.
- HASSAN S. A., BIGLER F., BOGENSCHUTZ H., BOLLER E., BRUN J., CALIS J. N. M., COREMANSPELSENEER J., DUSO C., GROVE A., HEIMBACH U., HELYER N., HOKKANEN H., LEWIS G. B., MANSOUR F., MORETH L., POLGAR L., SAMSOEPETERSEN L., SAUPHANOR B., STAUBLI A., STERK G., VAINIO A., VANDEVEIRE M., VIGGIANI G., VOGT H.

- 1994 – Results of the 6th joint pesticide testing program of the IOBC/WPRS Working group “Pesticides and beneficial organisms”. - Entomophaga, 39: 107-119.
- HERRON G.A., EDGE V.E., ROPHAIL J., 1994 – The influence of fenbutatin oxide use on organotin resistance in two-spotted mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). - Exp. Appl. Acarol., 18: 753-755.
- HERRON G.A., EDGE V.E., WILSON L.J., ROPHAIL J., 1998 – Organophosphate resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae) from cotton in Australia. - Exp. Appl. Acarol., 22: 17-30.
- HERRON G.A., LEARMONTH S.E., ROPHAIL J., BARCHIA I., 1997 – Clofentezine and fenbutatin oxide resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from deciduous fruit tree orchards in Western Australia. - Exp. Appl. Acarol., 21: 163-169.
- HERRON G.A., ROPHAIL J., 1993 – Effect of clofentezine-hexythiazox resistance on life-table attributes of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). - Exp. Appl. Acarol., 17: 823-830.
- HERRON G.A., ROPHAIL J., 1998 – Tebufenpyrad (Pyranica®) resistance detected in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from apples in Western Australia. - Exp. Appl. Acarol., 22: 633-641.
- HERRON G.A., ROPHAIL J., 2003 – First detection of chlorfenapyr (Secure®) resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from nectarines in an Australian orchard. - Exp. Appl. Acarol., 31: 131-134.
- HIRAGAKI S., KOBAYASHI T., OCHIAI N., TOSHIMA K., DEKEYSER M.A., MATSUDA K., TAKEDA M., 2012 – A novel action of highly specific acaricide; bifenazate as a synergist for a GABA-gated chloride channel of *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae]. - Neurotoxicology, 33: 307-313.
- HOY M.A., 2009 – The predatory mite *Metaseiulus occidentalis*: mitey small and mitey large genomes. - Bioessays, 31: 581-90.
- HOY M.A., 2011 – Agricultural Acarology: Introduction to Integrated Mite Management. CRC Press Taylor and Francis Group, pp 430.
- HOY M.A., YU F., MEYER J.M., TARAZONA O.A., JEYAPRAKASH A., WU K., 2013 – Transcriptome sequencing and annotation of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae): a cautionary tale about possible contamination by prey sequences. - Exp. Appl. Acarol., 59: 283-296.
- IVANCICH GAMBARO P., 1975 – Selezione di popolazioni di Acari predatori resistenti ad alcuni insetticidi fosforati-organici. - Inf. Fitopat., 7: 21-25.
- KASAP I., 2005 – Life-history traits of the predaceous mite *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) (Acarina : Phytoseiidae) on four different types of food. - Biol. Control, 35: 40-45.
- KHAJEHALI J., VAN LEEUWEN T., GRISPOU M., MOROU E., ALOUT H., WEILL M., TIRRY L., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., 2010 – Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. - Pest Manag. Sci., 66: 220-228.
- KHAJEHALI J., VAN NIEUWENHUYSE P., DEMAEGHT P., TIRRY L., VAN LEEUWEN T., 2011 – Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. - Pest. Manag. Sci., 67:1424-1433.
- KIM M., SHIN D., SUH E., CHO K., 2004 – An assessment of the chronic toxicity of fenpyroximate and pyridaben to *Tetranychus urticae* using a demographic bioassay. Appl. Entomol. Zool., 39: 401-409.
- KIM Y.-J., LEE S.-W., CHO J.-R., PARK H.-M., AHN Y.-J., 2007 – Multiple Resistance and Biochemical Mechanisms of Dicofol Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). - J Asia-Pacific Entomol, 10: 165-170.
- KNOWLES C.O., 1997 – Mechanisms of resistance to acaricides. In: Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals, Sjut V. Ed., Springer, New York, pp. 57-77.
- KOBAYASHI M., KOBAYASHI S., NISHIMORI T. 2001 – Occurrence of etoxazole resistance individuals of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch from a limited region. - Japanese Journal of App. Entomol. Zool., 45: 83-88.
- KWON D.H., CLARK J.M., LEE S.H., 2010a – Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite. - Insect Mol. Biol., 19: 195-204.
- KWON D.H., IM J.S., AHN J.J., LEE J.H., CLARK J.M., LEE S.H., 2010b – Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite. - Pestic. Biochem. Physiol., 96: 36-42.
- KWON D.H., CHOI J.Y., JE Y.H., LEE S.H., 2012 – The overexpression of acetylcholinesterase compensates for the reduced catalytic activity caused by resistance-conferring mutations in *Tetranychus urticae*. - Insect Biochem Mol Biol 42, 212-219.
- LEE S.Y., AHN K.S., KIM C.S., SHIN S.C., KIM G.H., 2004 – Inheritance and stability of etoxazole resistance in twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its cross resistance. - Korean J. Appl. Entomol., 43: 43-48.
- LEFEBVRE M., BOSTANIAN N. J., MAUFFETTE Y., RACETTE G., Thistlewood H. A, Hardman J. M., 2012 – Laboratory-based toxicological assessments of new insecticides on mortality and fecundity of *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae). - J. Econ. Entomol., 105: 866-871.
- LORENZON M., POZZEBON A., DUSO C., 2012 – Effects of potential food sources on biological and demographic parameters of the predatory mites *Kampimodromus aberrans*, *Typhlodromus pyri* and *Amblyseius andersoni*. - Exp. Appl. Acarol., 58: 259-278.
- LUNARDONI A., 1890 – Gli insetti nocivi alla vite. Loro vita, danni e modi per combatterli. Tipografia Eredi Botta, Roma, pp. 83.
- MARCIC D., OGURLIC I., MUTAVDZIC S., PERIC P., 2010 – The effects of spiromesifen on life history traits and population growth of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). - Exp. Appl. Acarol., 50: 255-267.
- MOCHIZUKI M., 1997 – Permethrin resistance and stability in the predatory mite, *Amblyseius womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). - Japanese Journal of App. Entomol. Zool., 41: 1-5.
- NAUEN R., STUMPF N., ELBERT A., ZEBITZ C.P.W., KRAUS W., 2001 – Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). - Pest Manag. Sci., 57: 253-261.
- NAUEN R., STUMPF N., ELBERT A., ZEBITZ C.P.W., KRAUS W., 2001 – Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). - Pest. Manage. Sci., 57: 253-261.
- NUCIFORA A., INSERRA R., 1967 – Il *Panonychus ulmi* (Koch) nei vigneti dell'Etna. Entomologica, 3: 177-236.

- OAKESHOTT J.G., DEVONSHIRE A.L., CLAUDIANOS C., SUTHERLAND T.D., HORNE I., CAMPBELL P.M., OLLIS D.L., RUSSELL R.J., 2005 - *Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases*. - Chem. Biol. Interact., 157: 269-275.
- OH T.S., KOZAKI H., MIZUNO H., TOMITA T., KONO Y., 2006 - *Expression of Ace-paralogous acetylcholinesterase of Culex tritaeniorhynchus with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system*. Pestic. Biochem. Physiol., 85: 46-51.
- OPIT G. P., CHEN Y., WILLIAMS K. A., NECHOLS J. R., MARGOLIES D. C., 2005 - *Plant age, fertilization, and biological control affect damage caused by twospotted spider mites on ivy geranium: Development of an action threshold*. - J. Am. Soc. Hortic. Sci., 130: 159-166.
- OVERMEER W.P.J., VAN ZON A.Q., 1983 - *Resistance to parathion in the predaceous mite Typhlodromus pyri Scheuten (Acarina: Phytoseiidae)*. - Meded. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent., 48: 247-251.
- OZMAN-SULLIVAN S. K., 2006 - *Life history of Kampimodromus aberrans as a predator of Phytoptus avellanae (Acari : Phytoseiidae, Phytoptidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 38: 15-23.
- PINOLINI D., 1896 - *Gli insetti dannosi alla vite*. Tipografia Novarese, Novara, pp. 254.
- POLETTI M., MAIA A. H. N., OMOTO C., 2007 - *Toxicity of neonicotinoid insecticides to Neoseiulus californicus and Phytoseiulus macropilis (Acari : Phytoseiidae) and their impact on functional response to Tetranychus urticae (Acari : Tetranychidae)*. - Biol. Control, 40: 30-36.
- POLETTI M., OMOTO C., 2012 - *Susceptibility to deltamethrin in the predatory mites Neoseiulus californicus and Phytoseiulus macropilis (Acari: Phytoseiidae) populations in protected ornamental crops in Brazil* - Exp. Appl. Acarol., 58: 385-393.
- POZZEBON A., BORGO M., DUSO C., 2010 - *The effects of fungicides on non-target mites can be mediated by plant pathogens*. - Chemosphere, 79: 8-17.
- POZZEBON A., DUSO C., TIRELLO P., ORTIZ P. B., 2011 - *Toxicity of thiamethoxam to Tetranychus urticae Koch and Phytoseiulus persimilis Athias-Henriot (Acari Tetranychidae, Phytoseiidae) through different routes of exposure*. - Pest. Manag. Sci., 67: 352-359.
- PREE D.J., BITTNER L.A., WHITTY K. J., 2002 - *Characterization of resistance to clofentezine in populations of European red mite from orchards in Ontario*. - Exp. Appl. Acarol., 27: 181-193.
- RAUCH N., NAUEN R., 2003 - *Spirodiclofen resistance risk assessment in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach*. - Pest. Biochem. Physiol., 74: 91-101.
- RHODES E. M., LIBURD O. E., KELTS C., RONDON S. I., FRANCIS R. R., 2006 - *Comparison of single and combination treatments of Phytoseiulus persimilis, Neoseiulus californicus, and Acramite (bifenazate) for control of twospotted spider mites in strawberries*. - Exp. Appl. Acarol., 39: 213-225.
- RIBAGA C., 1904 - *Gamasidi planticoli*. - Riv. Pat. veg., 10: 175-178.
- ROSSI E., CONTI B., 1997 - *Valutazione della risposta ad alcuni acaricidi e insetticidi in ceppi di Tetranychus urticae Koch (Acarina: Tetranychidae) e del suo predatore Phytoseiulus persimilis Athias-Henriot (Acarina: Phytoseiidae)*. - Frustula Entomol., 20: 168-177.
- ROTA P., 1962 - *Osservazioni sugli Acari Tetranychidi dannosi alle piante coltivate e ornamentali in Italia*. - Boll. zool. agr. Bachic., 4: 31-136.
- RUI D., 1952 - *La difesa fitopatologica di attualità della vite*. - Riv. Vitic. Enol. V: 39-51.
- SATO M.E., MIYATA T., KAWAI A., NAKANO O., 2001 - *Methidathion resistance mechanisms in Amblyseius womersleyi Schicha (Acari: Phytoseiidae)*. - Pest. Biochem. Physiol., 69: 1-12.
- SATO M.E., TANAKA T., MIYATA T., 2006 - *Monoxygenase activity in methidathion resistant and susceptible populations of Amblyseius womersleyi (Acari: Phytoseiidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 39: 13-24.
- SATO M.E., TANAKA T., MIYATA T., 2007 - *A cytochrome P450 gene involved in methidathion resistance in Amblyseius womersleyi Schicha (Acari: Phytoseiidae)*. - Pestic. Biochem. Physiol., 88: 337-345.
- SCHAUSBERGER P., WALZER A., 2001 - *Combined versus single species release of predaceous mites: predator-predator interactions and pest suppression*. - Biol. Control, 20: 269-278.
- STARK J. D., BANKS J. E., 2003 - *Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods*. - Annu. Rev. Entomol., 48: 505-519.
- STAVRINIDES M. C., MILLS N. J., 2009 - *Demographic effects of pesticides on biological control of Pacific spider mite (Tetranychus pacificus) by the western predatory mite (Galendromus occidentalis)*. - Biol. Control, 48: 267-273.
- STAVRINIDES M.C., HADJISTYLLI M., 2009 - *Two-spotted spider mite in Cyprus: ineffective acaricides, causes and considerations*. - J. Pest Sci 82: 123-128.
- STUMPF N., NAUEN R., 2001 - *Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - J. Econ. Entomol., 94: 1577-1583.
- STUMPF N., NAUEN R., 2001 - *Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - J. Econ. Entomol., 94: 1577-1583.
- STUMPF N., NAUEN R., 2002 - *Biochemical markers linked to abamectin resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - Pestic. Biochem. Physiol., 72: 111-121.
- TARGIONI-TOZZETTI A., 1870 - *La erinosi della vite e suoi acari (Phytoptus vitis Landois)*. - Bull. Soc. Ent. It., II: 283-287.
- TARGIONI-TOZZETTI A., 1876 - *Relazione intorno ai lavori della Stazione di Entomologia agraria per l'anno 1875*. - Ann. Min. Agric. Ind. Comm., 84: 19-108.
- TEMEYER K.B., OLAFSON P.U., BRAKE D.K., TUCKOW A.P., LI A.Y., PÉREZ DE LEÓN A.A., 2013 - *Acetylcholinesterase of Rhipicephalus (Boophilus) microplus and Phlebotomus papatasi: Gene identification, expression, and biochemical properties of recombinant proteins*. - Pestic. Biochem. Physiol. in press.
- TEMEYER K.B., PRUETT J.H., OLAFSON P.U., 2010 - *Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. - Vet. Parasitol., 172: 114-121.
- TIRELLO P., POZZEBON A., DUSO C., 2012a - *Resistance to chlorpyrifos in the predatory mite Kampimodromus aberrans*. - Exp. Appl. Acarol., 56: 1-8.
- TIRELLO P., POZZEBON A., CASSANELLI S., VAN LEEUWEN T., DUSO C., 2012b - *Resistance to acaricides in Italian strains of Tetranychus urticae: toxicological and enzymatic assays*. - Exp. Appl. Acarol., 57: 53-64.
- TOMLIN C., 2003 - *The pesticide manual, 13th edn*. Crop Protection Publications, British Crop Protection Council, XXVI + 1344 pp.

- TSAGKARAKOU A., VAN LEEUWEN T., KHAJEHALI J., ILIAS A., GRISPOU M., WILLIAMSON M. S., TIRRY L., VONTAS J., 2009 – *Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - Insect Mol. Biol., 18: 583-593.
- UESUGI R., GOKA K., OSAKABE M.H., 2002 – *Genetic basis of resistances to chlorfenapyr and etoxazole in the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae)*. - J. Econ. Entomol., 95: 1267-1274.
- URBANEJA A., PASCUAL-RUIZ S., PINA T., ABAD-MOYANO R., VANACLOCHA P., MONTON H., DEMBILIO O., CASTANERA P., JACAS J. A., 2008 – *Efficacy of five selected acaricides against Tetranychus urticae (Acari: tetranychidae) and their side effects on relevant natural enemies occurring in citrus orchards*. - Pest. Manag. Sci., 64: 834-842.
- VAN DE BAAN H.E., KUIJPERS L.A.M., OVERMEER W.P.J., OPPENOORTH F.J., 1985 – *Organophosphorous and carbamate resistance in the predacious mite Typhlodromus pyri due to insensitive acetylcholinesterase*. - Exp. Appl. Acarol. 1: 3-10.
- VAN DE VRIE, M., MCMURTRY J.A., HUFFAKER C.B., 1972. – *Ecology of Tetranychid mites and their natural enemies: a review. III. Biology, ecology and pest status and host-plant relations of tetranychids*. - Hilgardia 41: 343-432.
- VAN LEEUWEN T., DEMAEGHT P., OSBORNE E.J., DERMAUW W., GOHLKE S., NAUEN R., GRBI M., TIRRY L., MERZENDORFER H., CLARK R.M., 2012 – *Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109: 4407-4412.
- VAN LEEUWEN T., TIRRY L., 2007 – *Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae*. - Pest Manag. Sci., 63: 150-156.
- VAN LEEUWEN T., TIRRY L., NAUEN R., 2006a – *Complete maternal inheritance of bifenthrin resistance in Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations*.- Insect Biochem. Mol. Biol., 36: 869-877.
- VAN LEEUWEN T., VAN NIEUWENHUYSE P., VANHOLME B., DERMAUW W., NAUEN R., TIRRY L., 2011 – *Parallel evolution of cytochrome b mediated bifenthrin resistance in the citrus red mite Panonychus citri*. - Insect Mol. Biol., 20: 135-140.
- VAN LEEUWEN T., VAN POTTELBERGE S., TIRRY L., 2006b – *Biochemical analysis of a chlorfenapyr selected resistant strain of Tetranychus urticae Koch*. - Pest. Manag. Sci., 62: 425-433.
- VAN LEEUWEN T., VANHOLME B., VAN POTTELBERGE S., VAN NIEUWENHUYSE P., NAUEN R., TIRRY L., DENHOLM I., 2008 – *Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action*.- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105: 5980-5985.
- VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., DERMAUW W., TIRRY L., 2010 – *Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: A review*. - Insect. Biochem. Mol. Biol., 40: 563-572.
- VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., DERMAUW W., TIRRY L., 2010 – *Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: a review*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 40: 563-572.
- VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., TIRRY L., 2009 – *Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae*. In: Biorational Control of Arthropd Pests, Ishaaya I. & Horowitz A.R. Ed., Springer, The Netherlands, pp 347-393
- VAN NIEUWENHUYSE P., DEMAEGHT P., DERMAUW W., KHALIGHI M., STEVENS C.V., VANHOLME B., TIRRY L., LÜMMEN P., VAN LEEUWEN T., 2012 – *On the mode of action of bifenthrin: New evidence for a mitochondrial target site*. - Pestic. Biochem. Phys., 104: 88-95.
- VAN NIEUWENHUYSE P., VAN LEEUWEN T., KHAJEHALI J., VANHOLME B., TIRRY L., 2009 – *Mutations in the mitochondrial cytochrome b of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenthrin and acequinocyl*. - Pest Manag. Sci., 65: 404-412.
- VAN POTTELBERGE S., VAN LEEUWEN T., KHAJEHALI J., TIRRY L., 2009 – *Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spiroticlofen-resistant strain of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae)*. - Pest Manag. Sci., 65: 358-366.
- VAN POTTELBERGE S., VAN LEEUWEN T., VAN AMERMAET K., TIRRY L., 2008b – *Induction of cytochrome P450 monooxygenase activity in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and its influence on acaricide toxicity*. - Pest Biochem. Physiol., 91: 128-133.
- Vector base: assembly <https://www.vectorbase.org/organisms/ixodes-scapularis>
- VIDAL C., KREITER S., 1995 – *Resistance to a range of insecticides in the predaceous mite Typhlodromus pyri (Acari: Phytoseiidae): inheritance and physiological mechanisms*. - J. Econ. Entomol., 88: 1097-1105.
- WERMELINGER B., OERTLI J. J., DELUCCHI V., 1985 – *Effect of host plant nitrogen-fertilization on the biology of the 2-spotted spider-mite, Tetranychus urticae*. - Entomol. Exp. Appl., 38: 23-28.
- WHALON M. E., MOTA-SANCHEZ D., HOLLINGWORTH R.M., GUTIERREZ R., 2013 – *Arthropod Pesticide Resistance Database 2012*. www.pesticideresistance.org.
- ZANGHERI S., MASUTTI L., 1962 – *Osservazioni e considerazioni sul problema degli acari della vite nelle Venezie*. - Riv. Vitic. Enol., XV: 1-16.
- ZHANG Y., LIA S., LU X., GUO H.F., WANG L. , ZI J., HE P., FANG J., 2013 – *Overexpression of carboxylesterase-1 and mutation (F439H) of acetylcholinesterase-1 are associated with chlorpyrifos resistance in Laodelphax striatellus*. - Pestic. Biochem. Physiol. (in press).

RUOLO DELLE COLINESTERASI NELLA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI

VINCENZO NICOLA TALESA (*) - CINZIA ANTOGNELLI (*) - LETIZIA MEZZASOMA (*)

(*) *Università degli Studi di Perugia - Dipartimento di Medicina sperimentale - Sezione di biologia cellulare e molecolare; Sant'Andrea delle Fratte 06132, Perugia; e-mail: talesa@unipg.it; cinzia.antognelli@unipg.it; lmezzaso@unipg.it*
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Role of cholinesterases in insecticides resistance

The modern agriculture has received an important advantage from the growing availability of chemical compounds acting as insecticides (e.g., organophosphates, carbamates, pyrethroids). Nevertheless, the intensive use of such insecticides gave rise to the appearance of a number of resistant species where the presence of changes in their enzymatic activities made them less sensitive to the toxicity of the commonly used insecticides. Therefore, the continuous research of new molecules to be employed to this aim is urgently required. In general, insecticides resistance represents a significant example of natural selection and occurs through different mechanisms. Insecticide resistance to organophosphates and carbamates, for instance, can be the result of changes in acetylcholinesterase (AChE) activity, the enzyme present both at cholinergic synapses and neuromuscular junctions of either some Invertebrates and Vertebrates, conferred by the related gene mutations. Detection of AChE altered insecticide-target site mutation is important in guiding informed decisions for resistance management.

KEY WORDS: Cholinesterases, Acetylcholinesterases, Insects, Resistance, Insecticides.

La moderna agricoltura ha ricavato un notevole vantaggio dalla crescente disponibilità di composti chimici con attività insetticida. Tuttavia, il loro uso intensivo ha dato luogo alla comparsa di varie specie resistenti in cui la presenza di modificazioni enzimatiche li rende meno sensibili all'azione tossica dei vari insetticidi utilizzati, richiedendo così la continua ricerca di nuove molecole da utilizzare a questo scopo. Nel suo complesso la resistenza agli insetticidi rappresenta un importante esempio di selezione naturale realizzata mediante l'instaurarsi di meccanismi che portano alla diminuzione della dose effettiva di insetticida con cui gli insetti si trovano ad interagire. Questo risultato può realizzarsi mediante:

- (i) riduzione della penetrazione dell'insetticida all'interno dell'insetto;
- (ii) aumento della capacità metabolica intracellulare dell'insetticida ad opera di esterasi, ossidasi a funzione mista o glutatione S-trasferasi;
- (iii) diminuzione della sensibilità dei target molecolari dell'insetticida che ne rendono inefficace la dose di esposizione.

Uno dei principali target è costituito dalle Acetilcolinesterasi (AChE, EC 3.1.1.7), enzimi presenti a livello delle sinapsi colinergiche di tutti gli animali e delle giunture neuromuscolari di alcuni invertebrati e dei vertebrati (SOREQ & ZAKUT, 1993). La via colinergica rappresenta uno dei

maggiori sistemi di comunicazione intercellulare che opera mediante svariati recettori ed attiva risposte in vari tipi di cellule e tessuti. L'idrolisi dell'acetilcolina da parte delle AChE è il principale passaggio che fa terminare rapidamente la neurotrasmissione colinergica. L'AChE è il target principale di molti composti ad azione insetticida prodotti dall'industria, inclusi gli organofosfati (OP) ed i carbammati (SOREQ & ZAKUT, 1993; MATSUMURA, 1985; HAREL *et al.*, 2000). Allo scopo di poter utilizzare insetticidi ad elevata tossicità per gli insetti, ma a bassa o relativamente bassa tossicità per i mammiferi, le AChE degli insetti sono state un importante campo di studio, soprattutto per quanto concerne l'evidenziazione di differenze tra le loro caratteristiche e quelle delle AChE e Butirilcolinesterasi (BChE, EC 3.1.1.8) dei vertebrati. Anche se la presenza di BChE è stata ipotizzata negli insetti e in altri invertebrati, nei vertebrati sono state purificate solo AChE che presentavano proprietà intermedie tra quelle delle AChE e quelle delle BChE (TOUTANT, 1989). Un'importante differenza è che la propionilcolina è il substrato che viene idrolizzato con efficienza catalitica uguale o maggiore rispetto all'acetilcolina (PRINCIPATO *et al.*, 1981). Sono state realizzate indagini di tipo biochimico sulle AChE di oltre 20 specie di insetti, generalmente condotte su materiale non purificato. La caratte-

rizzazione dei geni delle AChE è stata invece completata in poche specie (PRINCIPATO *et al.*, 1981; HALL & SPIERER, 1986; HALL & MALCOLM, 1991; ANTHONY *et al.*, 1995; ZHU & CLARK, 1995; HUANG *et al.*, 1997; TOMITA *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; LI & HAN, 2002; GAO *et al.*, 2002), incluse due specie di afidi, *Aphis gossypii* (GAO *et al.*, 2002; LI & HAN, 2002) e *Schizaphis graminum* (LI & HAN, 2002).

Le ragioni molecolari dell'induzione della resistenza agli insetticidi sono ben lontane dall'essere ad oggi completamente chiarite. Sono state identificate mutazioni puntiformi, talvolta nella stessa subunità catalitica dell'enzima, capaci di conferire resistenza agli insetticidi (MUTERO *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 1996; VILLATTE *et al.*, 2000; WALSH *et al.*, 2001), anche se, in altri casi, la presenza di AChE resistenti non sembra essere stata associata a nessuna mutazione del relativo gene (TOMITA *et al.*, 2000; BAXTER & BARKER, 1998; REN *et al.*, 2002; FOURNIER *et al.*, 1987).

Negli ultimi anni le ricerche sul tema si sono indirizzate verso la mutagenesi sito-specifica per individuare i residui amminoacidici presenti nel sito attivo dell'enzima, target degli OP. I dati presenti in letteratura ancora non indicano in modo chiaro la correlazione tra mutazione del gene ed induzione della resistenza. I risultati di studi cinetici indicano comunque differenti proprietà cinetiche negli enzimi resistenti. Uno dei problemi principali di tali ricerche è che sono state condotte su estratti non purificati e, quindi, i risultati sono di difficile interpretazione in quanto influenzati in modo imprevedibile dalla presenza di contaminanti di ogni tipo (FOURNIER *et al.*, 1987; MOORES *et al.*, 1994; SHARON & RYAN, 1999). È possibile, quindi, che l'induzione della resistenza non sia soltanto da attribuire alla presenza di un gene mutato, ma, probabilmente, anche alla presenza di differenze nelle modalità di ancoraggio dell'AChE alle membrane o a modificazioni post-traduzionali che comportano la comparsa di proprietà cinetiche modificate, utili ai fini della resistenza (LI & HAN, 2002).

Le colinesterasi sono una classe di idrolasi serina-dipendenti, ubiquitarie nel regno animale, che presentano un elevato polimorfismo legato alla struttura quaternaria; tali enzimi possono essere sia solubili che associati a membrane. Le subunità che costituiscono l'enzima attivo possono essere 1, 2, 4 o multiple di 4. In base alle modalità di ancoraggio alle membrane biologiche si distinguono in forme molecolari globulari (G) ed asimmetriche (A) (queste ultime presenti solo nelle giunzioni neuromuscolari dei Vertebrati). Le forme globulari possono essere presenti nei fluidi organici o associate alle membrane

anche mediante ancore glicolipidiche (MASSOULIÉ *et al.*, 1999) (Fig. 1). Negli invertebrati, sono state descritte solo forme globulari e non vi è alcuna prova dell'esistenza di forme molecolari associate alle membrane mediante una coda collagenica. Per esempio, gli insetti possiedono solo forme GI e GII, e la configurazione molecolare maggiore è un dimerio anfifilico legato alla membrana mediante un'ancora glicolipidica (GPI).

Il sito attivo dell'enzima si trova alla fine di una stretta e profonda gorgia catalitica, dove è localizzata la triade catalitica [S200, H440, E327 in Torpedo (AChE)]. Poiché il residuo di serina è presente e caratterizza tutte le AChE sia dei mammiferi che di altre specie dotate di un sistema colinergico, molti insetticidi hanno come target l'inattivazione di questo residuo amminoacidico. Un'altra caratteristica del meccanismo catalitico dell'AChE è la presenza di un sito anionico periferico [W279 in Torpedo (AChE)], posto all'inizio della gorgia catalitica, e responsabile dell'effetto dell'inibizione da eccesso di substrato (SHAFFERMAN *et al.*, 1992 & RADY *et al.*, 1991) (Fig. 2).

È ormai accettato che, a differenza dei mammiferi e di alcune mosche, la maggior parte degli insetti possiede due geni per l'AChE. Gli insetti con un singolo gene includono la mosca della frutta (ADAMS *et al.*, 2000), *Musca domestica* (WALSH *et al.*, 2001), *Haematobia irritans* (TEMEYER & CHEN, 2007), *Bactrocera oleae* (VONTAS *et al.*, 2002), *Bactrocera dorsalis* (HSU *et al.*, 2006), *Ceratitis capitata* (MAGANA *et al.*, 2008), la mosca stabile *Stomoxys calcitrans*, *Lucilia cuprina* (CHEN *et al.*, 2001).

L'allineamento di nove sequenze di AChE (nella specie umana, in *Branchiostoma floridae*, *Torpedo californica*, zanzara africana, afide del cotone, afide verde del pesco e lape) ha permesso l'identificazione di un residuo di cisteina, Cys289 assente nell'AChE umana, in quella dei pesci e degli uccelli, ma conservata negli insetti. Questi dati di allineamento insieme ad esperimenti di mutazione sito-specifica e a dati biochimici relativi alla sensibilità dell'AChE degli Afidi ad inibitori sulfidrilici, hanno permesso di candidare la Cys289 come un possibile bersaglio di nuovi e selettivi inibitori afidi-specifici (ROWLAND *et al.*, 2008).

Tuttavia, esperimenti condotti *in vitro* con alcuni composti (AMTS7 – AMTS20) realizzati per inibire la Cys289, hanno dimostrato una parziale ed irreversibile inibizione dell'AChE umana.

La possibilità di impiegare la Cys289 potrebbe comunque portare ad alcuni vantaggi. In primo luogo, gli insetticidi che colpiscono il residuo di cisteina insetto-specifico dovrebbero essere meno tossici per i mammiferi degli attuali anti-colinesterasi, che agiscono a livello dell'ubiquitario residuo

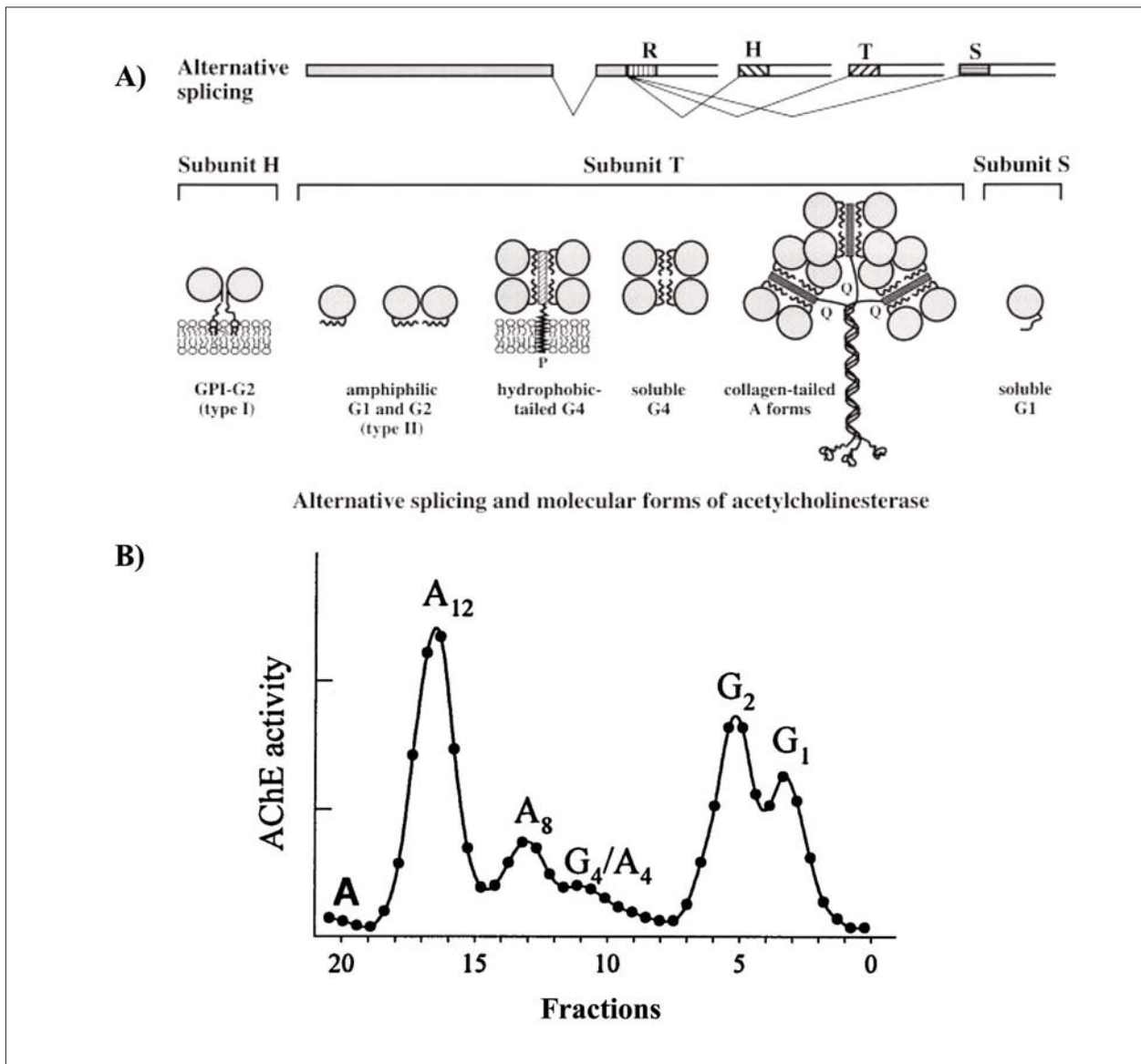


Figura 1

(Da Massoulié *et al* 1999) (A) Le Acetilcolinesterasi possiedono un elevato polimorfismo molecolare; ne esistono forme globulari (G) e asimmetriche (A). Tre forme globulari (G1 G2, e G4) corrispondono a monomeri, dimeri e tetrameri delle subunità catalitiche dell'enzima. Le tre forme asimmetriche (A4, A8 e A12) sono associazioni di uno, due o tre tetrameri catalitici ancorati alle membrane mediante un' ancora collagenica. La dimensione e la forma di queste diverse forme molecolari viene evidenziata mediante centrifugazione su gradiente di saccarosio che permette di determinare i loro coefficienti di sedimentazione. Questo elevato polimorfismo è generato nei vertebrati dallo splicing alternativo di un singolo gene e per modificazione post-traduzionale dei precursori. (B) Profilo di sedimentazione delle forme molecolari asimmetriche (A) e globulari (G) di Acetilcolinesterasi.

di serina di tutte le AChE. In secondo luogo, il residuo di cisteina allevia i problemi di resistenza che si sono verificati con gli attuali insetticidi serina-targeting, utilizzati per decenni, in quanto gli insetti non hanno avuto opportunità di sviluppare resistenza agli insetticidi cisteina-targeting. Terzo, la maggior parte degli insetti sembra avere una AChE con un residuo di cisteina libera all'ingresso del sito attivo; questo consente un approccio generico per sviluppare insetticidi cisteina-targeting. Infine, l'ipotesi offre un basso costo di svi-

luppo per nuovi insetticidi.

La resistenza agli insetticidi dovuta a mutazioni nella regione codificante l'AChE è stata dimostrata in alcuni insetti come ad esempio in *Drosophila melanogaster* (BOUBLIK *et al.*, 2002). I geni sequenziati ed allineati provenienti da ceppi di diverse parti del mondo, sia sensibili che insensibili agli insetticidi, ha rivelato la presenza di quattro diffuse mutazioni, I161V, G265A, F330Y e G368A. Tale confronto dimostra che le mutazioni si trovano sia isolate o in combinazione nella stessa pro-

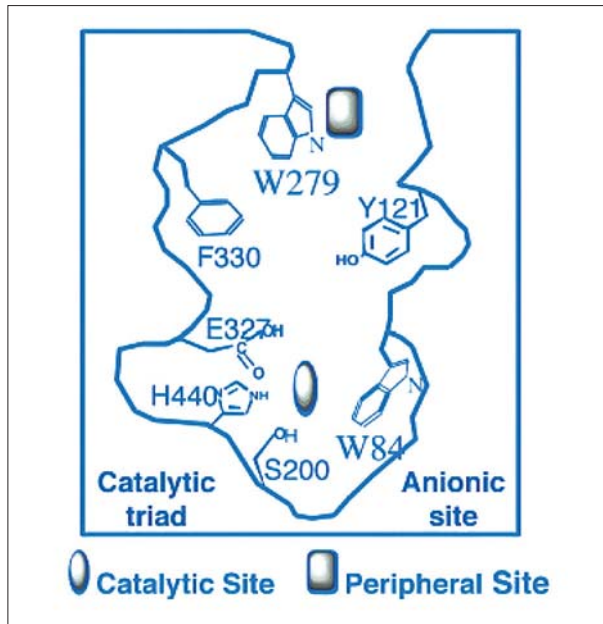


Figura 2
Rappresentazione schematica del sito attivo dell'Acetilcolinesterasi.

teina. Gli studi sull'espressione *in vitro* delle proteine mutate hanno evidenziato che la combinazione di più mutazioni nella stessa proteina ha come conseguenza un aumentato livello e un ampio spettro di resistenza.

In *Aphis gossypii* le sequenze insensibili di AChE differiscono da quelle suscettibili per la presenza di una fenilalanina al posto di una serina in posizione 431 (S431F), mentre tre mutazioni (I298, G401, F466) sono state trovate nella sequenza di *Cochliomyia hominivorax* insensibile agli insetticidi.

L'ancoraggio dell'AChE alle membrane biologiche è determinante per la rapida idrolisi dell'acetilcolina nella sinapsi colinergica (Fig. 3). Si conoscono almeno tre tipi di ancoraggio, tra cui il più diffuso avviene mediante un'ancora glicolipidica (GPI). La resistenza agli organofosfati in *Bactrocera oleae* è associata ad una mutazione che impedisce l'esatto posizionamento dell'inibitore nel sito attivo dell'AChE. Inoltre, è stata individuata, nello stesso gene, una mutazione nella regione codificante per l'ancoraggio glicolipidico. Tale mutazione è costituita da una delezione di tre glutammine su cinque nella regione di un piccolo peptide che, normalmente, viene scisso e sostituito con l'ancora GPI. La proteina risultante è identica per parametri cinetici rispetto a quella nativa, ma comporta il legame di un maggior numero di molecole di AChE alla membrana producendo una maggiore attività enzimatica e incrementando l'insensibilità dell'enzima all'inibitore (KAKANI *et al.*, 2011).

Altri meccanismi di resistenza agli organofosfati sono stati osservati in organismi quale *Tetranychus*

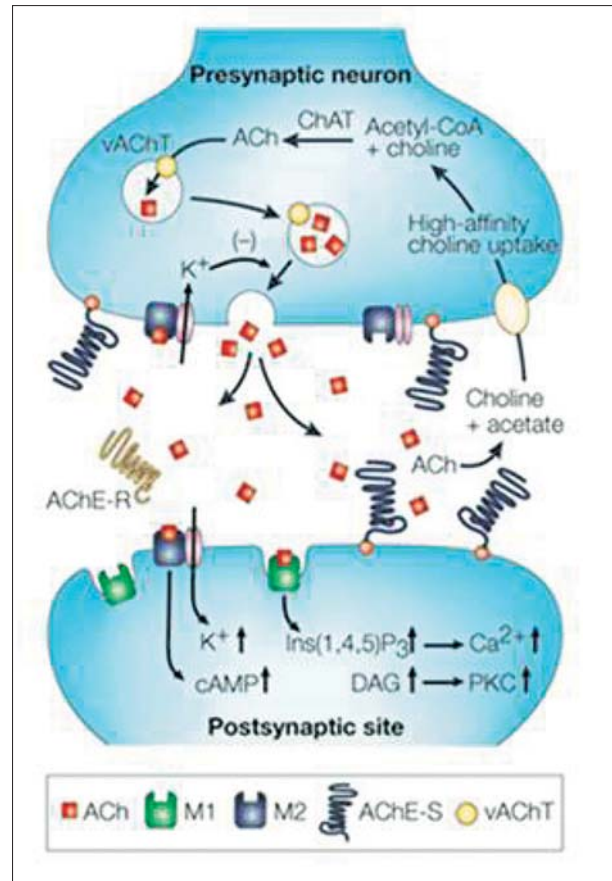


Figura 3
L'Acetilcolinesterasi è legata alla membrana esterna ed orientata in modo che il legame dell'acetilcolina con il suo recettore e la successiva idrolisi del neurotrasmettitore avvengono in circa 150 millisecondi, che equivale all'idrolisi di 5000 molecole di acetilcolina/per molecola di enzima/secondo.

urticae, dove la resistenza agli insetticidi sembra essersi evoluta attraverso una combinazione di accumulo di mutazioni ed una ampia duplicazione genica (KWON *et al.*, 2010).

Le esterasi, come le acetilcolinesterasi, appartengono alle carbossilesterasi, una famiglia genica versatile che comprende proteine con funzioni altamente specializzate; alcune di queste hanno una forte specificità di substrato (come ad esempio l'ormone giovanile esterasi e l'acetilcolinaesterasi), mentre altre sono meno specifiche (comunemente chiamate esterasi) o non possiedono attività catalitica (quali neurolegina, gliotactina e neurotactina). Le esterasi sono enzimi capaci di idrolizzare legami estere per generare un acido e un alcol.

Le carbossilesterasi sono coinvolte nel meccanismo di resistenza agli organofosfati, carbammati e, in misura minore, ai piretroidi. Infatti, una vasta gamma di insetticidi contiene legami estere e, quindi, è suscettibile di idrolisi da parte delle esterasi. Inoltre, mutazioni a carico di alcune esterasi sono spesso implicate nella maggior resistenza ad organofosfati e piretroidi in insetti ed acari.

In *Culex pipens*, due loci genici, Est-2 ed Est-3, codificano le esterasi non specifiche attraverso l'amplificazione genica o up-regolazione. Questi loci sono sempre in completo linkage disequilibrium da cui la denominazione di superlocus esterasi. Ad oggi, sono stati identificati nel superlocus, dodici alleli che conferiscono resistenza agli OP (le corrispondenti esterasi sovraespresse sono denominate in parentesi): Ester1 (A1), Ester2 (A2-B2), Ester4 (A4-B4), Ester5 (A5-B5), Ester8 (A8-B8), Ester9 (A9-B9), Ester11 (A11-B11), EsterB1 (B1), EsterB6 (B6), EsterB7 (B7), EsterB10 (B10) e EsterB12 (B12) (YANGYANG *et al.*, 2011).

Due mutazioni presenti nel sito catalitico di alcune esterasi (G137D e W251L) sono in grado di migliorare la performance idrolitica dell'enzima conferendo agli organismi portatori di tali mutazioni una maggiore resistenza agli insetticidi. La presenza della mutazione G137D aumenta l'idrolisi dei dietil- e dimetil-fosfati, rispettivamente di 55 e 33 volte rispetto all'enzima nativo. Inoltre, la mutazione W251L aumenta parimenti la velocità di idrolisi del dime-tilfosfato ma, a differenza dell'altra mutazione, la velocità di idrolisi del dietilfosfato aumenta solo di 10 volte. Questa mutazione mantiene anche la capacità di idrolizzare esteri carbossilici appartenenti al gruppo del malathion (malathion carbossilesterasi, MCE), conferendo una forte resistenza nei confronti di questo composto.

Come abbiamo visto, una mutazione nella regione codificante di un enzima ed in particolare nella regione del sito attivo può aumentare, diminuire o annullare la capacità di metabolizzare un substrato. Esistono alcuni casi in cui una mutazione può conferire ad un enzima la capacità di metabolizzare nuovi substrati. Una singola sostituzione amminoacidica, ad esempio, converte una carbossilesterasi in una organofosfato idrolasi, conferendo resistenza agli insetticidi in alcune specie di insetti. In *Lucilia cuprina* l'esterasi E3 può subire una mutazione (Gly137 Asp) responsabile sia della perdita di attività di tipo carbossilesterasico che dell'acquisizione di una nuova attività idrolasica nei confronti degli OP (NEWCOMB *et al.*, 1997).

BIBLIOGRAFIA

ADAMS M.D., CELNIKER S.E., HOLT R.A., *et al.*, 2000 – *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. - Science., 287: 2185-2195.
ANTHONY N., ROCHELEAU T., MOCELIN G., LEE H.J., FRENCH-CONSTANT R., 1995 – *Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito Aedes aegypti*. - FEBS Lett., 368: 461-465.
BAXTER G.D., BARKER S.C., 1998 – *Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, Boophilus microplus: characteri-*

sation and role in organophosphate resistance. Insect Biochem. - Mol. Biol., 28: 581-589.
BOUBLIK Y., SAINT-AGUET P., LOUGARRE A., ARNAUD M., VILLATTE F., ESTRADA-MONDACA S., FOURNIER D., 2002 – *Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues*. - Protein Eng., 15: 43-50.
CHEN Z., NEWCOMB R., FORBES E., MCKENZIE J., BATTERHAM P., 2001 – *The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, Lucilia cuprina*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 31: 805-816.
FOURNIER D., CUANY A., BRIDE J.M., BERGE J.B., 1987 – *Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (Musca domestica L.)*. - J. Neurochem., 49: 1455-1461.
GAO J.R., KAMBHAMPATI S., ZHU K.Y., 2002 – *Molecular cloning and characterization of a greenbug (Schizaphis graminum) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 32: 765-775.
HALL L.M., SPIERER P., 1986 – *The Ace locus of Drosophila melanogaster: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader*. - EMBO J., 5: 2949-2954.
HALL L.M., MALCOLM C.A., 1991 – *The acetylcholinesterase gene of Anopheles stephensi*. - Cell. Mol. Neurobiol., 11: 131-141.
HAREL M., KRYGER G., ROSENBERY T.L., MALLENDER W.D., LEWIS T., FLETCHER R.J., GUSS J.M., SILMAN I., SUSSMAN J.L., 2000 – *Three-dimensional structures of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors*. - Protein Sci., 9: 1063-1072.
HSU J.C., HAYMER D.S., WU W.J., FENG H.T., 2006 – *Mutations in the acetylcholinesterase gene of Bactrocera dorsalis associated with resistance to organophosphorus insecticides*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 36: 396-402.
HUANG Y., QIAO C., WILLIAMSON M.S., DEVONSHIRE A.L., 1997 – *Characterization of the acetylcholinesterase gene from insecticide-resistant houseflies (Musca domestica)*. - Chin. J. Biotechnol., 13: 177-183.
KAKANI E.G., BON S., MASSOULIÉ J., MATHIOPOULOS K.D., 2011 – *Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides*. - Insect. Biochem. Mol. Biol.; 41 (3): 150-8.
KWON D.H., CLARK J.M., LEE S.H., 2010 – *Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite*. - Insect. Mol. Biol., 19: 195-204.
LI F., HAN Z.J., 2002 – *Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (Aphis gossypii)*. - Genome, 45: 1134-1141.
LI F., HAN Z., 2002 – *Purification and Characterization of Acetylcholinesterase From Cotton Aphid (Aphis gossypii Glover)*. - Arch. Insect. Biochem. Physiol., 51: 37-45.
LIU Y., ZHANG H., QIAO C., LIU X., CUI F., 2011 – *Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in Culex pipiens complex from China*. - Parasit. Vectors., 4: 236.
MAGAÑA C., HERNÁNDEZ-CRESPO P., BRUN-BARALE A., COUSO-FERRER F., BRIDE J.M., CASTAÑERA P., FEYEREISEN R., ORTEGO F., 2008 – *Mechanisms of resistance to malathion in the medfly Ceratitis capitata*. - Insect. Biochem. Mol. Biol., 38: 756-762.
MASSOULIÉ J., ANSELMET A., BON S., KREJCI E., LEGAY C., MOREL N., SIMON S., 1999 – *The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization*. - Chem. Biol. Interact., 119: 29-42

- MATSUMURA F., 1985 – *Toxicology of Insecticides*. Plenum Press, New York.
- MOORES G.D., DEVINE G.J., DEVONSHIRE A.L., 1994 – *Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in Myzus persicae and Myzus nicotianae*. - Pesticide Biochem. Physiol. 49: 114-120.
- MUTERO A., PRALAVORIO M., BRIDE J., FOURNIER D., 1994 – *Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5922-5926.
- NEWCOMB R.D., CAMPBELL P.M., OLLIS D.L., CHEAH E., RUSSELL R.J., OAKESHOTT J.G., 1997 – *A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94: 7464-7468.
- PRINCIPATO G.B., AMBROSINI M.V., LIOTTI F.S., GIOVANNINI E., 1981 – *Propionylcholinesterase in Hirudo medicinalis: purification, partial characterization and comparative study with a mammalian acetylcholinesterase*. - Comp. Biochem. Physiol. C., 70: 209-213.
- RADI Z., REINER E., TAYLOR P., 1991 – *Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives*. - Mol. Pharmacol. 39:98-104.
- REN X., HAN Z., WANG Y., 2002 – *Mechanisms of monocrotophos resistance in cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Hubner)*. - Arch. Insect Biochem. Physiol., 51: 103-110.
- ROWLAND M., TSIGELNY I., WOLFE M., PEZZEMENTI L., 2008 – *Inactivation of an invertebrate acetylcholinesterase by sulfhydryl reagents: a reconsideration of the implications for insecticide design*. - Chem. Biol. Interact., 175: 73-75.
- SHAFFERMAN A., KRONMAN C., FLASHNER Y., LEITNER M., GROSFELD H., ORDENTLICH A., GOZES Y., COHEN S., ARIEL N., BARAK D., et al., 1992 – *Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding*. - J. Biol. Chem. 267: 17640-8.
- SHARON K., RYAN M.F., 1999 – *Purification, characterization, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, Galleria mellonella (L.)*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 29: 1097-1104.
- SOREQ H., ZAKUT H., 1993 – *Human Cholinesterases and Anticholinesterases*. Academic Press, San Diego.
- TEMEYER K.B., CHEN A.C., 2007 – *Identification and characterization of a cDNA encoding the acetylcholinesterase of Haematobia irritans (L.) (Diptera: Muscidae)*. - DNA Seq., 18: 85-91.
- TOMITA T., HIDOH O., KONO Y., 2000 – *Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, Nephotettix cincticeps*. - Insect. Biochem. Mol. Biol., 30: 325-333.
- TOUTANT J.P., 1989 – *Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms*. - Progr. Neurobiol., 32: 423-446.
- VILLATTE F., ZILIANI P., MARCEL V., MENOZZI P., FOURNIER D., 2000 – *A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance*. - Pest. Biochem. Physiol., 67: 95-102.
- VONTAS J.G., HEJAZI M.J., HAWKES N.J., COSMIDIS N., LOUKAS M., JANES R.W., HEMINGWAY J., 2002 – *Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly Bactrocera oleae*. - Insect Mol Biol., 11: 329-336.
- WALSH S.B., DOLDEN T.A., MOORES G.D., KRISTENSEN M., LEWIS T., DEVONSHIRE A.L., WILLIAMSON M.S., 2001 – *Identification and characterization of mutations in housefly (Musca domestica) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance*. - Biochem. J., 359: 175-181.
- ZHU K.Y., CLARK J.M., 1995 – *Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say)*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 25: 1129-1138.
- ZHU K.Y., LEE S.H., CLARK J.M., 1996 – *A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle*. - Pestic. Biochem. Physiol., 55: 100-108.

NEXT GENERATION INSECTICIDE RESISTANCE MANAGEMENT: TRANSGENIC CONTRIBUTIONS

KEVIN GORMAN (*) - NEIL MORRISON (*) - LUKE ALPHEY (*)

(*) Oxitec Ltd, 71 Milton Park, Abingdon, OX14 4RX, UK; e-mail: Kevin.Gorman@oxitec.com

Sintesi della lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

SYNTHESIS – In recent decades insecticides have played an invaluable role in contemporary integrated pest management (IPM) strategies. Although such cultural, physical, biological and chemical combinations are complementary to one another and can reduce over-reliance on single components, true synergism between them is rarely reported. Transgenic technologies for the control of insect pests in an autocidal manner are developing at an increasingly rapid rate, and in the case of Oxitec's genetic technology, offer potential direct synergism with insecticides and a significant insecticide resistance management (IRM) benefit.

It is now over 30 years since the first transgenic insect, *Drosophila melanogaster*, was developed and it has since become a model species for novel transgenic techniques. Indeed, work on *D. melanogaster* was also a precursor to Oxitec's insect control technology. Numerous pest insects have been the target for genetic transformations including fruit flies such as *Ceratitis capitata* (Medfly) and *Bactrocera oleae* (olive fruit fly). The first transgenic coleopteran was *Tribolium castaneum* (red flour beetle) and the first pest moth was *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm); the latter being a devastating global pest of cotton prior to the advent of transgenic *Bt* cotton. The first transgenic mosquito, *Aedes aegypti* (yellow fever mosquito), was published in 1998; this species is the primary vector of several human viral diseases including yellow fever, dengue fever, and chikungunya. The first transgenic strain of a malaria-transmitting mosquito, *Anopheles stephensi* (Asian malaria mosquito), was published in 2000. As these dates illustrate, the ability to insert exogenous DNA into the genomes of pest insects has only relatively recently been developed, nonetheless applications are rapidly being developed.

Oxitec have now successfully applied transgenic insect control techniques in the field. The biological characteristics of transgenic *P. gossypiella* were

examined in large-scale open release experiments in Arizona, USA; they were shown to have similar mating competitiveness to wild-type counterparts and stable expression of the genetically incorporated fluorescent marker. Most notably, 80-95% control of populations of the dengue vector, *Ae. aegypti*, was achieved after several months of releases at distinct sites in the Cayman Islands and north-east Brazil. National regulatory authorities in Europe, the Americas, Asia, and the Middle-east have granted permission to import and study specific Oxitec transgenic insect lines in contained surroundings. Following appropriate biosafety assessments, four of these have granted permission to conduct deliberate open releases into the environment (USA, Cayman Islands, Malaysia and Brazil).

Classic sterile insect technique (SIT) has been in use for many years for area-wide suppression of target pest populations and in some cases even elimination of target pest populations on various scales. To implement SIT, millions of insects are reared under strictly controlled conditions before being subjected to sterilising levels of radiation treatment. Insects are then released at high densities throughout the target area. When the sterilised males mate with wild females, the fertilised eggs are largely non-viable due to radiation-induced lethal genetic mutations in the sperm and few or no viable progeny are produced. Successive releases over multiple generations result in a decline in the wild population. SIT was used effectively to eradicate the New World screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) from the USA and Mexico in recent decades, and the control of Medfly has been enhanced by SIT in many regions. Other successful SIT programmes have targeted Queensland, Mexican, and West Indian fruit flies, codling moth in Canada, and pink bollworm in south-western USA.

SIT has several positive attributes including an environmentally friendly profile and good efficacy

in specific cases. The control agent (sterile males) will actively disperse themselves to seek out the wild pest females, and since these males will only mate with females of the same species, the method is exquisitely species-specific. However, the complexities of consistently mass-rearing and releasing high-quality insects at the correct time and place present a significant challenge.

Oxitec genetic control using lethal transgenes works in a similar manner to SIT, except that it has a number of key advantages. Primarily, instead of sterilisation by irradiation the insects cannot reproduce because they pass on a dominant lethal gene to their offspring. This death of progeny circumvents the irradiation process and any associated concerns, which can include a reduction in fitness as a consequence of radiation exposure, financial, and safety considerations. Oxitec insects carry a genetic fluorescent marker that enables quick and easy identification - so all released insects can be tracked and their performance assessed. The heritable dominant lethals ensure that the strains cannot persist in the environment.

One common constraint to the successful implementation of SIT type strategies is the need for sexing: separation of useful males from females, which are also potentially damaging to crops or as disease vectors. These procedures are frequently unavailable, and can be labour-intensive and costly. Genetic sexing strains, in which both sexes carry the lethal transgene but only females express the phenotype, can offer dramatic improvements in programme efficiency. Transgenic sexing strains can be mass-reared in the presence of a dietary antidote, and withholding the antidote from the pre-release generation conveniently removes the females. Post-release, transgenic males mate with wild females and their female progeny die. Persistent release of such males will result in a crash in the number of females in the field, and a consequent reduction in the reproductive potential of the wild pest popula-

tion. This effect has been demonstrated in caged experiments with both Medfly and olive fly.

The introgression of insecticide-susceptible genes as a consequence of segregation during mating between male heterozygotes and wild females can ‘dilute’ resistance in the wild population. Both modelling and semi-field studies of insecticide-resistance allele frequencies have demonstrated that repeated releases of insecticide-susceptible individuals carrying a female-specific lethal transgene can reduce resistance levels in pest populations, offering a potentially powerful secondary benefit for pest control. Providing the released transgenic insects are susceptible, this approach can provide resistance management benefits for all insecticides and would also serve to protect novel modes of action from the initial onset of resistance in a pre-emptive manner.

Insecticides are most efficient when pest populations are high, whereas Oxitec’s genetic control is most effective when pest populations are lower. Consequently, their synergistic integration can provide:

- control of high pest populations quickly and economically;
- long-term suppression of pest populations below economic thresholds;
- reduction in the level and/or development of insecticide resistance;
- options for the control of sporadic outbreaks /hotspots;
- control of pests for which biocontrol is not effective (e.g. olive fly).

In combination, insecticidal and genetic insect control methods could provide sustainable, economical and safe management of pests. The approach provides, in principle, a contemporary method for controlling pest populations while managing the spread of pest resistance to both conventionally applied and genetically engineered insecticidal toxins.