



Università degli Studi di Sassari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari



Indirizzo Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente
Mediterraneo

Ciclo XXIII

Impatto dell'introduzione di insetti predatori
esotici sulle "guilds" locali.

Dr.ssa Xenia Fois

Direttore della Scuola: Prof. Giuseppe Pulina

Referente di Indirizzo Prof. Antonio Franceschini

Docente Guida Prof. Roberto A. Pantaleoni

Triennio accademico 2008- 2010

INDICE

1 Introduzione

2. *Harmonia axyridis* (Coleoptera Coccinellidae) come specie invasiva: aspetti ecofisiologici.

2.1 Alien vs. Predator – lacewing *Chrysoperla carnea* is an intraguild predator superior to invasive ladybird *Harmonia axyridis*?

2.1.1 Introduction

2.1.2 Materials and methods

2.1.3 Results

2.1.4 Discussion

2.1.5 References

2.2 *Harmonia axyridis*: six-legged alligator or lethal fugu?

2.3 Sperm survival of *Harmonia axyridis* after overwintering

2.3.1 Introduction

2.3.2 Materials and methods

2.3.3 Results and Discussion

2.3.4 References

3. Controllo biologico del Cinipide galligeno del Castagno: caso della Barbagia di Belvì

3.1 Introduzione

3.1.1 Stato dell'arte

3.1.2 Situazione in Sardegna

3.1.3 Scopo della ricerca

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Area di studio

3.2.2 Articolazione temporale delle attività

3.2.3 Introduzione ed insediamento del parassitoide *Torymus sinensis*

3.2.3.1 Individuazione della zona nella quale effettuare il lancio

3.2.3.2 Individuazione del momento in cui effettuare il lancio

3.2.3.3 Lancio del parassitoide

3.2.3.4 Valutazione dell'insediamento e della diffusione del parassitoide

3.2.4 Monitoraggio delle infestazione del cinipide

3.2.5 Monitoraggio dei nemici naturali indigeni

3.3 Risultati

3.3.1 Introduzione ed insediamento del parassitoide *Torymus sinensis*

3.3.1.1 Individuazione della zona nella quale effettuare il lancio

3.3.1.2 Individuazione del momento in cui effettuare il lancio

3.3.1.3 Lancio del parassitoide

3.3.1.4 Valutazione dell'insediamento e della diffusione del parassitoide

3.3.2 Monitoraggio delle infestazione del cinipide

3.3.3 Monitoraggio dei nemici naturali indigeni

3.4 Discussioni

3.5 Bibliografia

4. Ibridazione interspecifica nel genere *Chrysoperla* Steinmann, 1964 (Neuroptera Chrysopidae)

4.1 Introduzione

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Allevamento del materiale sperimentale

4.2.2 Incroci F₁

4.2.3 Incroci F₂

4.2.4 Incroci B₁

4.3 Legenda

4.4 Risultati

4.4.1 Successo degli incroci F₁

4.4.1.1 *Tempi di sviluppo degli F₁*

4.4.1.2 *Mortalità degli F₁*

4.4.1.3 *Peso Bozzoli e Sex Ratio degli F₁*

4.4.2 Fecondità e fertilità degli F₂

4.4.3 Fertilità e fecondità dei B₁

4.5 Discussione

4.6 Bibliografia

5. Conclusioni

6. Ringraziamenti

1. Introduzione

L'introduzione accidentale o meno di specie invasive aliene e i loro possibili effetti ecologici è da sempre un argomento che suscita grande interesse.

Secondo alcuni, infatti, l'invasione biologica da parte di specie esotiche può essere, assieme alla distruzione degli habitat, una delle principali minacce alla biodiversità nel mondo.

Sicuramente da diversi anni si è assistito ad una maggiore introduzione di queste specie, sia attraverso l'aumento degli scambi commerciali, sia attraverso pratiche di lotta biologica in alternativa all'utilizzo di strategie ad alto impatto ambientale.

Spesso, però, queste introduzioni vengono eseguite senza alcuna valutazione delle conseguenze sfavorevoli che esse provocano, o possono provocare, all'ambiente e in particolare alle specie autoctone già presenti. Quando un nuovo organismo viene introdotto all'interno di un ecosistema può portare ad un declino delle specie native che, nei casi più gravi, si traduce nell'estinzione delle stesse attraverso la competizione diretta, l'ibridazione e la predazione.

Molto spesso il successo delle specie introdotte è dovuto ad intrinseche maggiori capacità competitive nei confronti delle specie indigene, spesso legate ad un migliore adattamento a condizioni climatiche sempre più frequentemente influenzate dal cosiddetto "cambiamento climatico globale". Lo studio comparato delle risposte di insetti esotici ed indigeni alle differenti condizioni climatiche assume in questo contesto un grandissimo interesse.

In questo lavoro, studi su tre differenti ordini di insetti hanno permesso di trattare aspetti diversi riguardanti l'impatto delle specie invasive aliene sulle comunità locali quali i fenomeni di predazione interspecifica definita dagli anglosassoni intraguild predation (IGP), capacità di dispersione e adattamento della specie invasiva, effetti no-target e il fenomeno dell'ibridazione tra specie differenti.

Parte della ricerca affrontata in questa tesi è stata svolta dalla sottoscritta presso la Facoltà delle Scienze del sud Bohemia, České Budějovice (Repubblica Ceca) durante uno stage formativo della durata di 12 mesi.

Come altri paesi Europei, anche la Repubblica Ceca ha dovuto affrontare i problemi legati alla introduzione di specie esotiche, tra cui il Coleottero Coccinellide *Harmonia axyridis*.

Tale Coccinellide viene descritto come specie altamente invasiva a causa di caratteristiche quali l'ampio spettro di prede che è in grado di attaccare e le ottime capacità di diffusione e adattamento.

Durante il periodo formativo gli studi su tale insetto hanno riguardato prevalentemente i fenomeni di predazione interspecifica, concentrandosi sull'interazione del Coccinellide con il predatore *Chrysoperla carnea* s.l. (Neuroptera: Chrysopidae), e la capacità riproduttiva in femmine svernanti.

Nel primo caso, lo scopo della ricerca è stato quello di valutare il livello e la simmetria (unidirezionale o bidirezionale) della predazione interspecifica tra i due predatori oggetti di studio.

Nel secondo caso, si è cercato invece di acquisire una maggiore comprensione circa la capacità riproduttiva delle femmine svernanti di *H. axyridis* in grado di riprodursi, al termine del periodo di

svernamento, semplicemente utilizzando spermatozoi accumulati in accoppiamenti precedenti all'entrata in diapausa e rimasti vitali per tutto il periodo invernale. Questo aspetto permetterebbe a tale insetto di potersi riprodurre e sopravvivere anche in condizioni sfavorevoli permettendoci di comprendere i meccanismi che rendono il Coleottero *H. axyridis* un competitore superiore rispetto agli altri Coccinellidi.

Successivamente al periodo di formazione svolto in Repubblica Ceca, gli studi effettuati sono stati rivolti verso un'altra specie invasiva dannosa, questa volta introdotta accidentalmente, l'Imenottero Cinipide *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu, 1951) chiamato comunemente cinipide galligeno del Castagno.

Visti gli ingenti danni arrecati da questo insetto alle colture castanicole presenti in Sardegna, in questo lavoro è stato intrapreso un progetto di lotta biologica che ha previsto l'introduzione e la successiva verifica dell'insediamento del parassitoide *Torymus sinensis*, parassitoide specie-specifico del *D. kuriphilus* e avente come unico scopo quello di riportare i livelli di infestazione del Cinipide al di sotto della soglia economica di danno.

Inoltre è stato effettuato lo studio della costellazione dei parassitoidi indigeni che il cinipide galligeno, secondo recenti studi, sembrerebbe essere in grado di reclutare al fine di poter ipotizzare l'utilizzo di queste comunità come una valida risorsa nella lotta contro questo fitofago.

L'ultimo atto della ricerca è stato dedicato allo studio dei fenomeni di ibridazione tra differenti specie di *Chrysoperla*.

Avendo la disponibilità di tre specie gemelle appartenenti

al genere *Chrysoperla*, sono state riportate prove preliminari di ibridazione tra le specie Europee *Chrysoperla pallida* Henry, Brooks, Duelli & Johnson 2002 e *Chr. lucasina* (Lacroix, 1912) e la specie Indiana *Chrysoperla sillemi* (Esben-Petersen, 1935) al fine di avere indicazioni circa le barriere pre e post-zigotiche e verificare quali siano i reali o presunti pericoli relativi all'introduzione di specie di predatori alieni all'ambiente e alle specie native.

2. *Harmonia axyridis* (Coleoptera Coccinellidae) come specie invasiva: aspetti ecofisiologici.



2.1 Alien vs. Predator – lacewing *Chrysoperla carnea* is an intraguild predator superior to invasive ladybird *Harmonia axyridis*

Nedvěd O.^{1,2}, Fois X.^{3,4}, Ungerová D.¹

¹Faculty of Sciences, University of South Bohemia, and

²Institute of Entomology, Biology Center, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic;

³Istituto per lo Studio degli Ecosistemi CNR, sede di Sassari, Italy

⁴Università degli Studi, via Enrico De Nicola, 07100 Sassari

Abstract

Larvae of the second and third instars of the lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera, Chrysopidae) was found to be asymmetric intraguild predators of the larvae of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Although *H. axyridis* was found to be a winner in most interspecific combats with other aphidophagous ladybird species, except *A. ocellata*, and is very voracious, it was killed in most cases by another member of the aphidophagous guild, the lacewing larvae. When the second instar larvae of both species were tested, the lacewing won in 50% and the ladybird in another 50% of cases. The third instar lacewing larvae won in 94% of cases over the third instar ladybird. When the third instar larvae of the lacewing were paired with the fourth instar ladybird larvae, which were three times heavier, they won in 52% of cases, the ladybird won in 24% cases, and both larvae survived 48 hours in another 24%. We report the first aphidophagous insect which is superior over the aggressive invasive and large Multicolored Asian ladybird *H. axyridis* despite its smaller size.

key words: Coccinellidae; Chrysopidae; IGP

2.1.1 Introduction

Concerns about the fate of native aphid predators attacked by an invasive ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Majerus et al., 2006) in North America and Europe led to several attempts to quantify the level of interspecific, or more specifically intraguild predation (IGP, predation among individuals of the same trophic level, Rosenheim et al., 1995) in various developmental stages. In such interactions, *H. axyridis* generally dominates (Koch, 2003). In agricultural and natural habitats in the continental USA and southern Canada, the establishment of *H. axyridis* has been associated with decline of some native ladybirds (Hesler and Kieckhefer, 2008; Michaud, 2002; Schmidt et al., 2008), but also with suppression of previous invader, *Coccinella septempunctata* (Koch and Galvan, 2008). Despite some cases of dramatic decline of other ladybirds, such as *Adalia bipunctata*, long-term data do not clearly show an adverse effect of exotic ladybirds on the native fauna (Harmon et al., 2007). Brown (2003) found no decrease in the abundance of the fly *Aphidoletes aphidimyza* and various Chrysopidae after the establishment of *H. axyridis*.

Eggs of many aphidophagous insects are particularly vulnerable to predation by larvae and adults of other species. *H. axyridis* attacked eggs of *Coleomegilla maculata* and *Olla v-nigrum* (Cottrell, 2004), *Cycloneda munda*, *Hippodamia convergens* (Cottrell, 2007) more frequently than conspecific eggs. Eggs of at least one ladybird, *Calvia quatuordecimguttata* appeared to be extremely well (chemically) protected from attack by *H. axyridis* (Ware et al., 2008). There was no difference in the developmental time or survival of *H. axyridis* when fed on aphids or eggs of the lacewing, *Chrysoperla carnea* Stephens (Phoofolo and Obrycki, 1998). The relationship is symmetrical, since *C. carnea* feeds on eggs of *H. axyridis* (Phoofolo and Obrycki, 1998).

H. axyridis has been recorded to feed on various stages of nine ladybirds in North

America: *Adalia bipunctata*, *Coccinella septempunctata*, *Coccinella transversoguttata*, *Coleomegilla maculata*, *Cycloneda sanguinea*, *Hippodamia convergens*, *Olla v-nigrum*, *Sasajiscymnus tsugae* (see Koch and Galvan, 2008 for review), the fly *Aphidoletes aphidimyza*, and the lacewing *Chrysoperla carnea* (Gardiner and Landis, 2007), and a less known predator of adelgid aphids, *Laricobius nigrinus* (Coleoptera: Derodontidae) (Flowers et al., 2005). The survivorship of *Adalia bipunctata* (exotic in Japan) from second instar to adult was significantly reduced in the presence of *H. axyridis* (native to Japan) (Kajita et al., 2006).

Ware and Majerus (2008) examined intraguild predation of first and fourth instar larvae, pre-pupae and pupae of eight European and four Japanese ladybirds by larvae of *H. axyridis*. Based on fourth instar larvae experiment, there were five European species completely losing their combat: *Adalia bipunctata*, *Adalia decempunctata*, *Coccinella septempunctata*, *Coccinella quinquepunctata*, and *Propylea quatuordecimpunctata*. Other two species, *Harmonia quadripunctata* and *Calvia quatuordecimpunctata* sometimes, and *Anatis ocellata* in most cases killed *H. axyridis*. Four Japanese species, *Coccinella septempunctata brucki*, *Cheilomenes sexmaculatus*, *Propylea japonica* and *Eocaria muiri* were susceptible to predation by *H. axyridis* (Fig.1). The results of encounters between first instar larvae were more symmetrical.

Larvae of *H. axyridis* are relatively larger and more aggressive than larvae of most native ladybirds (Cottrell and Yeargan, 1998; Felix and Soares, 2004; Michaud, 2002; Yasuda et al., 2004). When paired with a larger larva of a different species, *H. axyridis* may win (over *Cycloneda sanguinea*, Michaud, 2002) or lose (under *Coleomegilla maculata*, Cottrell and Yeargan, 1998; *Anatis ocellata*, Ware and Majerus, 2008). Snyder et al. (2004) suggest that the advantages of *H. axyridis* are a greater ability to capture intraguild prey and avoid

predation, not the size. Felix and Soares (2004) showed that increase in body weight of the intraguild predator (*H. axyridis*) did not significantly increase the rate of predation (on *Coccinella undecimpunctata*). Greater success of *H. axyridis* in a laboratory study of interactions with *C. septempunctata* was attributed to its higher attack rates and greater escape ability (Yasuda et al., 2001). Aggressiveness and escape behaviour of *H. axyridis* attacked by the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) was reported. Also the defensive chemistry of *H. axyridis* may make them unpalatable to other predatory insects (Hough-Goldstein et al., 1996).

Lacewing *Chrysoperla carnea* (and related cryptic species) is relatively common predator of aphids also involved in intraguild predation. Fremlin (2007) indicate that *C. carnea* attacks larvae and pupae of *H. axyridis*. Reciprocal predation of eggs is mentioned above. Lacewings were detected over much of the season in several locations in Florida dominated by *H. axyridis*, while no other predators or parasitoids were detected (Mizell, 2007). Pell et al. (2008) asked for research that would show the symmetry of the relationship between the two species.

2.1.2 Materials and methods

We collected adult ladybirds *Harmonia axyridis* outside, on shrubs in the town České Budějovice in the Czech Republic (49°00'N, 14°26'E) in summer, and we established laboratory stocks using the most common *succinea* morph. Couples of ladybirds were bred in 9cm Petri dishes, fed with aphids *Acyrtosiphon pisum*, and provided with water. Eggs were removed daily, and larvae were bred in the same conditions as their parents, at 20°C and 18L: 6D photoperiod. The second, third, and fourth (last) instar larvae were separated in clean Petri dishes to make pairs with lacewing larvae.

Adult lacewings *Chrysoperla carnea* were collected outside on trees near České

Budějovice (49°05'N, 14°21'E) in autumn. Although they had still their summer green colour, we considered them to be in diapause, and thus we treated them with the juvenile hormone analogue methoprene (two microlitres of 1% solution in acetone) to activate them and provoke reproduction. Adults were reared in a group, fed with honey and pollen of *Typha angustifolia*. Eggs were removed and larvae of lacewings were reared in the same conditions as ladybird larvae, and equally fed. The second and third (last) instar larvae were paired with ladybird larvae.

We arranged the contests following the method by Ware and Majerus (2008), *i.e.* in an empty Petri dish without food and water. We observed the larvae in dishes regularly up to 48 hours. Time of predation and making of cocoon were noted. We set up 10 replications of the second instar larva of ladybird against the second instar larva of lacewing, 17 replications of the third instar larva of ladybird against the third instar larva of lacewing, and 33 replications of the fourth instar larva of ladybird against the third instar larva of lacewing.

The third and fourth instar larvae of *H. axyridis* and the third instar larvae of *C. carnea* were weighted before the experiment on electronic microbalances.

Levels and symmetry of intraguild predation (IGP) were calculated following the method described by Lucas et al. (1998). Symmetry greater than 0.5 means that *C. carnea* was more successful. Yates corrected χ^2 test (Statistica 8.0 software package) showed whether the symmetry differed from 50%, and two tailed Fisher's exact test for 2x2 table compared levels and symmetry between instars. The time to death was compared non-parametrically using Mann-Whitney test.

2.1.3 Results

The weight of the third instar larvae of *H. axyridis* before the experiment ranged 12-16 mg, with average 14 mg, of the fourth instar 28–38 mg, with average 35 mg. The third instar

larvae of *C. carnea* weighted 11–14 mg, with average 13 mg.

In 5 of the 10 replications of the second instars contest, larva of *H. axyridis* killed the larva of *C. carnea*, and in the other 5, larva of *C. carnea* won (level of IGP=1, symmetry=0.5; Fig. 1). The average time-to-win was 25 hours for larvae of *H. axyridis*, and 20 hours for larvae of *C. carnea*, these values did not differ ($Z=0.74$, $p=0.46$).

In one of the 17 replications of the third instars contest, larva of *H. axyridis* killed the larva of *C. carnea* (after 38 hours), while in the other 16 cases, larva of *C. carnea* won (level of IGP=1, symmetry=0.94, $\chi^2=5.6$, $p=0.02$). The average time-to-win was 19 hours for larvae of *C. carnea*.

In 8 of the 33 replications of the fourth to third instars contest, larva of *H. axyridis* killed the larva of *C. carnea*, in 17 cases, larva of *C. carnea* won, and in the rest 8 cases, both larvae survived 48 hours of the observation (level of IGP=0.76, symmetry=0.68, $\chi^2=1.4$, $p=0.38$). The average time-to-win was 11 hours for larvae of *H. axyridis*, and 23 hours for larvae of *C. carnea*, these values differed ($Z=2.5$, $p=0.016$).

Fisher's exact test (0.04) showed that the level of IGP was lower in the third treatment (third against fourth instar) than in the second one (third against third instars). Symmetry in the second treatment differed from the first one (second against second instars, 0.015) but not from the third one (0.06).

In seven of the eight cases where both mature larvae survived, the lacewing larva spun a cocoon, and the ladybird was not able to attack it any more. In three cases of those 17, when the lacewing larva killed and sucked out the ladybird larva, it subsequently spun a cocoon and successfully pupated within the 48 hours observation period. More lacewing larvae pupated after additional feeding by aphids.

When larva of *H. axyridis* attacked the lacewing larva, it approached it from one side or

from behind and bit it on the dorsal side. The lacewing larva tried to defend itself but was overpowered. When larva of *C. carnea* attacked the ladybird larva, it pierced it by one or both mandibular-maxillary sucking complex from below, into the soft abdominal sternites. The ladybird larva then stayed almost motionless, and the lacewing larva was able to probe and suck it several times more on other body parts.

2.1.4 Discussion

Our results prove that body size is not very important predictor in assessing results of intraguild encounters. When lacewing larva meets larva of *H. axyridis* of the same size, it is superior in the encounter and it wins in almost all cases. Even three times heavier ladybird larva won in fewer cases. Till now, there was only one species of the aphidophagous guild known to effectively win over *H. axyridis*, the eyed ladybird, *Anatis ocellata*. That is the largest European ladybird, and the success could be ascribed to its body size. We now report the first aphidophagous insect which is superior over the aggressive invasive and large Multicolored Asian ladybird *H. axyridis* despite its smaller size.

Since the time to win was still shorter for ladybird larvae, we might agree with previous authors (Snyder et al., 2004; Yasuda et al 2001) emphasizing high aggressiveness of *H. axyridis*: its advantages should be a greater ability to capture intraguild prey (or high attack rates) and avoid predation (greater escape ability). We thus have to seek for lacewing larvae properties that enable them to survive these attacks.

Some lacewing larvae carry a protective shield (made of empty skins of victims) on its dorsal side, but it is not the case of *C. carnea*. Puffs of long hairs on thorax and abdomen may help, but does not seem to be dense enough. Chemical defence in lacewings is not known well, but the abdominal secretion which sticks the debris is also said to be smeared on the intrusive animal, which may occur also in species which do not carry the shield. Anyway,

lacewing larvae are mobile enough to simply escape from similar predators.

The ability of lacewing larva to kill even a larger larva of *H. axyridis* can be mainly attributed to the long mandibulo-maxillar piercing complex. Long spiny protuberances on the dorsal side of *H. axyridis* do not protect the ladybird larva against such long mouthparts, and the lacewing larva can even reach soft smooth ventral side of the body. The fact that ladybird larva stays motionless soon after the lacewing larva attack suggests an existence of paralyzing compound in the saliva of the lacewing.

Although the chemical defence of *H. axyridis* is effective against many predators including other ladybirds, lacewing *C. carnea* is apparently not repelled neither subsequently affected by these toxic compounds. Lacewing larvae successfully pupated after substantial feeding on the ladybird. However, we do not know whether they would be able to complete entire developmental cycle on the diet consisting only from *H. axyridis*.

In a microcosm experiment (Gardiner and Landis, 2006), the intraguild predator *H. axyridis* removed an average of 1.07 ± 0.28 lacewing larva within 3 h of foraging, leaving 1.67 ± 0.29 lacewing larvae. However, another intraguild prey, the fly *A. aphidimyza* was reduced much stronger. This may be because *C. carnea* are larger, more mobile, or less preferred intraguild prey than *A. aphidimyza*.

Increases in extraguild prey (aphids) and intraguild prey (*C. undecimpunctata*) densities did not alter the direction, but decreased the magnitude and symmetry of IGP (Noia et al., 2008). Thus, real intraguild predation in nature may be much milder than suggested by the results of combats between two starving larvae in a Petri dish. Niche overlap between large generalist *H. axyridis* and smaller or specialized aphidophagous species may be small not only in space but also in time; large species exploiting larger or abundant prey (Sloggett, 2008) and being later (Honěk et al., 2008).

As an additional experiment, we also paired fourth instar larvae of *H. axyridis* with same size larvae of howerflies (Diptera: Syrphidae), mainly *Episyrphus balteatus*, found in the field. *H. axyridis* killed 7 of 10 syrphids, and left 3 syrphids untouched. Two of these survived syrphids subsequently died, probably because of dehydration; in one case it pupated. Some syrphid larvae bravely defended itself after an attack by ladybird larva, they moved and twisted. However, syrphid larva never attacked and killed ladybird larva. Ladybird larva often interrupted its attack and left the syrphid larva probably because its slimy soft surface. Mean time to predation in the seven cases was 23 hours. Syrphid larvae which were eventually killed might have been weakened due to dehydration, their surface then might have been more acceptable by the ladybird.

There is a slowly growing evidence that the large aggressive invasive ladybird *H. axyridis* has powerful native competitors.

Acknowledgments: The study was supported by grant number QH82047 by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

2.1.5 References

- Brown, M.W., 2003. Intraguild responses of aphid predators on apple to the invasion of an exotic species, *Harmonia axyridis*. *BioControl* 48, 141-153.
- Cottrell, T.E., Yeargan, K.V., 1998. Intraguild predation between an introduced lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), and a native lady beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Kansas Entomological Society* 71, 159-163.
- Cottrell, T.E., 2004. Suitability of exotic and native lady beetle eggs (Coleoptera: Coccinellidae) for development of lady beetle larvae. *Biological Control* 31, 362-371.

- Cottrell, T.E., 2007. Predation by adult and larval lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) on initial contact with lady beetles eggs. *Environmental Entomology* 36, 390-401.
- Felix, S., Soares, A.O., 2004. Intraguild predation between the aphidophagous ladybird beetles *Harmonia axyridis* and *Coccinella undecimpunctata* (Coleoptera : Coccinellidae): the role of body weight. *European Journal of Entomology* 101, 237-242.
- Flowers, R.W., Salom, S.M., Kok, L.T., 2005. Competitive interactions among two specialist predators and a generalist predator of hemlock woolly adelgid , *Adelges tsugae* (Homoptera: Adelgidae), in the laboratory. *Environmental Entomology* 34, 664-675.
- Fremlin, M., 2007. Intra-guild predation of harlequin ladybird larvae by lacewing larvae. *Bulletin of Amateur Entomological Society* 66, 110-116.
- Gardiner, M.M., Landis, D.A., 2007. Impact of intraguild predation by adult *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) biological control in cage studies. *Biological Control* 40, 386-395.
- Harmon, J.P., Stephens, E., Losey, J., 2007. The decline of native ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) in the United States and Canada. *Journal of Insect Conservation* 11, 85-94.
- Hesler, L.S., Kieckhefer, R.W., 2008. Status of exotic and previously common native coccinellids (Coleoptera) in South Dakota landscapes. *Journal of the Kansas Entomological Society* 81, 29-49.
- Honek, A., Dixon, A.F.G., Martinkova, Z., 2008. Body size and the temporal sequence in the reproductive activity of two species of aphidophagous coccinellids exploiting the same resource. *European Journal of Entomology* 105, 421-425.
- Hough-Goldstein, J., Cox, J., Armstrong, A., 1996. *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae) predation on ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Florida Entomologist* 79, 64-68.

- Kajita, Y., Takano, F., Yasuda, H., Evans, E.W., 2006. Interactions between introduced and native predatory ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae): factors influencing the success of species introductions. *Ecological Entomology* 31, 58-67.
- Koch, R.L., 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control and non-target impacts. *J Insect Sci* 3: 1-16
- Koch, R.L., Galvan, T.L., 2008. Bad side of a good beetle: the North American experience with *Harmonia axyridis*. *BioControl* 53, 23-36.
- Lucas, E., Coderre, D., Brodeur, J., 1998. Intraguild predation among aphid predators: characterization and influence of extraguild prey density. *Ecology* 79, 1084-1092.
- Majerus, M.E.N., Strawson, V., Roy, H.E. 2006. The potential impacts of the arrival of the halloway ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), in Britain. *Ecological Entomology* 31, 207–215.
- Michaud, J.P., 2002. Invasion of the Florida Citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguinea*. *Environmental Entomology* 31, 827-835.
- Mizell, R.F., 2007. Impact of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on native arthropod predators in pecan and crape myrtle. *Florida Entomologist* 90, 524-536.
- Noia, M., Borges, I., Soares, A.O., 2008. Intraguild predation between the aphidophagous ladybird beetles *Harmonia axyridis* and *Coccinella undecimpunctata* (Coleoptera : Coccinellidae): The role of intra and extraguild prey densities. *Biological Control* 46, 140-146.
- Pell, J.K., Baverstock, J., Roy, H.E., Ware, R.L., Majerus, M.E.N. (2008) Intraguild predation involving *Harmonia axyridis*: a review of current knowledge and future perspectives.

- BioControl 53, 147-168.
- Phoofolo, M.W., Obrycki, J.J., 1998. Potential for intraguild predation and competition among predatory Coccinellidae and Chrysopidae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89, 47-55.
- Rosenheim, J.A., Kaya, H.K., Ehler, L.E., Marois, J.J., Jaffee, B.A., 1995. Intraguild predation among biological control agents: theory and evidence. *Biological Control* 5, 303-335.
- Schmidt, N.P., O'Neal, M.E., Dixon, P.M., 2008. Aphidophagous predators in Iowa soybean: A community comparison across multiple years and sampling methods. *Annals of the Entomological Society of America* 101, 341-350.
- Sloggett, J.J., 2008. Weighty matters: Body size, diet and specialization in aphidophagous ladybird beetles (Coleoptera : Coccinellidae). *European Journal of Entomology* 105 , 381-389.
- Snyder, W.E., Clevenger, G.M., Eigenbrode, S.D., 2004. Intraguild predation and successful invasion by introduced ladybird beetles. *Oecologia* 140, 559-565.
- StatSoft, Inc. (2008) STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.
www.statsoft.com
- Ware, R.L., Majerus, M.E.N., 2008. Intraguild predation of immature stages of British and Japanese coccinellids by the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *BioControl* 53, 169-188.
- Ware, R.L., Ramon-Portugal, F., Magro, A., Ducamp, C., Hemptinne, J.L., Majerus, M.E.N., 2008. Chemical protection of *Calvia quatuordecimguttata* eggs against intraguild predation by the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *BioControl* 53, 189-200.
- Yasuda, H., Evans, E.W., Kajita, Y., Urakawa, K., Takizawa, T., 2004. Asymmetrical larval

interactions between introduced and indigenous ladybirds in North America. *Oecologia* 141, 722-731.

Yasuda, H., Kikuchi, T., Kindlmann, P., Sato, S., 2001. Relationship between attacks and escape rates, cannibalism, and intraguild predation in larvae of two predatory ladybirds. *Journal of Insect Behaviour* 14, 373-384.

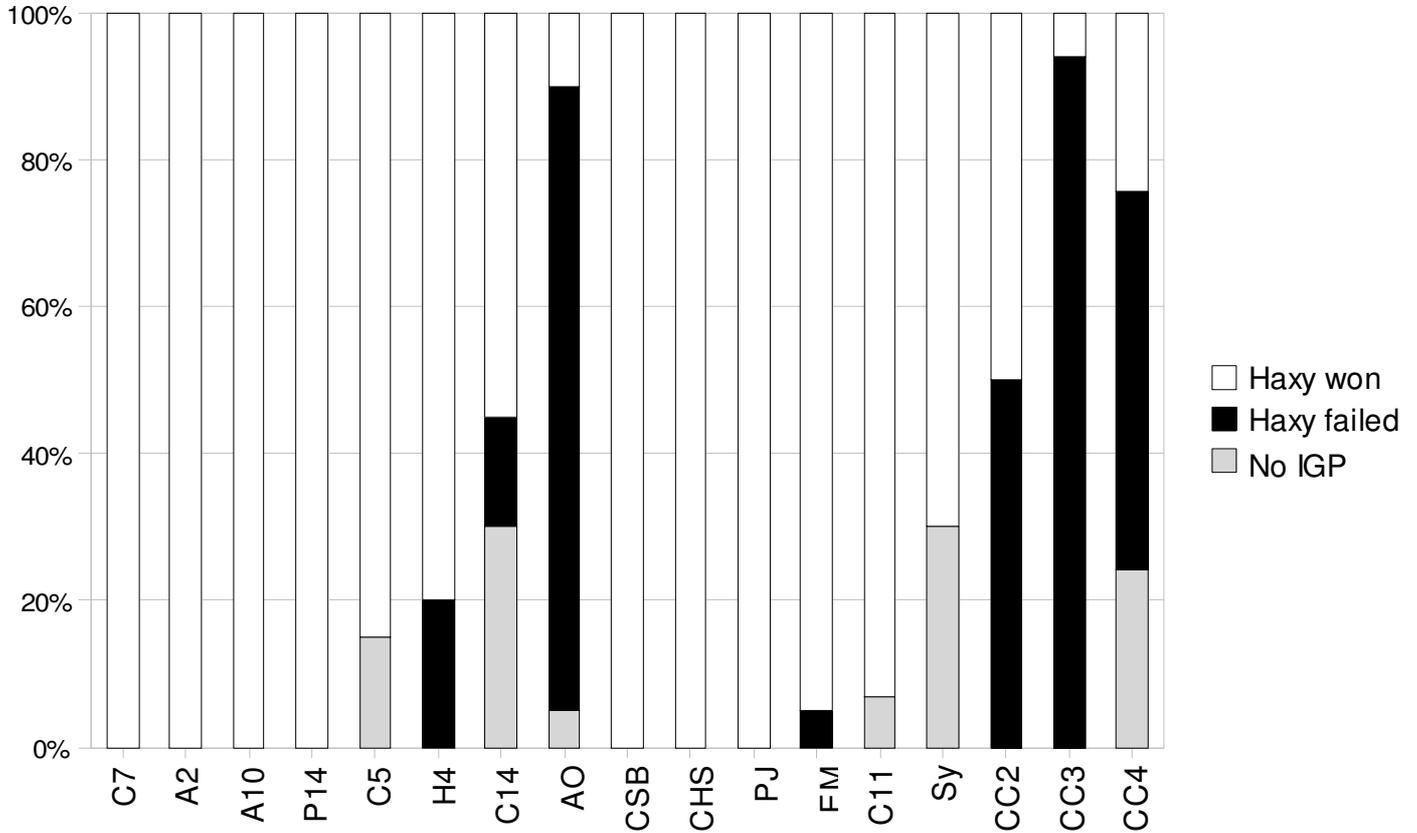


Fig. 1: Symmetry of intraguild predation between *Harmonia axyridis* and other aphidophagous insects. First 12 results originate from the study by Ware and Majerus (2008): larvae of the fourth instars of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae); C7=*Coccinella septempunctata*, A2=*Adalia bipunctata*, A10=*Adalia decempunctata*, P14=*Propylea quatuordecimpunctata*, C5=*Coccinella quinquepunctata*, H4=*Harmonia quadripunctata*, C14=*Calvia quatuordecimpunctata*, AO=*Anatis ocellata*, CSB= *Coccinella septempunctata brucki*, CHS= *Cheilomenes sexmaculatus*, PJ= *Propylea japonica*, EM= *Eocaria mui*ri, one case comes from Noia et al. (2008): fourth instar of ladybird C11=*Coccinella*

undecimpunctata, others were achieved in this study: Sy=field collected larvae of howerflies (Diptera: Syrphidae) with fourth instar of *H. axyridis*, CC2=larvae of the second instar of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) and *H. axyridis*, CC3=larvae of the third instar of *C. carnea* and *H. axyridis*, CC4= larvae of the third instar of *C. carnea* and the fourth instar of *H. axyridis*.

***Harmonia axyridis*: six-legged alligator or lethal fugu?**

Oldřich Nedvěd^{1,2}, Plamen Kalushkov³, Xenia Fois⁴, Dita Ungerová¹ & Adéla Rozsypalová¹

¹Faculty of Sciences, University of South Bohemia, and ²Institute of Entomology, Biology Center, Academy of Sciences of the Czech Republic; both Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; ³Institute of Zoology, Bulgarian Academy of Sciences, 1 Tsar Osvoboditel blvd. Sofia 1000, Bulgaria; ⁴Istituto per lo Studio degli Ecosistemi CNR, sede di Sassari, Italy

Corresponding author: nedved@prf.jcu.cz

The phenomenon of intraguild predation (IGP) among aphidophagous ladybirds attracted large attention and has been a subject of a considerable number of studies (e.g. Pell *et al.*, 2008; Ware & Majerus, 2008; Sloggett & Davis, 2010), especially after recent invasion of the Multicoloured Asian ladybird *Harmonia axyridis* in Europe (Brown *et al.*, 2008). IGP is presented as an important factor contributing to the success of *H. axyridis*. Less attention has been paid to interactions of *H. axyridis* with other intraguild (=aphidophagous) organisms (e.g. entomopathogenic fungi, Baverstock *et al.*, 2009; or hoverflies, Alhmedi *et al.*, 2010). Studies on toxicity and unpalatability of ladybirds to potential non-IG predators, usually ants and birds (Pasteels, 1973, 2007, Burgio *et al.*, 2008, Dolenská *et al.*, 2009) may contribute to the explanation of the invasive success of *H. axyridis*.

Aggressive invasive and large ladybird *H. axyridis* was previously proved as a powerful intraguild predator winning combats with most other ladybirds, except large *Anatis ocellata* (Ware & Majerus, 2008). We have investigated the occurrence of IGP between larvae of *H. axyridis* and several other aphidophagous insects and non-aphidophagous ladybirds in Petri dish arenas. One larva of each of two tested species was placed into 9cm Petri dishes at 20°C and 18L:6D photoperiod, with wet filter paper on the bottom. Survival of the larvae was recorded after 24 hours.

Larvae of the third instar of the lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera, Chrysopidae) won in 94% of cases over the third instar ladybird of the same size. When the third instar larvae of the lacewing were paired with the fourth instar ladybird larvae, which were three times heavier, lacewings still won in 52% of cases, the ladybird won in 24% cases, and both larvae survived 48 hours in another 24%.

Larvae of the hoverflies (Diptera: Syrphidae) were partially protected (27% for *Episyrphus balteatus*) or strongly protected (76% for *Epistrophe eligans*) against intraguild predation but they never killed *H. axyridis* larva of similar size. Slime prevented the syrphid larvae from being killed for long time, suggesting that protection from IGP by *H. axyridis* is even higher under natural conditions. In similar experiments, Ingels & De Clercq (2010) found that only third instars of *E. balteatus* acted as intraguild predators on first instars of *H. axyridis*, and only in the absence of extraguild prey. Second and third instars of the syrphid were only killed by older larvae and adults of *H. axyridis*, while pupae were not attacked (Ingels & De Clercq, 2010). In laboratory microcosms containing aphids on plants, *H. axyridis* larvae had an IGP advantage over the hoverfly (Alhmedi *et al.* 2010).

We also paired third instar larvae of *H. axyridis* with fourth instar spiny larvae of the phytophagous ladybird *Cynegetis impunctata* (being of similar size). *H. axyridis* won in 67% of cases, while both survived in 33% of cases. Second instar larvae of *H. axyridis* killed

fourth instar larvae of the ladybird *Scymnus rubromaculatus* (again of similar size) in all nine cases studied, despite their defensive waxy structures.

We tested toxicity of whole body extract from several species of ladybirds on young individuals of the water flea, *Daphnia magna* (Cladocera), because they cannot avoid the toxins. Ladybirds of known mass were homogenized in water, centrifuged, and clear supernatant was diluted to set of concentrations. Toxicity of *Coccinella septempunctata* for *D. magna* was low: 4mg of fresh body mass per ml of water were needed to kill 50% of water fleas after 24 hours at 20°C, while *H. axyridis* was very toxic: lethal dose was 0.06mg/ml. Diverse colour forms and developmental stages of *H. axyridis* showed similar toxicity. Toxicity of *Adalia bipunctata* was intermediate, 0.6 mg/ml was needed to kill 50% of water fleas.

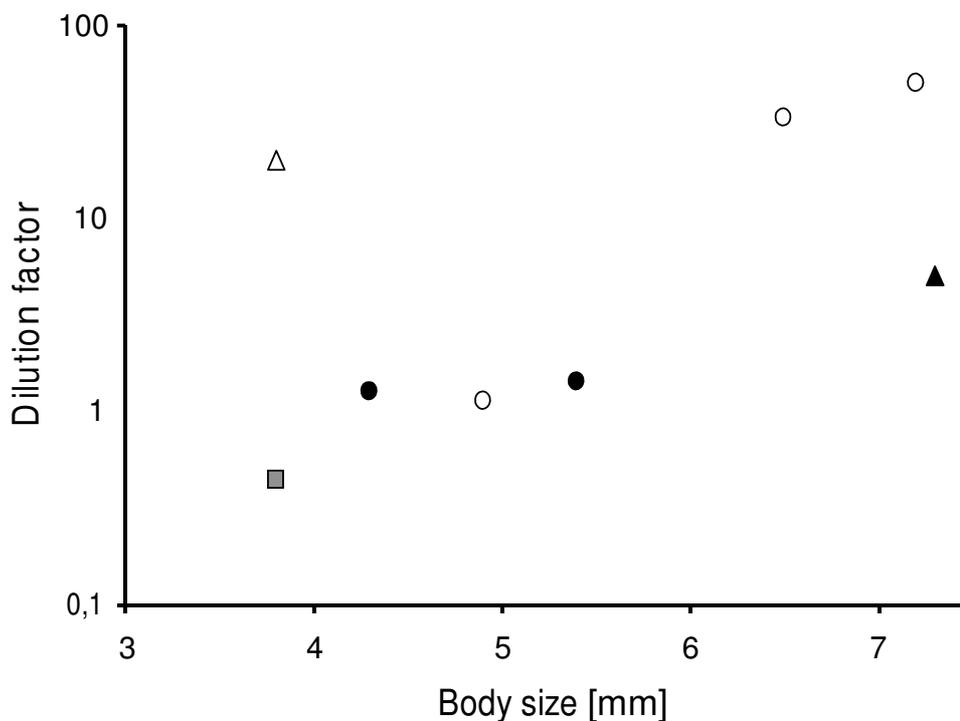


Fig. 1: Relationship between dilution factor (how many times diluted body liquid of ladybird is still repellent to 50% of ant individuals) and ladybird body size. Circles=aphidophagous species, triangles: mycophagous species, square: phytophagous species. Open symbols: bright yellow or red background with black spots, solid symbols: dark background with lighter spots, grey symbol: brown, without spots.

We studied unpalatability of extracts from eight ladybird species mixed with sucrose solution for the ant *Lasius niger*. Whole body extracts were diluted to a set of concentrations provided that sucrose concentration was constantly 4%. We provided one droplet of extract and one droplet of pure sucrose solution each time to a laboratory stock of ants, and counted the number of ants drinking from either droplet within 3 minutes. According to the reaction of ants to diverse concentrations, we calculated the dilution factor (how many times diluted body liquid of ladybird is still repellent to 50% of ant individuals). The ladybirds were ranked according to the dilution factor: *Coccinella septempunctata* (50x) > *Harmonia axyridis* (33x)

>*Psyllobora vigintiduopunctata* (20x) >*Halyzia sedecimguttata* (5x) >*Calvia quatuordecimguttata* (1.4x) >*Exochomus quadripustulatus* (1.3x) >*Adalia bipunctata* (1.1x) >*Cynegetis impunctata* (0.4). Reaction of ants was slightly more rejective to the extracts of larger ladybirds (Fig. 1) and of more aposematically coloured species (bright background with black spots). Mycophagous species were rejected similarly as the aphidophagous ladybirds.

We here report on the first aphidophagous insect (*C. carnea*) which is superior intraguild predator over *H. axyridis* despite its smaller size. However, in the majority of IGP trials we conducted, *H. axyridis* was found to be superior to competitors, supporting the general picture. *H. axyridis* larvae could overcome spines, wax, and to some extent slime. In addition, our results on high toxicity and repellence of *H. axyridis* to other arthropods including its potential predators indicate an ecological advantage of *H. axyridis* compared to other ladybirds.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic number QH82047.

References

- Alhmedi, A., Haubruge, E. & Francis, F. 2010: Intraguild interactions and aphid predators: biological efficiency of *Harmonia axyridis* and *Episyrphus balteatus*. J. Appl. Entomol. 134: 34–44.
- Baverstock, J., Clark, S. J., Alderson, P. G. & Pell, J. K. 2009: Intraguild interactions between the entomopathogenic fungus *Pandora neoaphidis* and an aphid predator and parasitoid at the population scale. J. Invertebr. Pathol. 102: 167–172.
- Brown, P. M. J., Adriaens, T., Bathon, H., Cuppen, J., Goldarazena, A., Hagg, T., Kenis, M., Klausnitzer, B. E. M., Kovář, I., Loomans, A. J. M., Majerus, M. E. N., Nedvěd, O., Pedersen, J., Rabitsch, W., Roy, H. E., Ternois, V., Zakharov, I. A. & Roy, D. B. 2008: *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. BioControl 53: 5–21.
- Burgio, G., Lanzoni, A., Accinelli, G. & Maini, S. 2008: Estimation of mortality by entomophages on exotic *Harmonia axyridis* versus native *Adalia bipunctata* in semi-field conditions in northern Italy. BioControl 53: 277–287.
- Dolenská, M., Nedvěd, O., Veselý, P., Tesařová, M. & Fuchs, R. 2009: What constitutes optical warning signals of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) towards bird predators: colour, pattern or general look? Biol. J. Linn. Soc. 98: 234–242.
- Ingels, B. & De Clercq, P. 2010: Intraguild predation between *Harmonia axyridis* and the hoverfly *Episyrphus balteatus*. IOBC/WPRS Bull. 58: 53–54.
- Pasteels, J. M., Deroe, C., Tursch, B., Braekman, J. C., Daloze, D. & Hootele, C. 1973: Distribution and activities of defensive alkaloids of Coccinellidae. J. Insect Physiol. 19: 1771–1784.
- Pasteels, J. M. 2007: Chemical defence, offence and alliance in ants-aphids-ladybirds relationships. Popul. Ecol. 49: 5–14.
- Pell, J. K., Baverstock, J., Roy, H. E., Ware, R. L. & Majerus, M. E. N. 2008: Intraguild predation involving *Harmonia axyridis*: a review of current knowledge and future perspectives. BioControl 53: 147–168.

- Sloggett, J. J. & Davis, A. J. 2010: Eating chemically defended prey: alkaloid metabolism in an invasive ladybird predator of other ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Exp. Biol.* 213: 237–241.
- Ware, R. L. & Majerus, M. E. N. 2008: Intraguild predation of immature stages of British and Japanese coccinellids by the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *BioControl* 53: 169–188.

2.3 Sperm survival of *Harmonia axyridis* after overwintering

Abstract

Many ladybird species mate during autumn before overwintering and do not reproduce until the next spring. Increased fecundity and fertility in ladybird females after frequently repeated mating was reported. We compared fecundity (number of eggs laid) and fertility (number of larvae hatched), hatching rate and longevity of *Harmonia axyridis* single and paired females. In late January, we separated 30 single females collected in October, put together 20 couples, and reared them at 20°C.

From 20 dissected females, 7 were not fertilized. From 30 single females, 12 were not fertilized. Average fecundity of the females paired with males was 977 eggs, fertility 493 larvae, and hatchability 51%. Average fecundity of all single females was 932 eggs, fertility 458 larvae, and hatchability 35%. However, average values for those single females that were fertilized before overwintering were 1326 eggs, 763 larvae, and 58%. This is a surprising result that shows very high survival ability of sperm over winter and even negative effect of repeated mating in spring, through shorter longevity (76 days) in comparison with single females (118 days).

2.3.1 Introduction

A great part of the social behaviour of sexual animals is organized around reproductive activities and many researchers focus their attention on costs and benefits of mating activity.

In insect females of many species, a single or few matings are enough for eggs fertilization and maximization of their reproductive success (Bateman, 1948) while male fitness generally increases steadily with mating rate. Contrary to these predictions, however, females of the majority of insects mate many times.

Many ladybird species such as *Ceratomegilla undecimnotata* (Schneider, 1792) mate during autumn before overwintering and do not reproduce until the next spring (Hodek and Iperiti, 1983). In more ladybird species, mainly polyvoltine ones with facultative diapause, such as *Coccinella septempunctata* (Linnaeus, 1758), at least a part of adults mate before overwintering. The proportion of females of *C.septempunctata* with full spermathecae was 58% in beetles still feeding in autumn, and about one third in non-feeding beetles in overwintering site (Cerynger *et al.*, 1992).

Increased fecundity and percentage of hatchability in the ladybird *Menochilus sexmaculatus* (Fabricius, 1781) and *Propylea dissecta* (Mulsant, 1850) females after frequently repeated mating was reported (Bind, 2007; Omkar and Pervez, 2005). In both, average of fecundity was 861 eggs laid in *M. sexmaculatus* and 710 eggs laid in *P. dissecta* while percentage of hatchability was 64 % and 93.01% respectively.

On the other hand, in *M. sexmaculatus* and *P. dissecta*, female longevity decreased with increasing number of matings, probably due

to increased oviposition (Omkar & Srivastava, 2002; Omkar & Mishra, 2005; Omkar *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 2009)

In the ladybird *Nephus regularis* (Sicard, 1929), the unmated adults lived longer, ranging from 66 to 141 days, than the mated ones, ranging from 28 to 57 days (Rawat and Modi, 1969).

The cost of mating not only concern the longevity of the insect but can also increase predation rates (Wing, 1988; Arnqvist, 1989; Rowe, 1994), risk of physical injury (Parker, 1979; Helversen & Helversen, 1991) and parasite/pathogen infection (Hurst *et al.*, 1995).

In those insects whose males provide a nuptial gift to females, the fitness advantage of multiple mating is dependent on the female diet (Fox, 1993a, 1993b). Females that are unsuccessful in finding alternative resources may increase their mating rate (i.e. females may forage for nuptial gifts), and females that have adequate alternative sources of nutrients may reduce their mating rate to avoid the costs of mating (Boggs, 1990).

Not only increased reproduction but also behavioural aspects of reproduction such as courtship and gamete production lead to higher mortality rates in both sexes. (Partridge, 1980, 1987; Partridge and Farquhar, 1981; Partridge and Harvey, 1985; Sgro` and Partridge, 1999).

Aim of this study was to compare fecundity, fertility, egg hatchability and longevity of females of *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) that were allowed to mate regularly after overwintering and those that had to rely on survival of sperm acquired during autumn mating.

2.3.2 Materials and Methods

During migration to overwintering places, seventy adults of *Harmonia axyridis* were collected in October and stored at +5°C until the start of the experiment. Only the colour morph *succinea* was used in the experiments. Twenty females were briefly stored and dissected to see whether they had sperm in their spermathecae at the time of collection. From the group of remaining 50 females, 30 were maintained isolated in order to avoid any possibility of mating. The other 20 females were put in pairs with a male each. All insects were reared in Petri dishes at 20°C, 18L:6D photoperiod, and fed with the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776). Eggs were removed daily, counted and let to hatch at the same conditions. Hatched larvae were counted and then discarded.

The total number of eggs laid by each female (lifetime fecundity) and of larvae hatched from eggs (fertility) was detected; hatching rate (percentage of eggs that hatched until the first instar larvae) was calculated. The longevity of female (period of time between the start of the experiment at 20°C to the death) was calculated. Dead males, when occurred, were replaced.

2.3.3 Results and Discussion

From the group of 20 females dissected, 7 did not have sperm in their spermatheca. Twelve females from the group of isolated females laid in average 379 eggs from which any larva hatched.

The average fecundity of the females paired with males was 977 eggs that fertility 493 larvae, and the hatchability 51%. However, the average values for those single females that mated before overwintering were 1326 eggs, 763 larvae, and 58%.

Fecundity, fertility and hatching rate were analysed by one way analysis of variance with the mating status as predictor variable: 0 – isolated infertile females, 1 – isolated fertile females, 2 – females that mated more times during the experiment.

The relationship of fecundity (number of eggs laid during female lifespan) with mating status was strongly significant ($F(2, 44)=31.4, p<0.05$). The fecundity of isolated infertile females (379 ± 90 eggs, mean \pm S.E) was lower than the fecundity of isolated fertile female (1301 ± 74 eggs, mean \pm S.E.). Multiple mated females laid 977 ± 76 (mean \pm S.E.) eggs on average. Post hoc comparison using unequal N HSD test showed that all treatments were different from each other (Fig. 1).

The remaining 18 females from the isolated groups laid, on average, 932 eggs from which 458 larvae hatched.

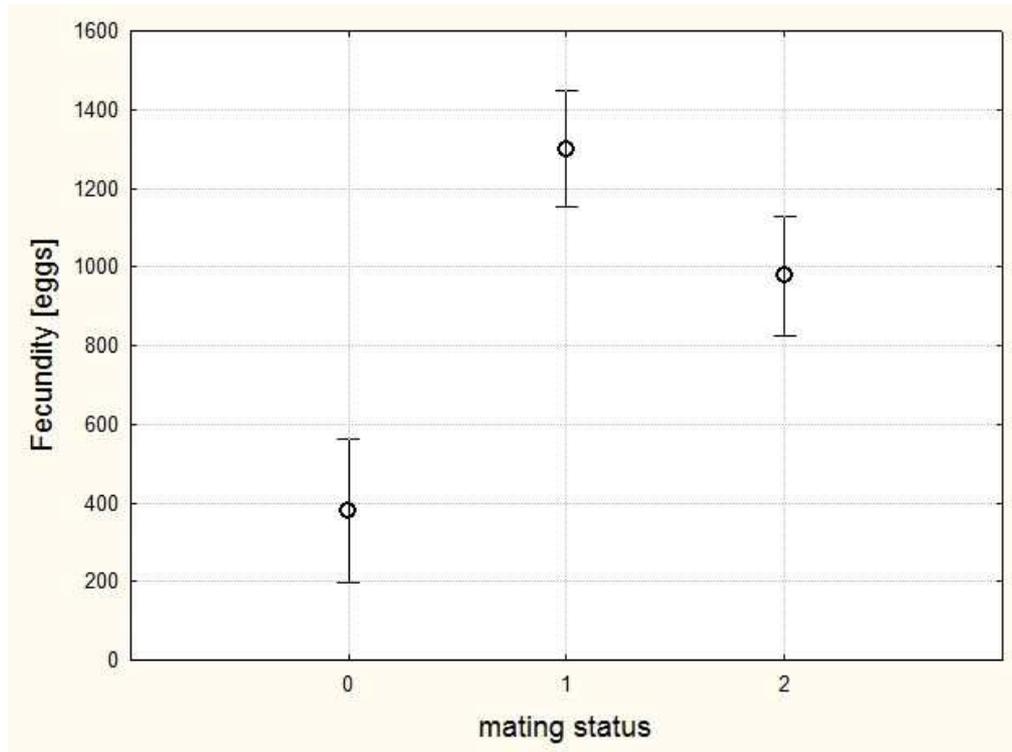


Fig.1: Average fecundity of females of ladybird *Harmonia axyridis* with different mating status: 0 – isolated (infertile), 1 – isolated (fertile), 2 – females mated multiple times during the experiment. Vertical bars represent 0.95 confidence intervals.

The relationship of fertility (number of larvae hatched per female) with mating status was strongly significant ($F(2, 44)=38.6$, $p<0.05$). However, because we did not expect any hatching from eggs laid by isolated infertile females, we analysed separately only the two other treatments ($F(1, 33)=8.8$, $p=0.006$). The fertility of isolated fertile females was 763 ± 64 (mean \pm S.E.) larvae, while multiple mated females produce a lower number of larvae (493 ± 65 larvae, mean \pm S.E.).

Hatching rate was, of course, zero in isolated infertile females and it did not differ comparing the other two treatments ($F(1, 33)=1.6$,

$p=0.22$): $0.58\pm 0.04\%$ (mean \pm S.E.) in isolated fertile females, $0.51\pm 0.04\%$ (mean \pm S.E.) in multiple mated females.

Individual fecundities and fertilities were strongly correlated ($R^2=0.75$, $p<10^{-6}$), but there was no correlation between the hatching rate and total fecundity ($p=0.50$).

The highest fecundity and fertility were detected in the group of females reared isolated.

In conclusion, the highest fecundity and fertility were detected in the group of females reared without males and we tested that:

- 1) a very high rate of spermatozoa was able to survival under low temperature;
- 2) a negative effect of repeated mating on fecundity and fertility seems occur. In addition the longevity of the females reared in pairs with males (76 days) was longer than that registered in the isolated females (118 days).

2.3.4 References

ARNQVIST G., 1989 – Multiple mating in a water strider: mutual benefits or intersexual conflict? *Animal Behaviour* 38: 749-756.

BATEMAN, A.J., 1948 – Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2: 349–368.

BIND R.B., 2007 – Reproductive behaviour of a generalist aphidophagous ladybird beetle *Cheilomenes sexmaculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *International Journal of Tropical Insect Science* 27(2): 78–84.

BOGGS C.L., 1990 – A general-model of the role of male-donated nutrients in female insects reproduction. *American Naturalist*, 136: 598-617.

CERYNGIER P., KINDLMANN P., HAVELKA J., DOSTALKOVA I., BRUNNHOFER V. and HODEK I., 1992 – Effect of food, parasitization, photoperiod and temperature on gonads and sexual-activity of males of *Coccinella-septempunctata* (Coleoptera, Coccinellidae) in autumn. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 89 (2): 97-106.

CERYNGIER P., HAVELKA J. and HODEK I., 2004 – Mating and activity of gonads in pre-dormant and dormant ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). *Invertebrate Reproduction & Development* 45 (2): 127–135.

FOX C.W., 1993a – The influence of maternal age and mating frequency on egg size and offspring performance in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Oecologia* 96: 139-146.

FOX C.W., 1993b – Multiple mating, lifetime fecundity and female mortality of the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Functional Ecology* 7: 203-208.

HELVERSEN D.V. and HELVERSEN O.V., 1991 – Pre-mating sperm removal in the bush cricket *Metaplastes ornatus* Ramme 1931 (Orthoptera, Tettigonidea, Phaneropteridae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 28: 391–396.

HODEK I., IPERTI G., 1983 – Sensitivity to Photoperiod in Relation to Diapause in *Semiadalia-undecimnotata* females. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 34 (1): 9-12.

HODEK I., CERYNGIER P., 2000 – Sexual activity in Coccinellidae (Coleoptera): a review. *European Journal of Entomology* 97 (4): 449–456.

HURST G.D.D., SHARPE R.G., BROOMFIELD A.H., WALKER L.E., MAJERUS T.M.O., ZAKHAROV I.A. and MAJERUS M.E.N., 1995 – Sexually transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata* *Ecological Entomology* 20: 230–236.

OMKAR & SRIVASTAVA S., 2002 – The reproductive behaviour of an aphidophagous ladybeetle, *Coccinella septempunctata* Linnaeus. European Journal of Entomology 99: 465–470.

OMKAR, MISHRA G., 2005 – Mating in aphidophagous ladybirds: costs and benefits. J. Appl. Entomol. 129(8): 432–436.

OMKAR, PERVEZ A., 2005 – Mating behavior of an aphidophagous ladybird beetle, *Propylea dissecta* (Mulsant). Insect Science 12: 37–44.

OMKAR, MISHRA G. and SINGH S.K., 2006 – Optimal number of matings of two aphidophagous ladybird beetle. Ecol. Entomol. 31: 1-4.

PERRY J.C., SHARPE D.M.T. and ROWE L., 2009 – Condition-dependent female remating resistance generates sexual selection on male size in a ladybird beetle. Animal Behaviour 77 (3): 743-748.

PARKER G.A., 1979 – Sexual selection and sexual conflict. In: Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects (Ed. by M. S. Blum & N. A. Blum), pp. 123–166. New York: Academic Press.

PARTRIDGE L., 1980 – Mate choice increases a component of offspring fitness in fruit flies. Nature 283: 290-291.

PARTRIDGE L., FARQUHAR M., 1981 – Sexual activity reduces lifespan of male fruitflies. Nature 294: 580-582.

PARTRIDGE L., HARVEY P.H., 1985 – Evolutionary biology: costs of reproduction. Nature 316: 20-21.

PARTRIDGE L., 1987 – Is accelerated senescence a cost of reproduction? Funct. Ecol. 1: 317-320.

PERRY J.C., SHARPE D.M. T. and ROWE L., 2009 – Condition-dependent female remating resistance generates sexual selection on male size in a ladybird beetle. Animal Behaviour 77 (3): 743-748.

RAWAT R.R. AND MODI B.N., 1969 – Studies on *Nephus regularis* (Coleoptera: Coccinellidae) as a predator of striped mealybug in Madhya Pradesh. Ann. Entomol. Soc. AMim. 62: 953-956.

ROWE L., ARNQVIST G., SIH A. and KRUPA J.J., 1994 – Sexual conflict and the evolutionary ecology of mating patterns: water striders as a model system. *Trends in Ecology and Evolution* **9**: 289-293.

SGRO` C., PARTRIDGE L., 1999 – A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* 286: 2521-2524.

WING S. R., 1988 – Cost of mating for female insects: risk of predation in *Photinus collustrans* (Coleoptera, Lampyridae). *American Naturalist* 131: 139-142.

3. Controllo biologico del cinipide galligeno del castagno: caso della Barbagia di Belvì



Riassunto

Il Cinipide galligeno del castagno *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) è considerato fra gli insetti più dannosi al genere *Castanea* in quanto in grado di causare una drastica riduzione della produzione di frutti ed un forte deperimento delle piante attaccate. Originario della Cina, il Cinipide si è diffuso inizialmente in Giappone, Corea, Stati Uniti e successivamente in Europa arrivando nel 2002 in Italia e, probabilmente nel 2005, in Sardegna.

Il controllo biologico del Cinipide attraverso l'introduzione del parassitoide esotico *Torymus sinensis* (Hymenoptera: Chalcidoidea) sembrerebbe essere l'unica soluzione, già sperimentata con successo in Giappone e successivamente in Piemonte, per ricostituire nel minor tempo possibile uno stabile e duraturo equilibrio biologico.

In Sardegna, nel territorio della Barbagia di Belvì, l'introduzione del parassitoide è avvenuta con un primo lancio nel 2009 seguito da altri 5 lanci complessivi nel 2010 e nel 2011.

Contemporaneamente si è proceduto ad un primo monitoraggio dell'infestazione del Cinipide e della presenza di parassitoidi locali adattatisi al nuovo fitofago. Da tale ricerca emerge che, dopo due anni dalla sua introduzione, *T. sinensis* sembra essersi insediato nei siti di introduzione. La configurazione stessa del territorio e la distribuzione del castagno hanno spinto il Cinipide a diffondersi verso nord-ovest. La capacità del fitofago di reclutare una ampia gamma di nemici naturali indigeni, già messa in rilievo da altri Autori, è stata evidenziata anche nel territorio sardo con il reperimento di 14 specie di parassitoidi indigeni.

Il loro ruolo nel controllo del fitofago, così come le interazioni con il parassitoide esotico e ancora le ripercussioni del cinipide del castagno sulla comunità degli altri cinipidi, per la condivisione di nemici comuni, meritano un'attenta ed accurata valutazione.

3.1 Introduzione

3.1.1 Stato dell'arte

Il *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera Cynipidae), comunemente chiamato Cinipide galligeno del castagno, è considerato una delle maggiori avversità del castagno a livello mondiale. Esso attacca sia il castagno europeo che gli ibridi eurogiapponesi. Lo sviluppo dei germogli viene enormemente limitato e la fruttificazione ridotta. La produzione di castagne può registrare perdite del 50-70% (Payne *et al.*, 1983; OEPP/EPPO, 2005).

Originario del nord della Cina (Oho & Umeya, 1975; Murakami, 1980; Li *et al.*, 2004) è stato introdotto accidentalmente, durante lo scorso secolo, prima in Giappone e più tardi in Corea, Nepal, Georgia (USA) (Yasumatsu, 1951; Shiraga, 1951; Cho & Lee, 1963; Abe *et al.*, 2007). Nel 2002 la sua presenza è stata rilevata in Europa; prima in Italia (Brussino *et al.*, 2002) ed in seguito in Slovenia (Seljak, 2006), Francia (EPPO, 2007), Svizzera (Servizio Sanitario Cantonale, 2009), Olanda (EPPO, 2010a), Ungheria (EPPO, 2010b) e Croazia (Matošević *et al.*, 2010). In Olanda ed in Ungheria le autorità locali sostengono di averlo eradicato.

Nel nostro Paese la diffusione dell'avversità, avvenuta sia per dispersione naturale dell'insetto che tramite il commercio di giovani piante infestate, riguarda oramai le più importanti aree castanicole. A partire dal Piemonte (2002) la presenza dell'insetto è stata rilevata in Lazio e Campania nel 2005; in Lombardia e in Liguria nel 2006; in Veneto, Trentino nel 2007; in Friuli Venezia Giulia, Toscana ed

Emilia Romagna nel 2008; in Abruzzo, Umbria, Marche e Calabria nel 2009.

D. kuriphilus è una specie univoltina che si riproduce per partenogenesi telitoca (fig. 3.1). È un insetto di piccole dimensioni, circa 2 mm di lunghezza, di colore nero con zampe giallo-brune. Gli adulti sfarfallano tra fine maggio e fine luglio e depongono immediatamente le uova nelle gemme della pianta ospite. Ogni femmina può deporre tra le 100 e le 150 uova. Una gemma può contenere fino a 20-30 uova. La vita della femmina è molto breve, dura circa 10 giorni alcuni dei quali spesi per scavare il tunnel per uscire dalla galla. Le uova si schiudono in 30-40 giorni. La crescita larvale procede molto lentamente fino all'arrivo dell'inverno.

Durante questo periodo le gemme non presentano esternamente sintomi particolari che facciano presupporre la presenza del fitofago al loro interno.

Nella primavera successiva, in concomitanza alla ripresa vegetativa del castagno, la larva riprende a nutrirsi inducendo così la formazione di vistose galle (diametro variabile tra 0,5 e 2 cm) di colore verde o rossastro su germogli, nervature fogliari ed infiorescenze. Da metà maggio a metà luglio la larva matura si impupa.

Le possibilità di lotta diretta contro questo insetto non sono molte e i trattamenti insetticidi sono poco o nulla efficaci e assolutamente improponibili su alberi di grandi dimensioni e negli ambienti boschivi. L'unica soluzione possibile, già sperimentata con successo in altri Paesi, è quella di affrontare il problema fitopatologico attraverso un intervento di lotta biologica al fine di ricostituire, nel

minore tempo possibile, uno stabile e duraturo equilibrio biologico.

In Giappone, dove il Cinipide è stato introdotto nel 1941, buoni risultati sono stati ottenuti mediante l'introduzione del parassitoide *Torymus sinensis* Kamijo (Hymenoptera: Chalcidoidea) individuato nello stesso areale di origine del Cinipide galligeno, la Cina (fig. 3.1).

T. sinensis è un ectoparassitoide monofago. Gli adulti sfarfallano ad inizio della primavera (dai primi di aprile ai primi di maggio) dalle galle dell'anno precedente. Subito dopo l'accoppiamento la femmina depone le uova nelle galle neoformate. Una femmina depone in media 70 uova. La larva del parassitoide si nutre della larva matura del cinipide impupandosi solo nel tardo inverno.

Anche in Piemonte, considerata l'impossibilità di eradicare il fitofago, è stato avviato nel 2003 un progetto di lotta biologica che, seguendo l'esempio giapponese, prevedeva l'introduzione e la diffusione, mediante il metodo propagativo, di *T. sinensis*. Questo si è stabilmente insediato sul territorio (Moriya et al., 2003; Aebi et al., 2006, 2007).

Nella figura 3.2 sono schematicamente rappresentati i cicli biologici dei due Imenotteri.



Figura 3.1
 In alto: *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, 1951.
 A destra: *Torymus sinensis* Kamijo

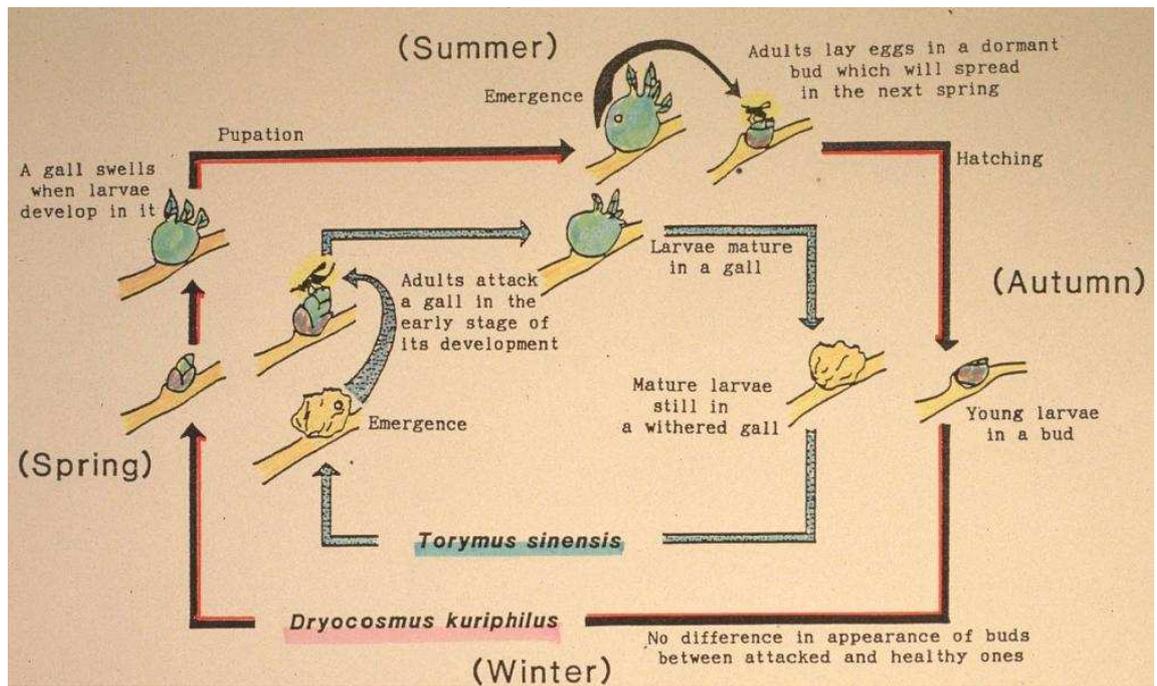


Figura 3.2 Ciclo biologico di *Dryocosmus kuriphilus* e del suo parassitoide *Torymus sinensis*.

Dopo la prima introduzione del parassitoide in Italia via via altre 10 regioni italiane hanno seguito l'esempio piemontese. Ora *T. sinensis* risulta stabilmente insediato nel nostro Paese.

Se da un lato la dispersione di *T. sinensis* è piuttosto lenta, sono infatti necessari circa 5-7 anni perché a seguito dei lanci la popolazione possa raggiungere densità tali da rendere evidenti i risultati della sua azione, dall'altro recenti studi sottolineano la rapida capacità da parte del *D. kuriphilus* di reclutare un'ampia gamma di parassitoidi locali nell'ambiente in cui è stato introdotto.

Aebi *et al* (2006) descrivono la comunità dei parassitoidi autoctoni associati a *D. kuriphilus*, sia nel luogo di origine che nei Paesi di nuova introduzione, ipotizzando un loro possibile ruolo come agenti di controllo biologico. In studi effettuati in Korea sono state registrate finora 17 specie (Pak, 1963; Ko, 1971; Yasumatsu and Kamijo, 1979; Kim, 1993; Murakami *et al*, 1993) mentre in Italia indagini preliminari riportano 16 specie di parassitoidi in grado di attaccare il fitofago (Aebi *et al*, 2007).

3.1.2 Situazione in Sardegna

La presenza di *D. kuriphilus* è stata rilevata nella nostra Isola nel 2007 (Pantaleoni *et al.*, 2007) nel territorio della Barbagia di Belvì e, in particolare, nell'area di Aritzo (Nu). Il sito di prima introduzione è stato individuato in località Geratzia dalla quale è sicuramente partita l'infestazione. Focolai sono stati successivamente rinvenuti anche nei comuni di Belvì, Desulo e Tonara.

Il problema è attualmente avvertito, anche da un punto di vista produttivo, pure in Ogliastra e recentemente in altri comuni della provincia di Nuoro. Non vi sono segnalazioni invece per le altre piccole aree castanicole (o con presenza di castagni) sparse per l'Isola.

L'introduzione del fitofago sarebbe avvenuta tra il 2003 ed il 2005 da materiale vivaistico proveniente dal Piemonte. Gli enti tecnici regionali e gli stessi castanicoltori hanno provveduto fin dall'inizio dell'infestazione ad una prima opera di distruzione delle branche attaccate. Ma visto che le probabilità di successo di un intervento di eradicazione erano apparse da subito praticamente nulle, anche in Sardegna l'unica soluzione possibile, era quella di seguire l'esempio di altri Paesi, affrontando il nuovo problema fitopatologico con l'introduzione del nemico naturale esotico del Cinipide.

3.1.3 Scopo della ricerca

L'obiettivo generale degli interventi che verranno descritti di seguito è quello di riuscire a controllare le popolazioni del Cinipide portandole al di sotto, o in prossimità, di una soglia economica di danno al fine di ricostituire, nel minore tempo possibile, uno stabile e duraturo equilibrio biologico.

Gli obiettivi specifici possono invece essere così individuati:

- a) introduzione ed insediamento dell'Imenottero Torimide *Torymus sinensis* proveniente da popolazioni insediate in Piemonte e/o Giappone;
- b) monitoraggio delle infestazioni del Cinipide galligeno del castagno

c) studio della costellazione di parassitoidi autoctoni in grado di controllare il Cinipide.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Area di studio

In Sardegna il castagno è presente, con nuclei più o meno consistenti, nella Barbagia di Ollolai e in quella di Seulo, in Ogliastra, nel Montiferru, nel Barigadu, nel Goceano e in Gallura; ma la zona di maggiore diffusione è la Barbagia di Belvì (versante sud-occidentale del Gennargentu).

Secondo l'ultimo Inventario Nazionale Foreste e Carbonio (INFC, 2008) il castagno interessa, a livello regionale, una superficie di 2.239 ettari (<http://www3.corpoforestale.it/>). Secondo l'agenzia regionale LAORE al territorio della Barbagia di Belvì appartiene circa il 90% del patrimonio castanicolo sardo, sia in purezza che in bosco misto.

In Sardegna il castagno ha avuto sino alla prima metà del Novecento un ruolo strategico per alcuni territori barbaricini. Dopo di che, a seguito dei profondi cambiamenti socio-economici post-bellici, il settore è entrato in crisi.

Solo negli ultimi decenni questa coltura ha suscitato un rinnovato interesse nella popolazione locale. Le prospettive di sviluppo territoriale eco-sostenibile, in funzione turistica, di produzioni tipiche, biologiche e certificate, hanno permesso il rifiorire di numerose iniziative di recupero e promozionali

L'arrivo del Cinipide galligeno ha coinciso proprio con questa fase di rilancio della castanicoltura barbaricina ed ha immediatamente

suscitato allarme e sconcerto negli Enti tecnici regionali, nelle amministrazioni locali, nei produttori interessati ai progetti di recupero o già in produzione.

3.2.2 Articolazione temporale delle attività

I lanci del parassitoide sono stati effettuati per tre anni di seguito: in località Geratzia (Aritzo) nel 2009 (fig. 3.3 punto 1), in località Pale'e Crabile (Belvì) nel 2010 (fig. 3.3 punto 2), nelle località Pratzia Baladuru (Belvì) (fig.3.3, punto 3), Is Ederas (Desulo) (fig. 3.3, punto 4), Caniganule (Desulo) (fig. 3.3, punto 5) e Terrabazzo (Tonara) (fig. 3.3, punto 6). Di seguito verrà descritto esclusivamente il lancio del parassitoide nel 2009 in loc. Geratzia.

La valutazione dell'insediamento del parassitoide ha riguardato la località Geratzia nel 2010 e nel 2011 e la località Pale'e Crabile nel 2011. La valutazione della diffusione del parassitoide ha riguardato la loc. Geratzia dopo due anni dal lancio (2011).

Il monitoraggio dell'infestazione del cinipide è stata eseguita nei comuni di Belvì, Desulo, Tonara ed Aritzo nel 2009.

Lo studio dei parassitoidi autoctoni è stato fatto nel territorio dei quattro comuni nel 2010.

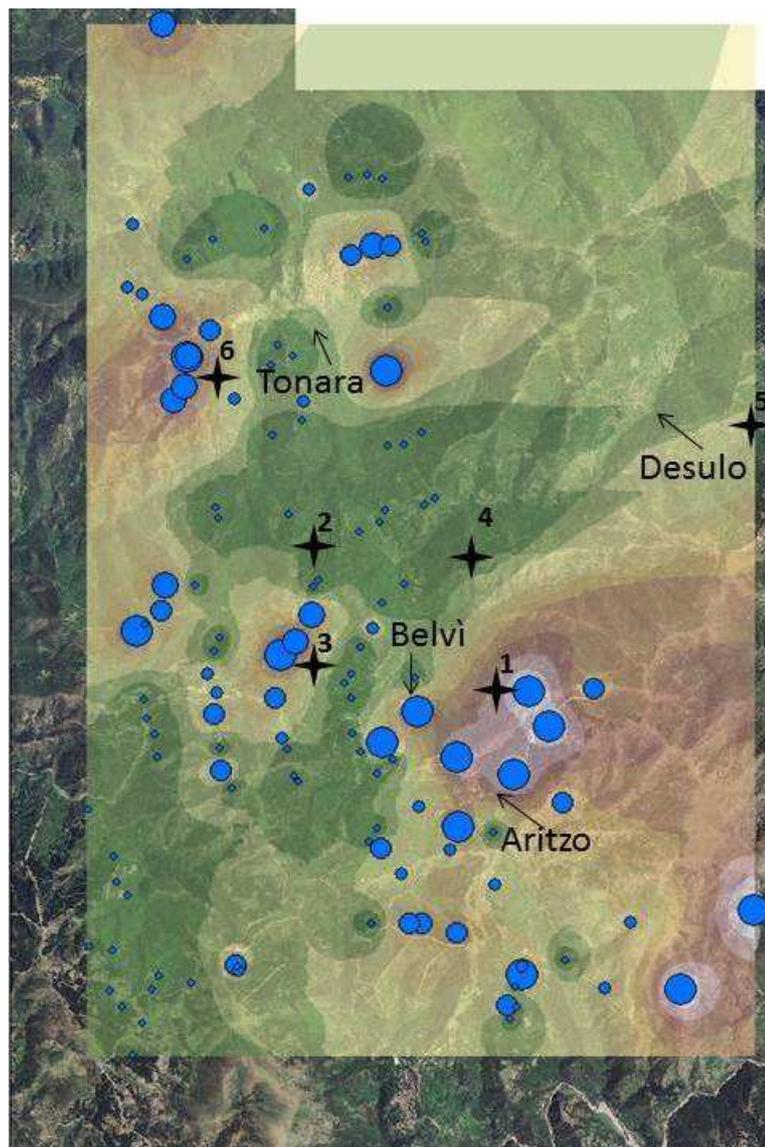


Figura 3.3. Siti di rilascio di *Torymus sinensis*: 1. località Geratzia (Aritzo), 2. località Pale'e Crabile (Tonara), 3. Località Pratz Baladuru (Belvi), 4. località Is Ederas (Desulo), 5. località Caniganule (Desulo), 6. località Terrabazzo (Tonara). Le sfere azzurre rappresentano i punti di campionamento nel 2009, il diametro è proporzionale alla percentuale di infestazione di *Dryocosmus kuriphilus*. I colori rappresentano la distribuzione del fitofago elaborata sui dati 2009 mediante interpolazione con il metodo IDW.

3.2.3 Introduzione ed insediamento del parassitoide *Torymus sinensis*

3.2.3.1 *Individuazione della zona nella quale effettuare il lancio del parassitoide*

Durante i numerosi sopralluoghi effettuati nelle aree castanicole della Barbagia di Belvì sono state esaminate caratteristiche quali: a) la presenza dell'infestazione tramite l'osservazione sulle piante in riposo vegetativo delle galle dell'anno precedente e b) in tal caso una valutazione estemporanea della stessa (fig. 3.4), c) le dimensioni delle piante.



Figura 3.4
A sinistra pianta di castagno infestata.
Sopra particolare di galla invernale

3.2.3.2 *Individuazione del momento in cui effettuare il lancio*

A ridosso del periodo in cui avviene il germogliamento del castagno, in due siti, per tre settimane successive e a cadenza settimanale, sono state effettuati campionamenti di porzioni di rami allo scopo di monitorare l'andamento della ripresa vegetativa delle

piante.

In laboratorio, le gemme e i germogli raccolti sono stati classificati in differenti categorie fenologiche in base a schemi esistenti in letteratura (fig. 3.5).



Contemporaneamente si procedeva al sezionamento di un certo numero di gemme che, mediante l'ausilio del microscopio, venivano esaminate allo scopo di individuare al loro interno le galle negli stadi iniziali di sviluppo.

3.2.3.3 Lancio del parassitoide

Il lancio è stato effettuato in un castagneto sito in loc. Geratzia con 110 coppie di *T.sinensis* (fig. 3.6). Gli insetti sono giunti a destinazione conservati entro una borsa termica e suddivisi in provettoni di plastica trasparente con tappo a vite. L'utilizzo di strisce

di carta imbibite con poche gocce di miele consentiva di alimentare gli insetti durante la fase precedente al lancio.



Per la liberazione degli esemplari è stato sufficiente aprire le provette in prossimità di alcune galle, avendo cura di posizionarne l'apertura contro luce per facilitare l'uscita autonoma dell'insetto. La liberazione ha riguardato un numero limitato di piante del sito scelto.

3.2.3.4 Valutazione dell'insediamento e della diffusione del parassitoide

La valutazione dell'insediamento è stata effettuata mediante la raccolta di un adeguato numero di galle (circa 10.000) nella stagione invernale (non oltre marzo) a ridosso del periodo di sfarfallamento in campo del parassitoide. La raccolta ha riguardato esclusivamente i

castagneti nei quali era stato effettuato il lancio. Una prima valutazione dell'eventuale diffusione del parassitoide dal sito di lancio è stata effettuata individuando i siti di raccolta delle galle secondo uno schema di cerchi concentrici a raggio crescente di 200 metri fino ad una distanza massima di un Km dal centro (coincidente con il campo di Geratzia). Sono stati così individuati 5 punti di campionamento su due direttrici, per un totale di 10 punti in 2 km lineari (fig. 3.7). Per comodità i punti da campionare ricadevano sull'intersezione dei cerchi con le stradine presenti. I punti venivano raggiunti a piedi e, quando era presente il castagno, sono state prelevate, ove possibile, circa 1000 galle.

Le galle raccolte sono state ripulite, separate dai rametti e sistemate in sacchetti traspiranti lasciati all'aperto in prossimità del luogo di raccolta (ma riparati dalle intemperie) in modo da garantirgli le condizioni ambientali locali.

In prossimità del periodo in cui avviene la ripresa vegetativa del castagno, le galle sono state trasferite in laboratorio e stoccate in celle climatizzate alla temperatura di 5° C. Contemporaneamente è stata monitorata la fase fenologica delle piante in modo da sincronizzare il più possibile il periodo di sfarfallamento in laboratorio degli esemplari di *T. sinensis* con la presenza in natura delle galle di dimensioni adeguate per il parassitoide stesso. Una volta verificatasi questa condizione le galle sono state trasferite in una stanza a temperatura ambiente per consentire lo sfarfallamento dei parassitoidi eventualmente presenti.

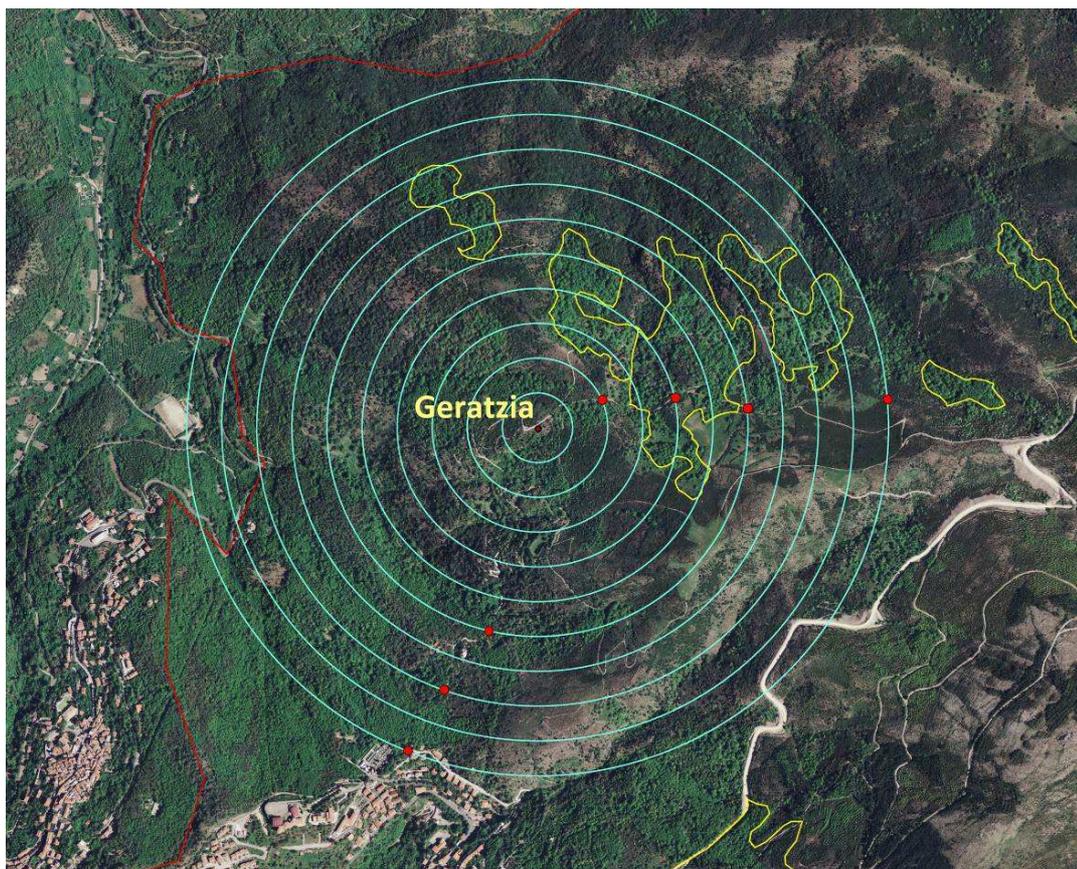


Figura 3.7. Rappresentazione grafica dei punti di campionamento. I cerchi tracciati hanno un raggio crescente di 100 m man mano che ci si allontana dal cerchio (Geratzia). I punti rossi indicano i siti campionati.

3.2.4 Monitoraggio dell'infestazione del cinipide

Prendendo come centro di riferimento la località di Geratzia sono stati individuati attraverso uno schema di cerchi concentrici a raggio crescente di un chilometro i punti da campionare (fig. 3.8). Questi coincidevano, sulla circonferenza di ciascun cerchio, con la presenza di strade d'accesso. Il campionamento, effettuato durante il periodo primaverile-estivo, ha riguardato castagneti siti nei comuni di Aritzo, Belvì, Tonara e Desulo.

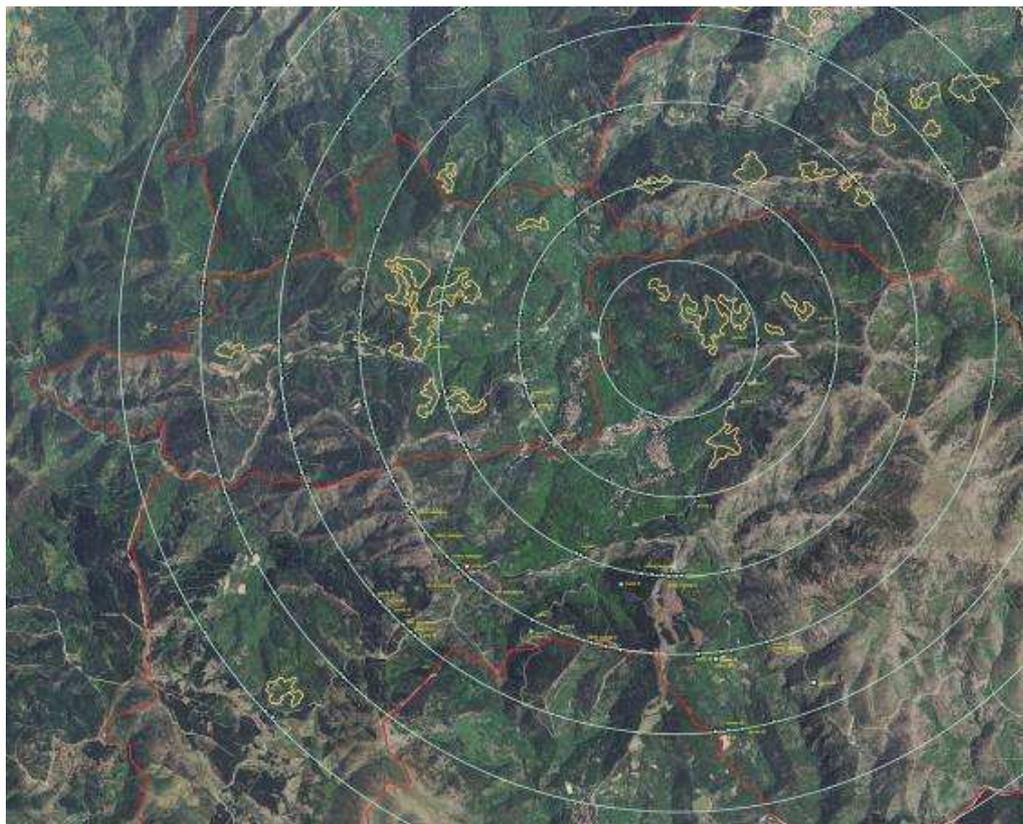


Figura 3.8. Schema di campionamento a cerchi concentrici. Le linee rosse indicano i confini comunali, le linee gialle i castagneti da frutto.

In ciascun punto venivano rilevate la presenza o meno dell'infestazione e l'abbondanza delle galle presenti. Quest'ultima si valutava asportando da quattro piante, a mezzo di un potatore ad asta, 4 branche di un metro lineare ciascuna prelevate secondo le 4 direzioni cardinali.

In laboratorio le porzioni di chioma venivano ripulite da tutte le galle presenti. Quest'ultime venivano sistemate in contenitori di plastica chiusi ad una estremità con tulle e stoccate all'interno di celle climatizzate (T 22° C, fotoperiodo 18L/6B). Gli esemplari di cinipide che sfarfallavano giornalmente venivano conservati in alcool.

3.2.4 Monitoraggio dei nemici naturali indigen

La raccolta delle galle è stata effettuata in 16 siti distribuiti nei territori dei comuni di Tonara, Desulo, Aritzo e Belvì (fig. 3.9)

Per ogni sito è stata presa la coordinata geografica e rilevato il grado di infestazione. Per ogni campionamento sono state asportate, a mezzo di un potatore ad asta, tutte le branche di castagno infestate che si riuscivano a tagliare nell'arco di 5 minuti. Il campionamento è stato ripetuto, ogni due settimane, per 8 volte tra la primavera e l'estate.

In laboratorio le galle venivano separate dai rametti avendo cura di eliminare la maggior parte possibile di materiale vegetale, in particolare foglie, per scongiurare il più possibile la formazione di muffe (fig. 3.10) Le galle una volta contate sono state sistemate in contenitori di plastica chiusi ad una estremità con tulle e stoccate all'interno di celle climatizzate con temperature di 22° C e fotoperiodo 18L/6B. Il controllo giornaliero del materiale consentiva di isolare, registrare e conservare in alcool i parassitoidi sfarfallati oltre che di eliminare gli eventuali predatori che trovavano rifugio tra le galle stesse (in particolare ragni).

La determinazione degli esemplari è avvenuta in parte presso i laboratori dell'ISE CNR di Sassari e in parte presso il Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali DI.VA.PRA di Torino dove venivano eseguite le analisi molecolari degli esemplari.

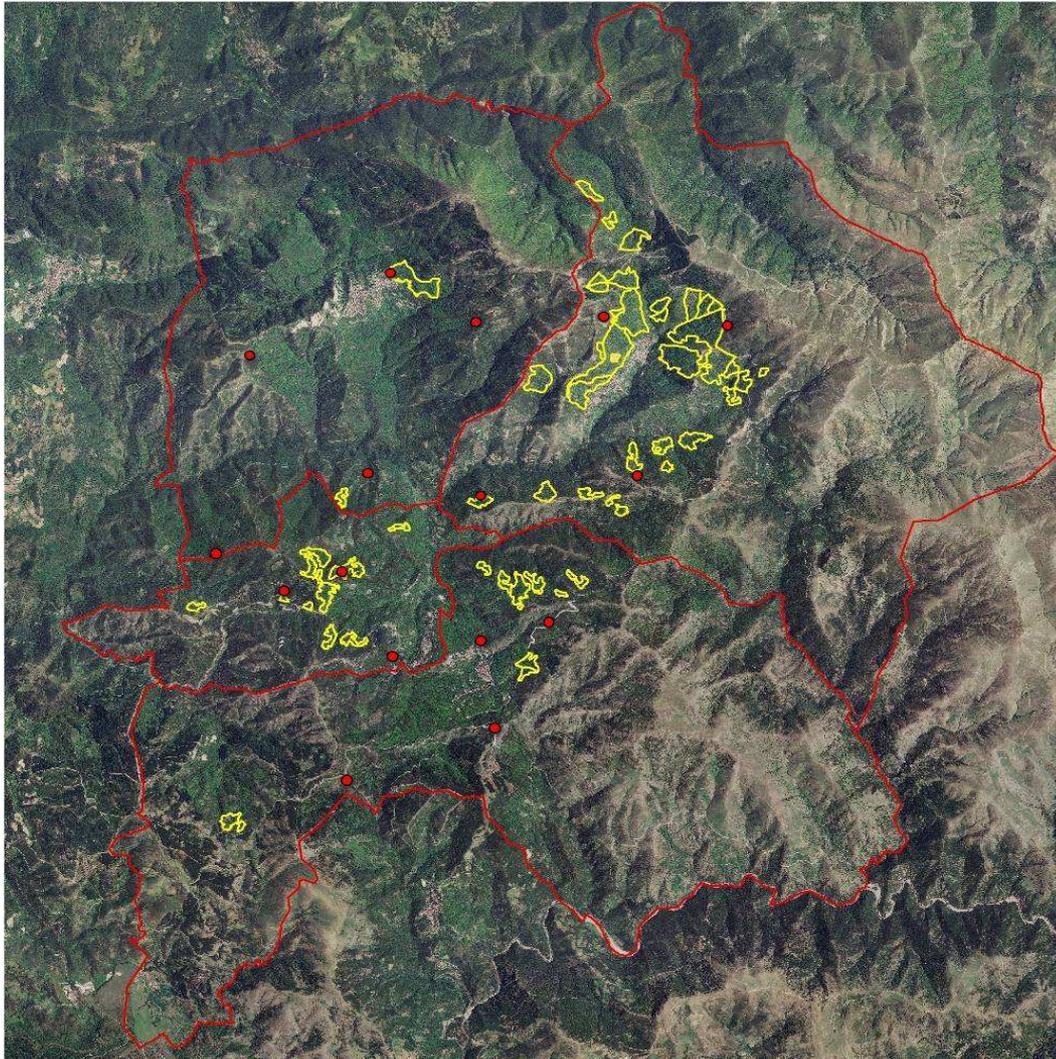


Figura 3.9: siti di campionamento delle galle



Figura 3.10
Galle separate dai rami e
pronte per lo stoccaggio

3.3 Risultati

3.3.1 Introduzione ed insediamento del parassitoide *Torymus sinensis*

3.3.1.1 *Individuazione della zona nella quale effettuare il primo lancio del parassitoide.*

Dai sopralluoghi effettuati è stato possibile individuare vari siti con un alto tasso di infestazione. La scelta della zona in cui effettuare il lancio è ricaduta sul territorio di Aritzo, in località Geratzia (fig.3.3). In particolare sono state individuate due stazioni con alberi di dimensioni contenute.

3.3.1.2 *Individuazione del momento in cui effettuare il lancio*

I risultati ottenuti dall'esame dell'andamento della ripresa vegetativa del castagno nelle due stazioni selezionate sono esposti in tabella 3.1.

Tabella 3.1. Percentuale di infestazione del castagno rilevata nelle stazioni 1 e 2 in località Geratzia: Aritzo (Nu). Fasi fenologiche: 1. gemme chiuse; 2. rottura delle perule; 3. comparsa delle foglioline; 4. foglie evidenti; 5 caduta perule; 6. apertura foglie; 7. allungamento germoglio. (anno 2009)

Data	Stazione	Fasi Fenologiche							Gemme		
		1	2	3	4	5	6	7	n° Tot	n° inf ¹	% inf
08/04	1		14,2%	77,0%	8,7%				344	10/120	8,33
	2	13,6%	20,8%	61,1%	4,4%				337	30/108	27,78
15/04	1	0,9%	3,5%	50,9%	37,7%	7,0%			342	54/98	55,10
	2	1,3%	15,1%	54,2%	27,2%	2,2%			312	58/86	67,44

La scelta della stazione è ricaduta sul sito 2 più riparato dai venti e meglio inserito nel contesto castanicolo. La stessa stazione, le cui piante erano più avanti nello sviluppo fenologico, ha sempre mostrato una maggiore percentuale di infestazione delle gemme e dei germogli analizzati.

3.3.1.3 Lancio del parassitoide

Il lancio è stato effettuato il giorno 24 aprile del 2009, immediatamente dopo un campionamento estemporaneo del 22 aprile durante il quale sono state evidenziate le condizioni ideali per intervenire: galle di dimensioni adatte per il parassitoide.

Le condizioni metereologiche della giornata del lancio sono inoltre risultate particolarmente favorevoli.

3.3.1.4 Valutazione dell'insediamento e della diffusione del parassitoide

In località Geratzia sono sfarfallati 19 esemplari di *T. sinensis* (8 maschi e 11 femmine) nel 2010 e 43 esemplari (17 maschi e 26 femmine) nel 2011 (tab. 3.2). In località Pale' e Crabile sono sfarfallati 47 esemplari del parassitoide (17 maschi e 26 femmine).

In quattro dei dieci punti, due per direttrice, individuati per valutare la diffusione del parassitoide, non era presente il castagno (fig. 3.7). È stato così possibile raccogliere solo 6.000 galle. Da queste non è sfarfallato alcun esemplare di *T. sinensis*.

Tabella 3.2: Esempolari di *Torymus sinensis* sfarfallati nelle località Geratzia e Pale' e Crabile dalle galle raccolte per valutarne l'insediamento

<u>Geratzia</u>		<i>T. sinensis</i> sfarfallati			
	Coppie introdotte	Galle raccolte	maschi	femmine	Totale
2009	115	–	–	–	–
2010	–	10000	8	11	19
2011	–	10000	17	26	43

<u>Pale 'e crabile</u>		<i>T. sinensis</i> sfarfallati			
	Coppie introdotte	Galle raccolte	maschi	femmine	Totale
2010	150	–	–	–	–
2011	–	10000	20	27	47

3.3.2 Monitoraggio dell'infestazione del cinipide

Dai 167 siti di campionamento sono state raccolte in totale 2340 galle primaverili. Da queste sono sfarfallati 806 esemplari di *D. kuriphilus* nel periodo compreso tra fine giugno e fine luglio (fig 3.11).

I punti di maggiore infestazione sono stati rilevati nel territorio del comune di Aritzo, in prossimità della località di introduzione del cinipide, in parte nel comune di Belvì e sul confine tra quest'ultimo e il comune di Tonara (fig. 3.12).

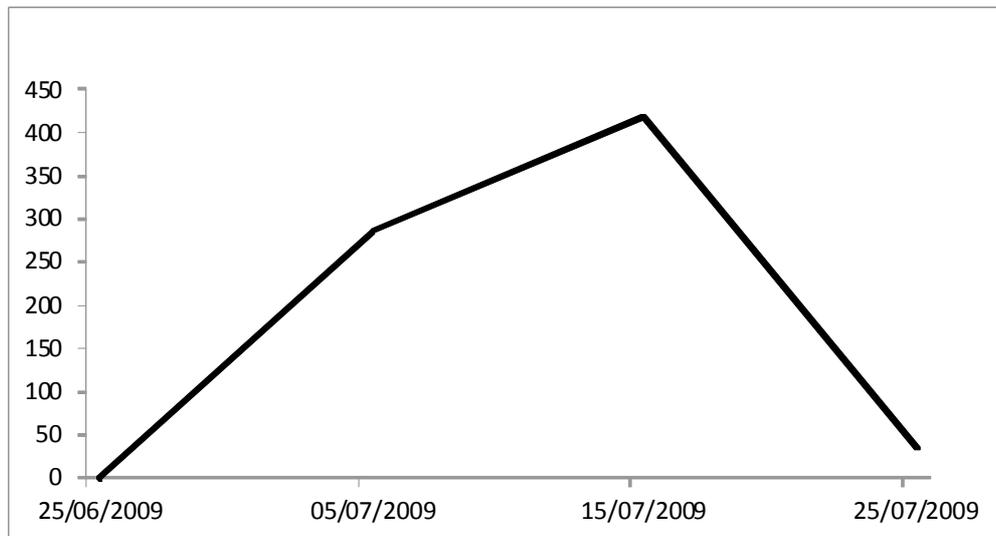


Figura 3: Andamento stagionale del *D. kuriphilus* registrato nel 2009

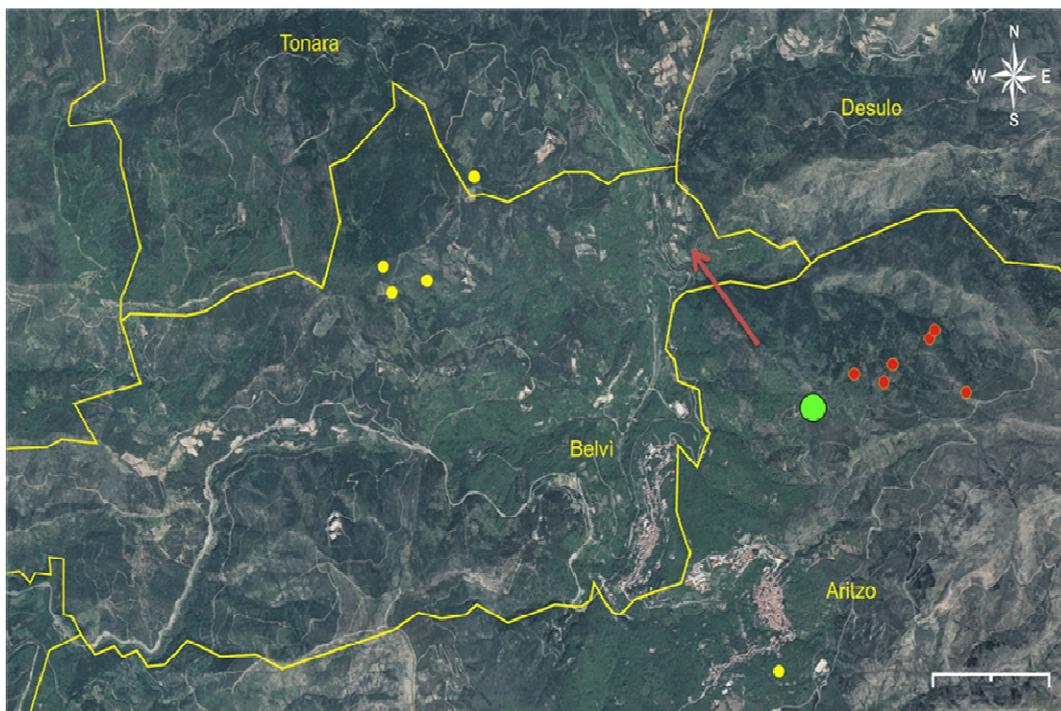


Figura 3.12: Direzione della diffusione del *Dryocosmus kuriphilus* e punti di maggiore infestazione registrati nel 2009. Le linee gialle indicano i confini comunali, i punti le zone in cui è stata rilevata l'infestazione. Il punto verde indica la zona dalla quale sicuramente è partita l'infestazione.

3.3.3 Monitoraggio dei nemici naturali indigeni

Il numero totale di galle primaverili raccolte nei 16 punti di campionamento è pari a 33.492. Da queste sono sfarfallate 14 specie di Imenotteri parassitoidi la più abbondante fra le quali è risultata *Mesopolobus tibialis* seguita da *Ormyrus pomaceus* e *Torymus flavipes* (tab. 3.3).

La popolazione del *M. tibialis* mostra rispetto al *D. kuriphilus* (fig. 3.13) e a tutte le altre specie registrate (fig. 3.14) un andamento stagionale precoce.

Tabella 3.3: Elenco delle specie di parassitoidi sfarfallati dalle galle primaverili raccolte nel 2010 in Sardegna

Specie	Famiglia	N° totale
<i>Mesopolobus tibialis</i>	Pterolamlidae	1034
<i>Cecidostiba geganius</i>	Pterolamlidae	1
<i>Cecidostiba saportai</i>	Pterolamlidae	14
<i>Eupelmus urozonus</i>	Eupelmidae	14
<i>Eupelmus annulatus</i>	Eupelmidae	40
<i>Eupelmus sp.</i>	Eupelmidae	2
<i>Ormyrus pomaceus</i>	Ormyridae	85
<i>Torymus auratus</i>	Torymidae	3
<i>Torymus sp.</i>	Torymidae	16
<i>Megastigmus dorsalis</i>	Torymidae	10
<i>Eurytoma brunniventris</i>	Eurytomidae	12
<i>Torymus flavipes</i>	Torymidae	85
<i>Sycophila variegata</i>	Eurytomidae	3
<i>Sycophila biguttata</i>	Eurytomidae	15

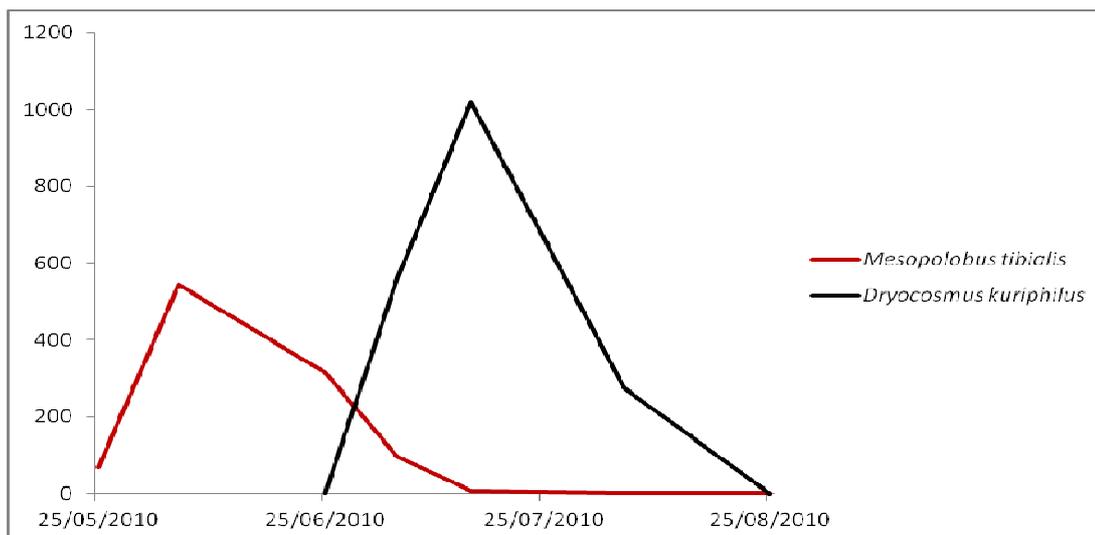


Figura 3.13: Confronto tra l'andamento stagionale di *Mesopolobus tibialis* e di *Dryocosmus kuriphilus*.

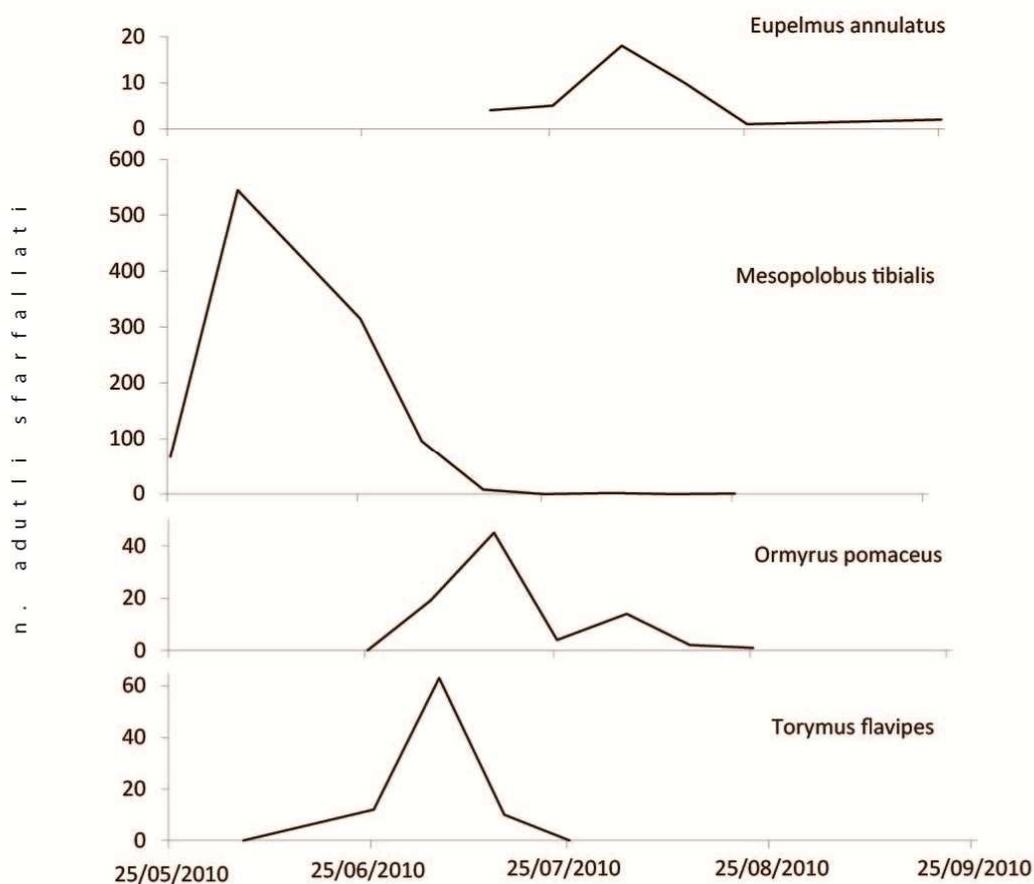


Figura 3.14: Andamento stagionale delle specie più abbondanti sfarfallate dalle galle estive raccolte nel 2010

3.4 Discussioni

Il ritrovamento di *T. sinensis* nelle prime due località di introduzione evidenzia il successo dell'attività svolta. Lo sfarfallamento di 19 esemplari del parassitoide ad un anno dal lancio (Geratzia) rappresenta un risultato ben superiore a quello rilevato in altre regioni italiane. La presenza del parassitoide è stata confermata a due anni dal lancio (Geratzia) con lo sfarfallamento di 43 esemplari (circa il doppio rispetto all'anno precedente) e ad un anno dal lancio in loc. Pala' e Crabile con ben 45 esemplari. Tali numeri, sebbene bassi in valore assoluto, rappresentano invece uno dei migliori risultati ottenuti in Italia.

La giusta scelta del sito di lancio assume una notevole rilevanza per la buona riuscita dell'intervento.

La presenza di un alto tasso di infestazione nei siti scelti ha garantito un elevato numero di siti di ovideposizione a disposizione del parassitoide.

Il monitoraggio puntuale dell'andamento della ripresa vegetativa delle piante ha consentito l'individuazione del momento ideale in cui liberare l'insetto. La fase fenologica riveste infatti una fondamentale importanza; il parassitoide preferisce deporre su galle giovani, quindi ancora tenere, che si rendono evidenti durante le prime fasi di germogliamento delle gemme.

La collaborazione e l'interazione in tempo reale con i colleghi piemontesi ha consentito il lancio tempestivo dell'antagonista del cinipide non appena si sono verificate le condizioni ideali.

Inoltre la scelta di castagneti con piante di dimensioni contenute

ha facilitato le operazioni di raccolta delle galle invernali per la verifica dell'insediamento del parassitoide.

Nonostante si possa affermare che *T. sinensis* si sia insediato stabilmente nei siti di introduzione, l'assenza di sfarfallamenti dalle galle raccolte nelle zone limitrofe al primo sito di lancio dimostrano una bassa velocità di dispersione del parassitoide.

I quattro lanci del 2011 hanno avuto come obiettivo quello di rafforzare i primi due e di velocizzare la diffusione del parassitoide nel territorio della Barbagia di Belvì. Lo stesso lancio di Pala' e Crabile (2010) ha riguardato un sito spazialmente non troppo lontano da Geratzia e collocato nella direzione di espansione dell'infestazione.

I due siti di Pratzia Baladuru (Belvì) e Is Ederas (Desulo) sono stati individuati nei pressi dei due più vecchi, in modo da rafforzare l'insediamento del parassitoide. I due siti di Caniganule (Desulo) e Terrabazzo (Tonara) sono più lontani da questo nucleo centrale, ma lungo due direttrici di diffusione del Cinipide.

Il monitoraggio dell'infestazione del cinipide eseguito in 167 punti distribuiti nel territorio barbaricino nel primo anno di attività (2009) ha consentito di definire l'esatta distribuzione del Cinipide galligeno, i punti di maggiore e, presumibilmente, di più antica infestazione e la direzione di diffusione del fitofago. La stessa configurazione del territorio e la distribuzione del castagno sul territorio hanno spinto il Cinipide verso nord-ovest.

Studi sulla fauna associata al *D. kuriphilus* effettuati in Cina, Korea, Giappone, America del Nord e Italia hanno messo in evidenza la capacità da parte del cinipide galligeno del castagno di reclutare una

ampia gamma di nemici naturali indigeni soprattutto nell'ambito degli Imenotteri parassitoidi con il ritrovamento di 11 specie in Cina, 15 specie in Corea, 24 specie in Giappone e 15 specie nelle galle primaverili raccolte in Italia (Aebi *et al.* 2006).

I nostri risultati confermano questa situazione con il ritrovamento di almeno 14 specie di Imenotteri parassitoidi di cui 4 condivisi con le comunità sfarfallate in Cina, Giappone e Korea e 8 condivisi con le specie sfarfallate in Italia (Tabella 3.4).

Tra gli esemplari esaminati il 78% appartiene alla specie *M. tibialis* (Hymenoptera: Pteromalidae), un parassitoide generalista che attacca prevalentemente i cinipidi galligeni della quercia appartenenti al genere *Andricus* e *Neuroterus*. Von Rosen (1958) e Silvestri (1923) riportano tale insetto anche come parassitoide di larve e crisalidi di *Tortrix viridana* (L.) Questa specie, rispetto a tutte le altre raccolte, presenta un andamento stagionale che anticipa di almeno un mese quello del cinipide galligeno del castagno. Questa parziale sincronizzazione potrebbe favorire condizioni idonee al controllo delle popolazioni del *D. kuriphilus*.

Infatti, il problema riscontrato maggiormente nella possibilità di utilizzare i nemici naturali indigeni come agenti di controllo biologico sta nella mancata sincronizzazione di questi con il periodo in cui le galle presentano uno stadio di sviluppo appropriato per l'attacco da parte del parassitoide stesso. È probabilmente per questo motivo che il tasso di parassitizzazione riscontrato per molti di essi risulta essere basso.

Tabella 3.4: Elenco delle specie di parassitoidi sfarfallate dalle galle raccolte in Cina, Giappone, Corea, Italia e Sardegna

Specie	Famiglia	Cina	Giappone	Corea	Italia	Sardegna
<i>Mesopolobus tibialis</i>	Pterolamlidae					X
<i>M. sericeus</i>	Pterolamlidae				X	
<i>Cecidostiba geganius</i>	Pterolamlidae					X
<i>Cecidostiba saportai</i>	Pterolamlidae					X
<i>Caenacis lauta</i>	Pterolamlidae					X
<i>Eupelmus urozonus</i>	Eupelmidae	X	X	X	X	X
<i>Eupelmus annulatus</i>	Eupelmidae					X
<i>Eupelmus sp.</i>	Eupelmidae					
<i>Ormyrus nitidulus</i>	Ormyridae					X
<i>Ormyrus pomaceus</i>	Ormyridae	X	X	X	X	X
<i>Ormyrus sp.</i>	Ormyridae					
<i>Torymus auratus</i>	Torymidae				X	X
<i>Torymus flavipes</i>	Torymidae				X	X
<i>Torymus geranii</i>	Torymidae	X	X	X		
<i>Torymus sinensis</i>	Torymidae	X	X	X		
<i>Torymus sp.</i>	Torymidae					
<i>Megastigmus dorsalis</i>	Torymidae				X	X
<i>M. maculipennis</i>	Torymidae	X	X	X		
<i>M. nipponicus</i>	Torymidae	X	X	X		
<i>E. brunniventris</i>	Eurytomidae	X	X	X	X	X
<i>Eurytoma pistacina</i>	Eurytomidae				X	
<i>Sycophila iracemae</i>	Eurytomidae				X	
<i>Sycophila variegata</i>	Eurytomidae	X	X	X	X	X
<i>Sycophila biguttata</i>	Eurytomidae				X	X
<i>Sycophila concinna</i>	Eurytomidae	X				
<i>Pnigalio agraulis</i>	Eulophidae					X
<i>Tetrastichus sp.</i>	Eulophidae		X			

Tutto sommato, la presenza e il rapido reclutamento di questi parassitoidi da parte del cinipide apre un'interessante ipotesi nella lotta contro questo insetto attraverso l'utilizzo dei nemici naturali indigeni. Oltre a valutare la presenza dei parassitoidi locali legati al cinipide risulta estremamente importante riuscire a capire quali meccanismi si potrebbero instaurare tra queste comunità e il *T. sinensis*. I numerosi studi effettuati in Giappone descrivono tale specie come insetto specie-specifico (Murakami *et al.* 1977; Askew, 1975) indicando improbabili effetti no-target su altre specie di cinipidi.

Importanti considerazioni da fare riguardano anche la capacità di insediamento del parassitoide esotico che potrebbe essere ostacolato o ritardato, come messo in evidenza da molti studi, dalla presenza di iperparassitoidi quali *E. uruzonus* e *E. bruniventris* sfarfallati sia da galle raccolte in Giappone e in "Italia" (Aebi *et al.*, 2007) che da galle raccolte in Sardegna.

Infine si dovrebbe valutare la possibilità che esistano specie di Torimidi locali in grado di ibridarsi con la specie esotica così come segnalato in Giappone per la specie *T. beneficus* (Yara, 2006).

La presenza del *D. kuriphilus*, oltre ad influenzare il comportamento dei parassitoidi, potrebbe influenzare indirettamente anche la popolazione delle specie native di cinipidi. Anche se esistono pochi casi con i quali si mettono in evidenza tali effetti, la possibilità che una specie invasiva aliena influenzi la dinamica di popolazione delle specie native è possibile attraverso la condivisione dello stesso nemico naturale. Una specie invasiva aliena può infatti determinare un aumento della densità di popolazione dei predatori o parassitoidi che potrebbero minacciare le popolazioni locali. Ad esempio, l'incremento

della popolazione dell'Imenottero Mimaride *Anagrus epos* in California, in seguito all'introduzione della specie invasiva *Erythronera variabilis*, ha portato ad una diminuzione della popolazione della cicalina nativa *Erythronera elegantula* (Settle and Wilson, 1990) che questo insetto era solito parassitizzare.

Il reclutamento di specie indigene di parassitoidi, e quindi un aumento della loro abbondanza, da parte di *D. kuryphilus* potrebbe influenzare significativamente le popolazioni dei cinipidi nativi riducendone drasticamente la densità quando le galle del *D. kuryphilus* risultano in uno stadio non idoneo per poter essere parassitizzate. Non è ancora chiaro però se questo tipo di competizione sia in grado di determinare o meno l'estinzione della specie nativa.

Il buon esito dei primi due lanci del parassitoide esotico e la presenza di un buon numero di parassitoidi indigeni che si stanno adattando alla presenza del cinipide fanno ben sperare ad un ruolo complementare nella ricostituzione, nel minore tempo possibile, di uno stabile e duraturo equilibrio biologico.

3.5 Bibliografia

AEBI A., SCHÖNROGGE K., MELIKA G., ALMA A., BOSIO G., QUACCHIA A., PICCIAU L., ABE Y., MORIYA S., YARA K., SELJAK G., STONE G.N., 2006 – Parasitoid recruitment to the globally invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. In Ozaki K., Yukwa J., Ohgushi T., Price P.W. (eds), Ecology and evolution of galling arthropods and their associates. Springer-Verlag, Tokyo, pp 103-121.

AEBI A., SCHÖNROGGE K., MELIKA G., QUACCHIA A., ALMA A. and STONE G.N., 2007 – Native and introduced parasitoids attacking the invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus Kuriphilus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 37: 166-171.

ABE Y., MELIKA G., STONE G. N., 2007 – The diversity and phylogeography of cynipid gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Oriental and eastern Palaearctic regions, and their associated communities. – *Oriental Insects*, 41: 169-212.

ASKEW R.R., 1975 – The organization of Chalcid-dominated parasitoid communities centred upon endophytic host. In Price P.W. (ed), *Evolutionary strategies of parasitic insects and mites*. Plenum, New York, pp. 130-153.

BOSIO G., BRUSSINO G., BAUDINO M., GIORDANO R., RAMELLO F., 2003 – Una nuova minaccia per la castanicoltura piemontese. In provincia di Cuneo si sta diffondendo uno degli insetti più nocivi per il castagno. – *Quaderni della Regione Piemonte, Agricoltura*, 35: 24-25.

BRUSSINO G., BOSIO G., BAUDINO M., GIORDANO R., RAMELLO F., MELIKA G., 2002 – Pericoloso insetto esotico per il

castagno europeo. – *Informatore-Agrario*, 58 (37): 59-61.

CHO DY., LEE SO., 1963 – Ecological studies on the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, and observations of the damage caused to the tree by this insect. – *Korean Journal of Plant Protection*, 2: 47-54 (in Korean).

EPPO, 2007 – *Dryocosmus kuriphilus* found in the south of France (Alpes Maritimes).- EPPO Reporting Service - Pests & Diseases, 5 (086): 2.- [online] URL: <http://archives.eppo.org/>.

KAMIJO K., 1982 – Two new species of *Torymus* (Hymenoptera, Torymidae) reared from *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera, Cynipidae) in China and Korea. *Kontyû* 50: 505-510.

KIM J. K., 1993 – Natural enemies of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) and their seasonal prevalence of adult emergence in Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.* 32: 285-290 (in Korean with English summary).

KO J. H., 1971 – Notes on *Eudecatoma variegata* Curtis (Hymenoptera: Eurytomidae) as a parasitoid of the gall wasp (Cynipidae) in Korea. *Kor. J. Entomol.* 1: 25-26.

LI YZ., YI YH., ZHENG ZL., XIE ZF., 2004 – The spatial distribution of chestnut gall wasp and sampling techniques in the chestnut plantation. *Journal of South China Agricultural University*, 25 (1): 62-65 (in Chinese).

MATOŠEVIĆ D., PERNEK M., HRAŠOVEC B., 2010 – First record of Oriental chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*) in Croatia]. *Šumarski List* 9/10, 497-502 (in Croatian).

MELIKA G., BRUSSINO G., BOSIO G., CSÓKA G., 2003 – Szelidgesztenye-gubacsdarazs (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu

1951 - Hymenoptera: Cynipidae), a szelidgesztenye új kartevoje Európában. – *Növényvédelem*, 39 (2): 59-63.

MURAKAMI Y., UMEYA K. & OHO N., 1977 – A preliminary introduction and released of a parasitoid (Chalcidoidea, Torymidae) of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatzu. *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* 21: 197-203.

MURAKAMI Y., 1980 – Recent topics on the chestnut gall wasp, with special reference to a report from China. – *Nogyô oyobi Engei [Agriculture and Horticulture]*, 55: 249-253 (in Japanese).

MURAKAMI Y., OHKUBO N. and GYOUTOKU Y., 1993 – origin of *Torymus (Syntomaspis) sinensis* native to Tsushima Island. *Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu* 39: 124-126 (in Japanese with English summary).

MURAKAMI Y., AO H. B. and CHIANG C.H., 1980 – Natural enemies in the chestnut gall wasp in Hopei Province, China (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Jpn. J. Appl. Entomol. Z.* 15: 184-186.

OEPP/EPPO, 2005 – Data sheets on quarantine pests / Fiches informatives sur les organismes de quarantaine: *Dryocosmus kuriphilus*. – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 35: 422-424.

OHO N., UMEYA K., 1975 – Chestnut gall wasp is found in the People's Republic of China. – *Shokubutsu Boeki [Plant Protection]*, 29: 463-464 (in Japanese).

PANTALEONI R.A., LORU L., SASSU A., LODDO C., 2007. Il cinipide del castagno in Sardegna: una nuova preoccupante presenza nella Barbagia di Belvì. *Notiziario sulla Protezione delle Piante*, 21:203-206.

PAYNE J.A., JAYNES R.A. & KAYS SJ (1983) – Chinese

chestnut production in the United States: practice, problems and possible solutions. *Economic Botany* 37, 187-200.

PAK S., 1963 – Studies on the natural enemies of chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatzu) (Part 1). Publ. Div. Prot., Bureau Forest., Min. Agr. Forest. (1). 1-13 (in Korean with English summary)

SELJAK G., 2006. – Chestnut gall wasp - *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. Report – Phytosanitary Administration of the Republic of Slovenia. [online] URL: <http://www.furs.si/>

SETTLE W.H, Wilson LT. 1990. Invasion by the variegated leafhopper and biotic interactions: parasitism, competition, and apparent competition. *Ecology* 71: 1461-70

SHIRAGA T., 1951 – [*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) and its protection.] – *Nogyo Oyobi Engei [Agriculture and Horticulture]*, 26: 167-170 (in Japanese).

SILVESTRI F, 1923 – Contribuzioni alla conoscenza dei Tortricida delle Querce I-II. *Boll. Lab. Zool. Gen. Agr. Portici* 17: 41-107.

VON ROSEN H., 1958 – Zur Kenntnis der europäischen Arten des Pteromaliden – Genus *Mesopolobus* Westwood, 1833 (Hym., Chalc.) *Opusc. Ent.* 23: 203-40

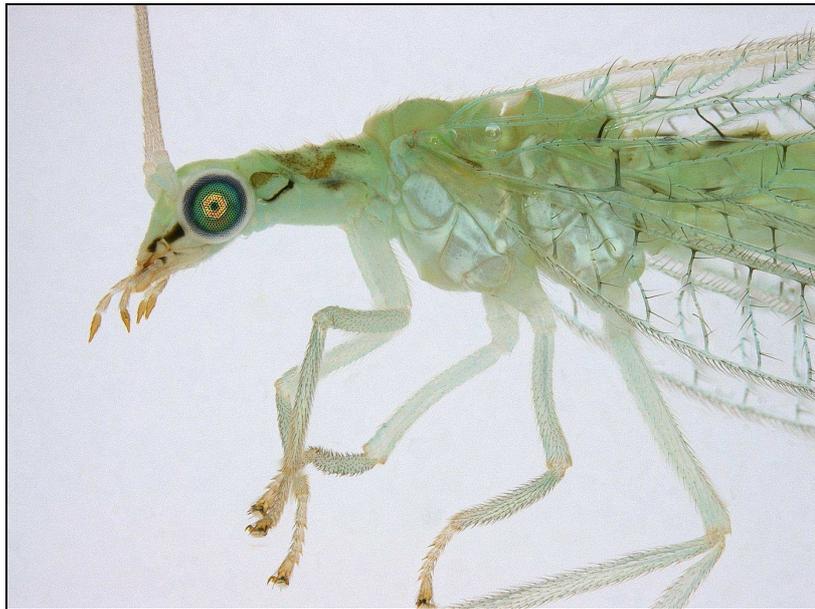
YARA K., 2006 – Identification of *Torymus sinensis* and *T. Benefices* (Hymenoptera: Torymidae), introduced and indigenous parasitoids of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera; Cynipidae), using the ribosomal ITS2 region. *Biological Control* 36: 15-21.

YASUMATSU K., 1951 – A new *Dryocosmus* injurious to

chestnut trees in Japan (Hym., Cynipidae). – *Mushi*, 22: 89-93.

YASUMATSU K. & KAMIJO K., 1979 – Chalcidoid parasites of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatzu (Cynipidae) in Japan, with description of five new species (Hymenoptera) *Esakia* 14: 93-111.

4. Ibridazione interspecifica nel genere *Chrysoperla* Steinmann, 1964 (Neuroptera Chrysopidae)



Riassunto

Larve appartenenti al genere *Chrysoperla* Steinmann, riconosciuti come i più efficaci predatori larvali, sono commercializzati in tutto il mondo come agenti di controllo biologico. L'introduzione di queste specie al di fuori del loro ambiente originario potrebbe causare una serie di rischi quali inquinamento genetico e non target impact con conseguente minaccia per le popolazioni delle specie autoctone.

L'accoppiamento tra differenti specie di *Chrysoperla* però è anche di grande interesse per capire il ruolo dell'ibridazione nei processi di speciazione e guadagnare una migliore comprensione circa le barriere pre e post-zigotiche negli insetti.

In questo lavoro sono state eseguite le prime prove di ibridazione in laboratorio tra le specie Europee *Chr. pallida* and *Chr. lucasina* e la specie indiana *Chr. sillemi*.

In condizioni di no-choice cross, tutti gli incroci interspecifici hanno avuto successo in almeno una delle due ripetizioni effettuate con l'ottenimento di ibridi F₁ fertili.

Gli adulti F₁, aventi le stesse specie parentali, sono stati successivamente incrociati tra di loro per ottenere progenie F₂ o reincrociati con una delle due specie parentali per ottenere la progenie B₁ (backcross).

Per ciascuno degli incroci effettuati è stata valutata la fecondità, intesa come numero di uova deposte da ciascuna femmina e la fertilità, intesa come percentuale di larve sgusciate.

Tra gli ibridi F_2 , la fecondità, a seconda della combinazione utilizzata, è risultata estremamente variabile mentre la fertilità, tranne in poche eccezioni, ha registrato valori ridotti o nulli.

Nei cosiddetti backcross, la fertilità era di solito molto alta in ogni combinazione a differenza della fecondità che mostrava valori superiori nella combinazione $[PF_1]$ rispetto alla combinazione $[F_1P]$.

L'ottenimento degli ibridi F_1 in entrambe le condizioni sperimentali adottate mostra che non esiste una assoluta incompatibilità post-zigotica tra nessuna delle specie utilizzate il che rappresenta un fattore di rischio per specie allevate e commercializzate in vari paesi del mondo

Sembrerebbe molto più semplice ottenere i B_1 rispetto agli F_2 sebbene ulteriori ricerche risultano necessarie per confermare questo.

4.1 Introduzione

L'ibridazione, ovvero l'incrocio tra gruppi o taxa geneticamente distinti conducente alla produzione di una progenie con un certo livello di fertilità, è un processo spesso sottovalutato dagli zoologi o ritenuto deleterio per la biodiversità.

L'importanza evolutiva della speciazione via ibridazione naturale è poco conosciuta e spesso considerata di minore importanza in quanto le proli ibride prodotte spesso presentano una fitness minore rispetto alle specie parentali (Mayr, 1963; Barton, 2001; Holloway *et al.*, 2006). La completa o parziale sterilità dell'ibrido non sempre rappresenta però una barriera completa all'introggressione genica e successive generazioni di reincroci possono permettere a volte di creare isolamento riproduttivo degli ibridi dai taxa parentali contribuendo ai processi di speciazione (Mavarez J. *et al.*, 2006).

Mentre anche in passato la formazione di nuove specie via ibridazione era ben nota, e considerata diffusa, per quanto riguarda il regno vegetale, esse era ritenuta rara o di poca importanza nel regno animale. Ormai da qualche lustro invece l'importanza dell'ibridazione nei processi evolutivi e di speciazione è riconosciuta anche in ambito animale (Arnold, 1997). Tale fenomeno non viene visto più come un "accidente" evolutivo con scarse possibilità di successo, ma bensì come un meccanismo che permette una forte flessibilità di risposta adattativa ai cambiamenti ambientali attraverso scambi orizzontali di geni o fenomeni di speciazione estremamente rapidi.

L'introduzione volontaria od involontaria da parte dell'uomo di specie aliene esotiche può facilitare il verificarsi di fenomeni di ibridazione. La specie aliena può essere affine ad una o più specie native ed incrociarsi con esse. L'impatto di queste introduzioni non si limita quindi ad alterazioni degli ecosistemi originari ma riguarda anche la possibilità di inquinamenti genetici ed alterazione del pool genico delle specie native.

I Neurotteri Crisopidi, essendo allo stadio larvale efficaci predatori di piccoli insetti, possono essere virtualmente utilizzati in programmi di controllo biologico all'interno di qualsiasi sistema agrario. I rappresentanti del genere *Chrysoperla* Steinmann, 1964 sono forse i Crisopidi più frequenti ed hanno dimostrato di essere efficaci predatori larvali di artropodi fitofagi (Lingren *et al.*, 1968). Essi sono inoltre contraddistinti da una serie di caratteri importanti dal punto di vista commerciale, quali l'elevata polifagia, la facilità di allevamento dovuto alla glicifagia degli adulti, e una elevata tolleranza a differenti tipi di insetticidi che li rendono i candidati ideali per la lotta biologica.

Per tutte queste ragioni, diverse specie sono state allevate e commercializzate in America, Europa, Australia e Asia per il rilascio massivo all'interno degli ecosistemi agrari. Numerose prove sono state effettuate per testare l'efficacia del rilascio di individui appartenenti al genere *Chrysoperla* nei confronti di diversi artropodi dannosi (Ridgway *et al.*, 1977; Ables & Ridgway, 1981; Ridgway & Murphy 1984; Tulisalo 1984). Tuttavia l'impatto di questi rilasci risulta ancora poco documentato (Daane *et al.*, 1996).

In passato si riteneva che la specie allevata ed utilizzata in tutti i continenti fosse *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) (Tjeder, 1960). Tuttavia negli ultimi vent'anni, dopo i primi indizi raccolti da Tauber & Tauber (1973), risulta ormai assodato che *Chr. carnea* è un complesso di numerose e straordinariamente simili specie gemelle inizialmente individuate attraverso il canto di corteggiamento (Henry *et al.* 1993, 2001) e distinguibili, non sempre, solo per sottili differenze morfologiche (Brooks, 1994).

Il canto nuziale è rappresentato da segnali a bassa frequenza che vengo emessi attraverso la vibrazione dell'addome senza che questo tocchi il substrato in un processo chiamato tremulazione. Le vibrazioni viaggiano attraverso il substrato e sono raccolte da particolari organi situati nelle tibie di un partner potenziale (Devetak 1992). Maschi e femmine stabiliscono così un duetto durante il corteggiamento che culmina con l'accoppiamento (Henry, 1979). Studi effettuati sul canto nuziale all'interno del gruppo *carnea* mette in evidenza come questo sia unico per ogni specie dimostrando un dimorfismo sessuale scarso o nullo.

I segnali per l'accoppiamento fanno parte di sistemi specifici per il riconoscimento del partner ed agiscono come forti barriere riproduttive sottoposte a forte selezione (Paterson, 1986; Butlin & Ritchie, 1994). Analisi delle sequenze di DNA hanno recentemente confermato la validità di tale approccio (Wells & Henry, 1998). Comunque Wells (1994) in prove biomolecolari ha riscontrato una variabilità genetica all'interno e tra le popolazioni di *Chr. plorabunda* (Fitch, 1855) e *Chr. johnsoni* Henry, Well & Pupedis 1993 talmente

ridotta da non riuscire tramite queste tecniche nella distinzione delle due specie.

Prove di laboratorio confermano che la formazione di ibridi tra specie gemelle di *Chrysoperla* è possibile (Naka *et al.*, 2005; Wells, 1993); inoltre si è visto che, forzando l'ibridazione interspecifica in laboratorio, la progenie risultante produce suoni ibridi che non sono mai stati rinvenuti in natura (Wells & Henry, 1998).

Alla luce di queste considerazioni, risulta chiaro che il commercio di grandi quantità di *Chrysoperla* come agenti di controllo biologico tra le varie parti del mondo pone problemi di conservazione. Spesso la specie utilizzata negli allevamenti massali non è presente nelle aree di rilascio e può potenzialmente interferire con i taxa autoctoni competendo con loro attraverso fenomeni di inquinamento genetico portando ad una estinzione globale o locale delle specie native. Il problema è stato accuratamente studiato in Giappone (Mochizuki *et al.*, 2007) dove l'arrivo di *Chrysoperla carnea* potrebbe interferire con *Chrysoperla nipponensis* (Okamoto, 1914).

In questo lavoro vengono riportati i risultati riguardo a prove preliminari di ibridazione in laboratorio che coinvolgono le specie Europee *Chrysoperla pallida* Henry, Brooks, Duelli & Johnson 2002 e *Chrysoperla lucasina* (Lacroix, 1912) e la specie Indiana *Chrysoperla sillemi* (Esben-Petersen, 1935) con il proposito di determinare se le barriere pre-zigotiche siano in grado di prevenire gli accoppiamenti intraspecifici in condizioni "no-choice" e determinare l'efficacia delle barriere post-zigotiche tra le specie attraverso la riduzione della vitalità e fertilità degli ibridi.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Allevamento del materiale sperimentale

I ceppi di *Chr. pallida* e *Chr. lucasina* hanno avuto origine da poche femmine catturate nell'agro di Sassari. *Chr. sillemi* deriva invece da una biofabbrica (Basarass Biocon pvt. Ltd.) del Tamil Nadu (India). L'identificazione delle specie è avvenuta mediante esame visuale del canto nuziale.

Il metodo di allevamento adottato deriva da quello descritto in Pasqualini (1975) opportunamente semplificato.

Gli adulti sono tenuti all'interno di contenitori cilindrici aperti ad entrambe le estremità e l'alimentazione è rappresentata da palline di polline depositate sul fondo del contenitore. L'acqua è somministrata giornalmente attraverso la bagnatura di uno strato di cotone idrofilo bagnato, contenuto in una capsula di plastica non coperta, posto sulla reticella che chiude il contenitore in alto. Gli esemplari sono mantenuti in celle climatizzate con temperatura controllata e fotoperiodo 16L:8D. Le uova vengono isolate e allevate separatamente in contenitori di plastica cilindrici trasparente. Tutte le larve sono state alimentate a giorni alterni con 2 larve del Coleottero *Tenebrio molitor* di dimensioni adeguate, avendo cura ogni volta di eliminare i residui del pasto precedente.

Gli adulti neo-sfarfallati venivano allevati in vasi ospitanti solo individui di uno stesso sesso, ed erano utilizzati per le prove sperimentali solo a 7 – 10 giorni di età.

4.2.2 Incroci F1

Vengono qui definiti F_1 gli incroci di due diverse specie parentali anche in relazione al sesso. Per ogni incrocio interspecifico sono stati utilizzati due “vasi” ospitanti 5 maschi e 5 femmine. Questi incroci sono stati replicati rispettivamente a temperature di 22°C e 25°C con fotoperiodo 16L:8B. Allevamenti di controllo con le specie parentali “pure” sono stati eseguiti nelle stesse condizioni sperimentali.

4.2.3 Incroci F2

Vengono qui definiti F_2 gli incroci di ibridi F_1 aventi le stesse specie parentali anche in relazione al sesso. In relazione al numero degli F_1 ottenuti non è stato possibile realizzare la prova per tutte le combinazioni. I “vasi” utilizzati ospitavano sempre 2 maschi e 2 femmine. La prova ha riguardato 2 combinazioni su 6 con 2 “vasi” alla temperatura di 22°C, e 5 combinazioni su 6 con 4 vasi alla temperatura di 25°C.

4.2.4 Incroci B1

Vengono qui definiti B_1 gli incroci di ibridi F_1 con una delle specie parentali. In relazione al numero degli F_1 ottenuti non è stato possibile realizzare la prova per tutte le combinazioni. I “vasi” utilizzati ospitavano sempre 2 maschi e 2 femmine. La prova ha riguardato 10 combinazioni con 2 “vasi” alla temperatura di 22°C.

Ogni 3,5 giorni, da ciascun vaso, venivano prelevate tutte le uova. Esse erano esaminate solo qualche giorno dopo in modo che

l'embrione avesse modo di svilupparsi e di divenire visibile. Era così possibile discriminare quelle embrionate da quelle non embrionate. Ogni prova sperimentale, per ogni "vaso", è durata cinque settimane.

Al fine di valutare con precisione la fertilità degli incroci F_2 e B_1 , intesa come percentuale di larve sgusciate e vitali, per ogni incrocio sono state isolate 30 uova (quando disponibili). La fertilità degli incroci F_1 invece non è stata quantificata.

Le larve ottenute sono state allevate singolarmente, monitorate giornalmente per la registrazione dei tempi di sviluppo, della mortalità, del peso dei bozzoli ed, ovviamente, del sesso.

In tutte le prove i dati sono stati sottoposti a test di omogeneità della varianza per verificare la possibilità di utilizzare test parametrici o non parametrici.

Nel primo caso l'elaborazione è avvenuta con un'ANOVA semplice e confronti multipli non prestabiliti attraverso il metodo sequenziale di Duncan. Nel secondo è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis e il test del chi-quadro. La trasformazione angolare dei dati si è resa necessaria per i rilievi di mortalità.

4.3 Legenda

Di seguito viene riportata una nota esplicitiva per la comprensione delle sigle utilizzate nel testo.

[p], [s], [l]: parentali (p = *Chr. pallida*; s = *Chr. sillemi*; l = *Chr. lucasina*)

[ps], [sp], [lp], ... , ...: incroci ♂ specie p × ♀ specie s, ♂ specie s × ♀ specie p, ♂ specie l × ♀ specie p, eccetera, eccetera.

[F₁P], [PF₁]: incroci ♂ F₁ × ♀ paraentale, ♂ parentale × ♀ F₁

P : progenie ottenuta da accoppiamento intraspecifico

F₁ : progenie ottenuta dall'incrocio tra due specie parentali

F₂ : progenie ottenuta dall'incrocio tra ibrido due ibridi F₁ aventi le stesse specie parentali

B₁ : progenie ottenuta dall'incrocio tra ibridi F₁ ed una delle due specie parentali

4.4 Risultati

4.4.1 Successo degli incroci F₁

Tutti gli incroci F₁ effettuati hanno avuto successo in almeno una delle due ripetizioni (Tabella I).

Tabella I – Successo negli incroci interspecifici tra le tre specie di *Chrysoperla*

	Incrocio		Ripetizione	
	♂	♀	A t 25°C	B t22°C
1	p	l	+	+
2	l	p	+	-
3	p	s	+	+
4	s	p	-	+
5	l	s	+	-
6	s	l	+	-

I segni + e - indicano rispettivamente la presenza e assenza di progenie vitale per ciascun incrocio effettuato nelle ripetizioni A e B.

Alla temperatura di 22 °C (ripetizione B) per gli incroci [ls], [sl] e [lp] tutte le uova deposte sono risultate sterili, condizione non verificatasi nella prova effettuata alla temperature di 25 °C (ripetizione A). In quest'ultimo caso solo l'incrocio [sp] non ha dato alcuna progenie, mentre è risultato fertile nelle prove condotte a 22 °C (ripetizione B).

4.4.1.1 *Tempi di sviluppo degli F1*

I tempi di sviluppo differiscono significativamente tra gli incroci ed i rispettivi controlli (Test non parametrico di Kruskal-Wallis Test $P \leq 0,05$; Tabella II).

A 25°C tra le specie parentali i tempi di sviluppo di [l] sono significativamente più corti rispetto ai tempi di sviluppo di [p] e [s]. Negli incroci interspecifici, l'incrocio [sl] ha registrato dei tempi di sviluppo significativamente più corti rispetto a tutti gli altri incroci ad esclusione di [l] che risulta intermedio. L'incrocio [ps] presenta valori intermedi tra tutti gli incroci ad esclusione di [sl].

Anche nella ripetizione B, i tempi di sviluppo registrati per le specie parentali sono significativamente diversi fra di loro con [l] che ha i tempi più corti e [p] che ha i tempi più lunghi mentre tutti gli incroci interspecifici presentano valori intermedi tra [s] ed [l].

Tabella II – Incroci F₁ e specie parentali: tempi di sviluppo in giorni

	Incrocio		Tempi di sviluppo Media ± Dev. St.	
	♂	♀	A t 25 °C	B t 22 °C
1	p	l	23,64 ± 1,85 (61) a	31,8 ± 1,9 (6) ab
2	l	p	23,36 ± 1,42 (56) a	–
3	p	s	22,86 ± 1,57 (30) ab	32,1 ± 1,9 (45) ab
4	s	p	–	31,4 ± 2,9 (31) ab
5	l	s	23,59 ± 1,65 (22) a	–
6	s	l	21,55 ± 1,62 (60) c	–
7	p	p	23,41 ± 1,44 (58) a	34,8 ± 3,1 (36) c
8	s	s	23,49 ± 2,03 (56) a	32,7 ± 2,7 (40) b
9	l	l	22,22 ± 1,71 (50) bc	30,7 ± 1,8 (41) a

I valori sono espressi come media con deviazione standard (fra parentesi il numero dei dati utilizzati).

Valori sulla colonna seguiti da lettere diverse differiscono significativamente per $P \leq 0.05$ (test non parametrico di Kruskal-Wallis).

4.4.1.2 Mortalità degli F1

La percentuale di individui morti tra lo sgusciamiento dall'uovo allo sfarfallamento è riportata in tabella III.

Tabella III - Incroci F₁ e specie parentali: valori percentuali di mortalità

	Incrocio		A t 25 °C	B t 22 °C
	♂	♀		
1	p	l	12,9 (70)	14,3 (7)
2	l	p	22,9 (70)	–
3	p	s	14,3 (35)	4,3 (47)
4	s	p	–	11,4 (35)
5	l	s	21,4 (28)	–
6	s	l	14,29 (70)	–
7	p	p	17,1 (70)	25 (48)
8	s	s	18,57 (70)	20 (50)
9	l	l	28,6 (70)	2,4 (42)

Tra parentesi il numero dei dati utilizzati.

Tra tutti gli incroci, sia nella prima che nella seconda ripetizione, non c'è una differenza significativa (ripetizione A ANOVA, df = 7, F= 0,67; P-value= 0,6990; ripetizione B ANOVA, df = 6, F = 0,97; P-value = 0,4672).

4.4.1.3 *Peso Bozzoli e Sex Ratio degli F1*

I risultati relativi al peso dei bozzoli, disponibili solamente per la ripetizione A (mantenuta a 25° C), e la sex ratio sono riportati in tabella IV.

Tabella IV - Incroci F₁ e specie parentali: peso dei bozzoli in mg e sex ratio come % di ♀♀

	Incrocio		Peso bozzolo A t 25 °C		Sex Ratio	
	♂	♀	♀	♂	A t 25 °C	B t 22 °C
1	p	l	9,34±1,15 b (61)	7,34±0,92 bc (61)	48,3 (58)	50 (7)
2	l	p	8,93±1,01 ab (54)	7,25±0,71 bc (54)	44,4 (54)	–
3	p	s	9,10±1,34 ab (31)	6,85±0,92 ab (31)	30 (30)	34,04 (45)
4	s	p	–	–	–	61,29 (31)
5	l	s	9,12±0,93 ab (23)	7,12±0,59 abc (23)	59,1 (22)	–
6	s	l	9,27±1,16 b (60)	6,97±0,86 abc (60)	53,3 (60)	–
7	p	p	9,60±1,23 b (59)	7,43±0,85 c (59)	55,9 (59)	54,1 (37)
8	s	s	8,20±1,33 a (60)	6,58 ±0,82 a (60)	41,1(56)	52,5 (40)
9	l	l	8,92±1,23 ab (51)	7,10±0,83 abc (51)	44 (50)	31,71 (41)

I valori sono espressi come media con deviazione standard (fra parentesi il numero dei dati utilizzati). Valori nella colonna seguiti da lettere diverse differiscono significativamente per $P \leq 0,05$ (test di Duncan).

Il peso dei bozzoli tra le femmine differisce significativamente (ANOVA, P-value 0,0041, df 7, F = 3,11), così come quello tra i maschi (ANOVA, P-value 0,0018, df 7, F=3,40).

Tra le specie parentali i pesi maggiori e minori sono stati registrati, in entrambi i sessi, per *Chr. pallida* e *Chr. sillemi*, mentre negli incroci F₁ i valori registrati sono risultati intermedi.

La sex ratio non mostra mai differenze significative da un teorico rapporto tra i sessi di 1:1 (test del $\chi^2 = 4,973$, df 7 per la ripetizione A; test del $\chi^2 = 6,49$, df 5 per la ripetizione B).

4.4.2 Fecondità e fertilità degli F₂

Tra tutti gli incroci non vi sono differenze significative ad entrambe le temperature (test non parametrico di Kruskal – Wallis, P-value $\geq 0,05$; Tabella IV e V).

Nelle prove condotte a 22 °C, a causa dell'infertilità degli incroci interspecifici di partenza, è stato possibile ottenere solo le combinazioni [ps] e [sp]. Solo quest'ultimo ha registrato una fecondità e fertilità rilevante.

Nelle prove condotte a 25 °C, la fecondità maggiore è stata registrata per gli incroci [lp]×[lp] e [ps]×[ps].

Sia negli incroci con Chr. lucasina e Chr. pallida come specie parentali, sia in quelli tra Chr. pallida e Chr. sillemi, una delle due combinazioni mostra una fecondità molto inferiore rispetto al proprio reciproco. Così [sl]×[sl] ha fecondità molto superiore di [ls]×[ls] e [lp]×[lp] di [pl]×[pl].

I valori relativi alla fertilità sono risultati nulli per le combinazioni [lp]×[lp], [sl]×[sl] e [pl]×[pl] mentre valori ridotti sono stati registrati per [ps]×[ps]. A causa dei valori estremamente bassi della fecondità registrati per l'incrocio [ls]×[ls] non è stato possibile effettuare per quest'ultimo il calcolo della fertilità. L'incrocio [sp]×[sp] non è stato realizzato a causa dell'infertilità dell'incrocio interspecifico di partenza.

Tabella IV Fecondità e fertilità degli incroci F₂ a 22 °C

Incrocio ♂♀	Fecondità / ♀ numero uova	Fertilità: % larve sgusciate		
		Vaso 1	Vaso 2	Totale
1 sp	239,2 ± 80,26	96,7 (30)	71 (31)	83,63
2 ps	49 ± 59,4	0 (16)	0 (2)	0

I valori relativi alla fecondità sono espressi come numero medio di uova per femmina deposte nell'arco di 5 settimane con deviazione standard (per ogni incrocio sono state effettuate 2 replicazioni). I valori di fertilità sono espressi come percentuale di larve sgusciate su un campione massimo di 30 uova (tra parentesi numero di uova effettivamente esaminate).

Tabella V – Fecondità e fertilità degli incroci F₂ a 25 °C

Incrocio ♂♀	Fecondità / ♀ numero uova	Fertilità: % larve sgusciate				
		Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Totale
1 sl	64,6 ± 128,9 (4)	–	0 (29)	–	–	0
2 ls	2,75 ± 3,06 (4)	–	–	–	–	–
3 lp	328,6 ± 289,3 (4)	–	–	0 (30)	0 (30)	0
4 pl	82 ± 116,2 (4)	–	–	–	0 (13)	0
5 ps	313,75 ± 164 (4)	3,4 (29)	–	51,7 (29)	57,1 (28)	37,6

I valori della fecondità sono espressi come numero medio di uova per femmina deposte nell'arco di 5 settimane con deviazione standard (tra parentesi il numero dei dati utilizzati). I valori di fertilità sono espressi come percentuale di larve sgusciate su un campione massimo di 30 uova (tra parentesi numero di uova effettivamente esaminate).

4.4.3 Fertilità e fecondità dei B₁

La fecondità tra i diversi incroci B₁ non mostra differenze significative (ANOVA, df = 7, F = 1,11, P-value = 0,4384; tabella VI).

Pur risultando, in un confronto a coppie tra reciproci ([F₁]x[P] e [P]x[F₁]), significativa la differenza della sola combinazione [ps]x[s] e [s]x[ps] (test non parametrico di Mann-Whitney P value ≤ 0,05 tabella VI, figura 1), in tutti i casi tra le due combinazioni reciproche si sono registrate differenze notevoli. In tre casi su quattro è risultata più feconda la coppia col maschio parentale per la femmina ibrida.

La fertilità risulta essere molto alta in tutte le combinazioni (tabella VI).

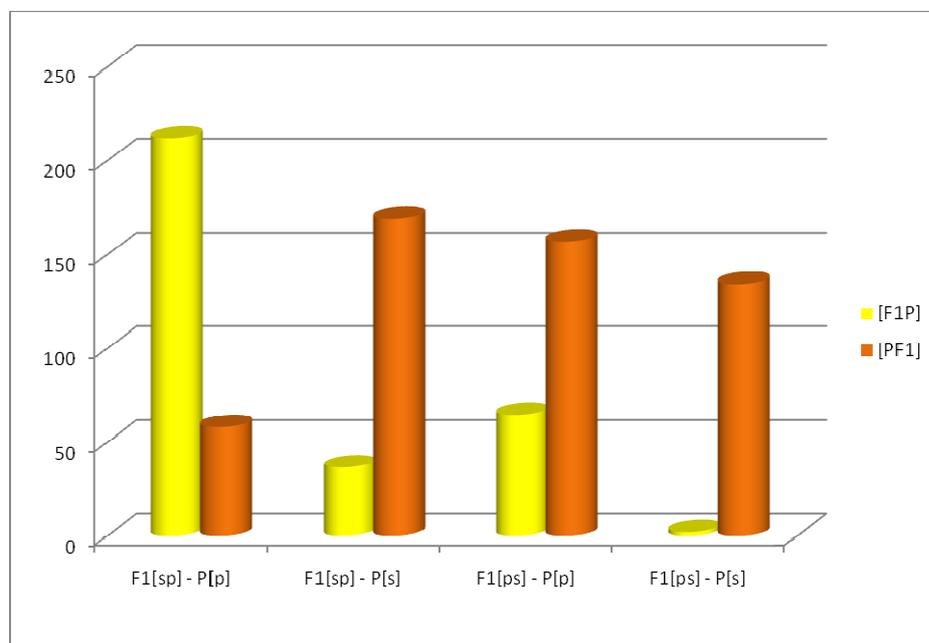


Figura 1: Fecondità dei B₁, confronto tra [F₁P] e [PF₁]

Tabella VI – Fecondità e fertilità dei B₁

Incrocio		Fecondità / ♀: numero uova	Fertilità: % larve sgusciate		
♂	♀		Vaso 1	Vaso 2	Totale
sp	p	212 ± 138,5	96,7 (30)	92,9 (28)	94,86(58)
p	sp	58 ± 76,4	90 (30)	–	90(30)
sp	s	36,5 ± 26,16	91,7 (12)	–	91,7(12)
s	sp	169 ± 134,5	100 (13)	93,3 (28)	95,42(41)
ps	p	64,5 ± 36,06	0 (9)	0 (30)	0(39)
p	ps	157 ± 157,7	77,8 (9)	81,8 (37)	81,01(46)
ps	s	2 ± 0,70	–	–	–
s	ps	134,25 ± 94,4	83,3 (30)	0 (12)	59,5(42)

I valori relativi alla fecondità sono espressi come numero medio di uova per femmina deposte nell'arco di 5 settimane con deviazione standard (per ogni incrocio sono state effettuate 2 replicazioni). I valori di fertilità sono espressi come percentuale di larve sgusciate su un campione massimo di 30 uova (tra parentesi numero di uova effettivamente esaminate).

4.5 Discussione

Nelle condizioni sperimentali adottate, l'ibridazione tra le specie testate, appartenenti al genere *Chrysoperla*, è risultata possibile così come le barriere pre-zigotiche si sono dimostrate facilmente superabili. Chiaramente le condizioni di no-choice adottate non sono quelle riscontrabili in natura. Mochizuki *et al.* (2006), in prove di ibridazione tra le specie *Chr. carnea* e *Chr. nipponensis* hanno scoperto che il tasso di ibridazione aumenta alla diminuzione del volume dei vasi sperimentali dimostrando come condizioni di restrizione stringenti possano influire sulle possibilità di incrocio interspecifico.

In queste prove gli F₁ sono stati sempre ottenuti almeno ad una o in entrambe le temperature sperimentali. In nessuno degli incroci si

è avuta quindi la presenza di una incompatibilità post-zigotica insuperabile.

Pur in un ambito di non significatività statistica, l'ottenimento degli F_2 è risultato piuttosto difficoltoso e limitato ad una bassa percentuale delle coppie testate.

I B_1 paiono tendenzialmente più facili da ottenere. Le differenze relative alla fecondità registrate nelle due combinazioni reciproche [PF_1] e [F_1P] potrebbero essere legate a problemi nella ricombinazione dei cromosomi sessuali così come mostrato da Shaw e Wilkinson (1980) nel genere *Caledia* (Orthoptera: Acridinae).

La maggiore facilità con la quale è possibile ottenere i B_1 rispetto agli F_2 è estremamente interessante ed apre ipotesi suggestive. L'ibridazione naturale potrebbe ad esempio essere sfruttata dalle specie parentali per lo scambio di pacchetti genici via F_1 seguito da B_1 . Le difficoltà mostrate dagli F_2 ridurrebbero invece la possibilità di originare da parte di quest'ultimi nuove linee genetiche ibride autonome in grado di isolarsi riproduttivamente dai taxa parentali.

I fenomeni di ibridazione in natura tra specie gemelle di *Chrysoperla*, anche se rari, possono tuttavia verificarsi. Come ricordato in premessa, il genere *Chrysoperla* viene commercializzato in tutto il mondo come agente di controllo biologico e spesso le specie commercializzate non sono presenti nelle aree di rilascio, risulta perciò necessario monitorare tali introduzioni al fine di limitare possibili ibridazioni e conseguenti effetti non target.

4.6 Bibliografia

ABLES J. R. and RIDGWAY R. L., 1981 – Augmentation of entomophagous arthropods to control insect pests and mites, pp. 273-303. In G. C. Papavizas [ed.], Biological control in crop production. Beltsville Symposium on Agricultural Research, No.5. Allanheld, Osmun and Company, Totowa, NJ.

ARNOLD M. L., 1997 – Natural hybridization and evolution. Oxford University Press.

AVISE J. C., 1975 – Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23: 465-481.

BARTON N. H., 2001 – The role of hybridization in evolution. Mol. Ecol 10: 551-568.

BULLINI L. and SBORDONY B., 1980 – Electrophoretic studies of gene enzyme systems: microevolutionary processes and phylogenetic inference. Boll. Zool. 47: 95-112.

BUTLIN R. K. and RITCHIE M. G., 1994 – Mating behaviour and speciation. In Behaviour and Evolution, ed. Slater, P. J. & Halliday, T. R., pp. 43-79. Cambridge University Press.

DAANE K. M., YOKOTA G. Y., ZHENG Y. and HAGEN K. S., 1996 – Inundative release of common green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) to suppress *Erythroneura variabilis* and *E. elegantula* (Homoptera: Cicadellidae) in vineyards. Environmental Entomology 25 (5): 1224-1234.

DEVETAK D., 1992 – Physiology of neuropteran vibration receptors: *Chrysoperla carnea* (Stephens) as an example (Insecta: Neuroptera: Chrysopidae), pp. 105. In M. Canard, H. Aspöck & M. W. Mansell [eds.], Current research in neuropterology. Proceedings of

the 4th International Symposium on Neuropterology, Toulouse, France.

HOLLOWAY A. K., CANNATELLA D. C., GERHARDT H. C. and HILLIS D. M., 2006 – Polyploids with different origins and ancestor form a single sexual polyploidy species. *Am. Nat* 167: E88-E101.

HENRY C. S., 1979 – Acoustical communication during courtship and mating in the green lacewing of the *Chrysopa carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Annals of the Entomological Society of America* 72, 68-79.

HENRY C. S., WELLS M. M. and PUPEDIS R. J., 1993 – Hidden taxonomic diversity within *Chrysoperla plorabunda* (Neuroptera: Chrysopidae): two new species based on courtship songs. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 1-13.

HENRY C. S., BROOKS S. J., THIERRY D., DUELLI P. and JOHNSON J. B., 2001 – The Common green lacewings (*Chrysoperla carnea* s. lat.) and the sibling species problem. In *Lacewings In The Crop Environment*, ed. McEwen P. K., New T. R. & Whittington A. E., pp. 29-42. Cambridge University Press, 546 pp.

HILLIS D. M. and MORITZ C., 1990 – *Molecular systematics*. Sinauer, Sunderland, MA.

HOWARD D. J., 1986 – A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution* 40: 34-43.

JANSSON A., 1979 – Postglacial distributional history of the water boatman *Arctocorisa carinata* (Heteroptera Corixidae). *Entomologia Generalis* 6: 235-245.

NAKA H., MITSUNAGA T. and MOCHIZUKI A., 2005 – Laboratory Hybridization Between the Introduced and the Indigenous Green Lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: *Chrysoperla*) in Japan. Environ. Entomol. 34(3): 727-731

NAKA H., . HARUYAMA N., ITO K., MITSUNAGA T., NOMURA M. and MOCHIZUKI A., 2006 – Interspecific hybridization between introduced and indigenous green lacewings (Neurop., Chrysopidae: *Chrysoperla*) at different adult densities.

MALLET J., 2005 – Hybridization as an invasion of the genome. Trend in ecology and evolution 20(5): 229–237.

LINGREN P. D., RIDGWAY R. L. and JONES S. L., 1968 – Consumption by several common arthropod predators of eggs and larvae of two *Heliothis* species that attack cotton. Ann. Ent. Soc. America. 61: 613-8.

MAVÁREZ J., SALAZAR C. A., BERMINGHAM E., SALCEDO C., JIGGINS C. D. and LINARES M., 2006 – Speciation. by hybridization in *Heliconius* butterflies. Nature 441: 868-871.

MAYR E., 1963 – Animal species and evolution. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

MOCHIZUKI A., NAKA H., MITSUNAGA T., HARUYAMA N. and NOMURA M., 2007 – Is the introduction of the biological control agent, *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836), risky or beneficial? Ann. Mus. civ. St. nat. Ferrara, 8: 197–202.

PATERSON H. E. H., 1986 – The recognition concept of species. In Species and Speciation, Transvaal Museum Monograph no. 4, pp. 21-29. Transvaal Museum Pretoria.

RIDGWAY R. L., KING E. G. and CARRILLO J. L., 1977 – Augmentation of natural enemies for control of plantpests in the Western Hemisphere, pp. 397-416. In R. L. Ridgway and Vinson [eds.], Biological control by augmentation of natural enemies. Plenum, New York.

RIDGWAY R. L. and MURPHY W. L., 1984 – Biological control in the field, pp. 220-227. In M. Canard, Y. Semeria, and T. R. New [eds.], Biology of Chrysopidae. W. Junk, The Hague.

ROY H. E., ROY D. B., ROQUES A., 2011 – Inventory of terrestrial alien arthropod predators and parasites established in Europe. *BioControl* 56: 477-504.

SHAW D. D., WEBB G.C., WILKINSON P., 1980 – Chromosomal reorganization, geographic differentiation and the mechanism of speciation in the genus *Caledia*. In insect cytogenetics.(ed. R. L. Blackman G. M. Hewitt G.M. & Ashburner M.), pp 171-194, Balckwell Scientific Publication Oxford.

TAUBER C. A. and TAUBER M. J., 1973 – Diversification and secondary intergradations of two *Chrysopa carnea* strain (Neuroptera: Chrysopidae). *Canadian Entomologist* 105: 1153-1167.

TJEDER B., 1960 – Neuroptera from Newfoundland, Miquelon, and Labrador. *Opuscula Ent.* 25: 146- 149.

TULISALO U., 1984 – Biological control in the greenhouse, pp. 228-233. In M. Canard, Y. Semeria, and T. R. New [eds.], Biology of Chrysopidae. W. Junk, The Hague.

WALKER T. J., 1964 – Cryptic species among sound-producing Ensiferan Orthoptera (Gryllidae and Tet-tigoniidae). *The Quarterly Review of Biology* 39: 345-355.

WELLS M. M., 1993 – Laboratory hybridization in green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: *Chrysoperla*): evidence for genetic incompatibility. *Can. J. Zool.* 71: 233-237.

WELLS M. M., 1994 – Small genetic distances among population of Green Lacewings of the Genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). *Ann. Entomol. Soc.m.* 87(6): 737-744.

WELLS M. M. and HENRY C. S., 1994 – Behavioral responses of hybrid lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) to courtship songs. *J. Insect Behav.* 7: 649-662.

WELLS M. M., & HENRY C. S., 1998 – Songs, reproductive isolation and speciation in cryptic species of insects: a case study using green lacewings. In *Endless Forms: Species and Speciation*, ed. Howard, D. & Berlocher, S., pp. 217-233. Oxford University Press.

5. Conclusioni

L'utilizzo di predatori esotici in programmi di lotta biologica ha da sempre rappresentato uno dei mezzi più utili per la difesa delle colture dagli insetti dannosi anche in considerazione del suo basso impatto ambientale. Da sempre tale metodo, ove possibile, è stato preferito all'utilizzo di mezzi chimici.

I primi successi di tale lotta risalgono al XIX secolo con l'introduzione in America del Coleottero *Rodolia cardinalis* (Mulsant) per il controllo della cocciniglia cotonosa degli agrumi *Icerya purchasi* (Maskell) e da allora molti altri interventi sono stati effettuati con l'unico scopo di combattere gli insetti dannosi all'agricoltura.

Gli impatti ambientali negativi dovuti alle introduzioni in natura di ausiliari per la lotta biologica non sono stati ben documentati in letteratura (Howarth, 1983, 1991). Come rischi ambientali principali, infatti, sono sempre stati considerati soltanto i fattori che possono influenzare il successo dei programmi di lotta biologica, e, inoltre, la gran parte degli studi si sono concentrati solamente su ambienti antropizzati.

Molti biologi infatti vedono, a causa della sua irreversibilità, l'introduzione intenzionale di specie aliene all'interno delle comunità biologiche come una grave minaccia alla loro struttura e dinamica.

Secondo alcuni (Pyle et al, 1981), i danni causati alla fauna locale da tali specie possono essere considerati addirittura più dannosi di quello che si potrebbe registrare con l'utilizzo degli insetticidi.

L'invasione biologica è ritenuta un processo naturale e viene visto anche come un importante componente dei processi evuzionistici. Oggigiorno però tale fenomeno, a causa dell'aumento

delle attività umane quali scambi commerciali, turismo e agricoltura (Williamson, 1996), risulta molto più accentuato di quanto non fosse in passato.

La sopravvivenza di individui di nuova introduzione e il loro insediamento all'interno del nuovo ambiente avviene grazie ad una serie di fattori quali assenza di limitatori naturali nativi, condizioni ambientali favorevoli e competitività superiore rispetto alle specie native.

Dagli studi effettuati in questo lavoro sui tre ordini di insetti presi in considerazione possiamo comunque affermare la reale presenza di pericoli legati all'introduzione di insetti predatori esotici.

Anche se queste condizioni non sempre si verificano, l'invasione biologica con il passare degli anni sarà un fenomeno sempre più frequente che continuerà a generare esiti sorprendenti e inaspettati.

Approfondire e avere maggiori conoscenze sui casi riguardanti le invasioni biologiche avvenute in passato potrebbe essere utile per mitigare gli effetti negativi di quelle nuove, indirizzando verso una migliore scelta dell'agente biologico da utilizzare.

L'invasione biologica da parte di specie aliene è uno dei fattori che pone problemi sulla tutela della biodiversità perciò comprenderne i meccanismi potrebbe permettere di utilizzare al meglio uno degli strumenti essenziali su cui si basa l'agricoltura sostenibile ovvero la lotta biologica.

Bibliografia

PYLE R., BENTZIEN M. and OPLER P., 1981 – Insect conservation. *Ann. Review Entom.* 1981 26:233-58

WILLIAMSON M., 1996 – Biological invasions. *Population and community biology*, Series 15. London, UK: Chapman & Hall.

6. Ringraziamenti

Un ringraziamento speciale va al Professor Pantaleoni per i consigli, gli insegnamenti ricevuti in questi tre anni e per l'aiuto concessomi durante la stesura della tesi.

Ringrazio il Dott. Antonio Sassu per avermi sostenuto, incoraggiato e aiutato durante tutto il percorso e la Dott.ssa Laura Loru per l'incoraggiamento, i consigli e l'aiuto concessomi non solo in questi tre anni, ma soprattutto negli ultimi giorni di stesura della tesi.

Ringrazio il Dott. Marcello Verdinelli per i consigli e l'aiuto datomi durante l'elaborazione dei dati e tutto il personale dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, sede di Sassari.

Ringrazio inoltre la mia famiglia e tutti gli amici che mi sono stati vicini durante questo periodo.

Un grazie particolare va a Paolo, amico e compagno, che ha saputo consigliarmi ed incoraggiarmi quando più ne avevo bisogno, ma soprattutto ha saputo sopportare con tanta pazienza anche quei momenti dove nemmeno io sarei voluta stare con me stessa.