

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA**

in  
**Entomologia Agraria**

**Ciclo: XXI**

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: AGR/11**

**LA COMUNICAZIONE CHIMICA IN *BLATTARIA*:  
CONTRIBUTO AL MIGLIORAMENTO DELLA LOTTA**

Dottorando

**DOTT. MATTEO ANACLERIO**

Coordinatore Dottorato

**PROF. PIERO BARONIO**

Relatore

**PROF. FABIO MOLINARI**

**Esame finale anno 2009**

## SOMMARIO

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	III
<b>INTRODUZIONE</b>	1
PREMESSA	2
1. L'ORDINE BLATTARIA	3
2. LE BLATTE SINANTROPICHE PRESENTI IN ITALIA	4
2.1 <i>BLATTELLA GERMANICA</i>	5
2.2 <i>BLATTA ORIENTALIS</i>	6
2.3 <i>PERIPLANETA AMERICANA</i>	7
2.4 <i>SUPELLA LONGIPALPA</i>	8
3. LOTTA ALLE BLATTE	10
3.1 FORMULATI LIQUIDI E SPRAYS	14
3.2 ESCHE	15
3.3 TRAPPOLE ADESIVE	16
3.4 FORMULATI GEL	17
4. RUOLO DEI SEMIOCHIMICI NELLA COMUNICAZIONE FRA INSETTI	19
4.1 FEROMONE SESSUALE	22
4.2 FEROMONE DI AGGREGAZIONE	23
<b>OBIETTIVI GENERALI</b>	29
<b>MATERIALI E METODI GENERALI</b>	31
5. GESTIONE DEGLI ALLEVAMENTI	32
6. RACCOLTA DI MATERIALE FECALE E PREPARAZIONE DI ESTRATTI	37
7. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER IL S.E.M.	39
8. BIOSAGGI IN ARENE	45
9. BIOSAGGI IN OLFATTOMETRO	47
<b>CAPITOLO I.</b> Studio del comportamento riproduttivo e delle preferenze di ovideposizione in <i>Supella longipalpa</i>	54
<b>CAPITOLO II.</b> Osservazioni morfologiche al Microscopio Elettronico a Scansione (S.E.M.): evidenze dei siti di produzione del feromone sessuale in <i>Supella longipalpa</i>	67

<b>CAPITOLO III.</b> Risposte comportamentali di <i>Supella longipalpa</i> nei confronti di sostanze feromoniche e vari attrattivi alimentari	81
<b>CAPITOLO IV.</b> Risposte comportamentali intra- e inter-specifiche delle blatte sinantropiche in Italia nei confronti di estratti fecali	98
<b>CAPITOLO V.</b> Formulati gel per la lotta alle blatte: valutazione di alcuni prodotti presenti in commercio e preparazione di un nuovo gel	117
<b>RISULTATI GENERALI E DISCUSSIONE GLOBALE</b>	139
<b>BIBLIOGRAFIA GENERALE</b>	146

## RIASSUNTO

La gestione delle infestazioni di blatte in ambiente domestico ha subito alcuni cambiamenti negli ultimi anni, giungendo ad un uso predominante di esche rispetto a insetticidi spray, grazie alla consapevolezza del rischio che questi ultimi possono comportare. L'efficacia delle esche è determinata dalle prestazioni collettive di tutti i suoi componenti, che includono ingredienti attivi e inerti, attrattivi alimentari e componenti volatili.

Questa ricerca ha riguardato le risposte comportamentali di blatte sinantropiche presenti in Italia nei confronti di semiochimici e di attrattivi alimentari, ai fini di valutarne una possibile applicazione pratica per contribuire al miglioramento della lotta.

Esemplari di *Supella longipalpa* (F.), scarafaggio in via di diffusione in Italia ma ancora poco conosciuto, sono stati oggetto di studi comportamentali e morfologici. Biosaggi comportamentali con maschi hanno mostrato che i tergiti IV e V femminili sono significativamente più attrattivi di altre regioni del corpo. Pori cuticolari e corrispondenti dotti e strutture ghiandolari (osservati al S.E.M.) sono presenti in gran numero proprio su tali tergiti, suggerendo che siano coinvolti nella produzione e nel rilascio di feromone sessuale.

Le blatte producono un feromone di aggregazione che si ritrova nei loro escrementi ed è costituito da composti volatili e non volatili, principalmente ammine e glicosidi steroidei. È stata valutata l'efficacia di estratti fecali ottenuti da escrementi di *Blattella germanica* (L.), *Blatta*

*orientalis* L., *Periplaneta americana* (L.) e *S. longipalpa*, sia nei confronti di individui conspecifici sia di individui di specie affini, mediante biosaggi effettuati in un olfattometro a “Y”, che hanno dimostrato che estratti fecali ottenuti con metanolo mostrano un buon potere attrattivo intraspecifico e, in alcuni casi determinano risposte comportamentali anche a livello interspecifico.

È stato poi preparato un gel avente caratteristiche fisiche tali da garantire una buona resistenza alla disidratazione, come potenziale base per una nuova esca; al gel sono quindi stati addizionati estratti fecali ottenuti con metanolo da escrementi di *B. germanica* e *S. longipalpa*. Successive prove in arena hanno dimostrato che il nuovo gel contenente estratti fecali è maggiormente attrattivo rispetto ad alcuni formulati gel commerciali utilizzati come confronto: in tempi di 4-5 giorni, è stato infatti l'unico prodotto in grado di attrarre il 100% degli individui immessi nelle arene.

Le sostanze coinvolte nella comunicazione chimica dei *Blattaria* possono quindi essere in grado di incrementare efficacemente l'attrattività di prodotti per il monitoraggio e la lotta alle blatte.

## ABSTRACT

### **CHEMICAL COMMUNICATION IN *BLATTARIA*: CONTRIBUTION TO THE IMPROVEMENT OF THE CONTROL TECHNIQUES**

The management of cockroach infestations in urban environment has undergone some changes in recent years by moving to the predominant use of baits, thanks to the awareness of the risks connected with the use of spray insecticides. The effectiveness of a bait is determined by the collective performance of its components, including active and inert ingredients, the food attractant and any other attractive odour.

This research has focused on the behavioral responses of Italian sinanthropic cockroaches to semiochemicals and food attractants, for the purpose of evaluating a possible practical application and of contributing to the improvement of control techniques.

Behavioral and morphological studies have been carried out on *Supella longipalpa* (F.), a small cockroach that is spreading in Italy.

Behavioral assays showed that the fourth and fifth tergites of females are significantly more attractive than other region of the body. Cuticular pores and ducts ending in glandular structures (observed with a S.E.M. = Scanning Electron Microscope) are present in large number on these tergites, suggesting that they could be involved in the production and the release of sexual pheromone.

Cockroaches produce an aggregation pheromone that is excreted along with their frass and that consists of volatile and non-volatile

compounds, mainly amines and steroidal glycosides. The effectiveness of faecal extracts obtained from excrements of *Blattella germanica* (L.), *Blatta orientalis* L., *Periplaneta americana* (L.) and *S. longipalpa* was evaluated, both at intraspecific and interspecific level, using a "Y" tube olfactometer. Bioassays showed that faecal extracts obtained with methanol have a good intraspecific attractiveness and, in some cases, they showed also interspecific behavioral responses.

A gel was prepared, having physical characteristics that could give a good resistance to dehydration, as a potential basis for a new bait; the gel was then added faecal extracts, obtained with methanol from *B. germanica* and *S. longipalpa* frass. Arena-tests showed that the new gel containing faecal extracts is more attractive than some commercial gel formulations used as comparison: it was the only product that could attract 100% of insects placed in the arenas in 4-5 days.

In conclusion, the substances involved in chemical communication of *Blattaria* may be able to effectively increase the attractiveness of products for monitoring and controlling cockroaches.

# INTRODUZIONE

## INTRODUZIONE

### PREMESSA

Le blatte, comunemente note come “scarafaggi”, sono tra i più importanti insetti infestanti associati alla presenza dell’uomo fin da tempi molto antichi. Il successo degli scarafaggi in ambiente domestico è imputabile soprattutto alla loro biologia e alle loro abitudini: hanno un apparato boccale masticatore e sono pressoché onnivori, in grado di nutrirsi di una grande varietà di sostanze, sia animali sia vegetali.

La presenza di blatte nelle case comporta gravi rischi di natura igienica, anche in caso di modeste infestazioni. Questi insetti possono infatti trasportare una grande varietà di batteri patogeni e di parassiti (Protozoi e Nematodi) (Cornwell, 1968; Rivault *et al.*, 1994). Inoltre possono essere causa di disturbi allergici e asma (Eggleston & Arruda, 2001). Oltre a questi danni di tipo “indiretto”, questi insetti possono arrecare numerosi danni “diretti” come il consumo di alimenti o l’insudiciamento di derrate alimentari con secrezioni ripugnanti. Per questi motivi possono creare gravi problemi di tipo igienico-sanitario in ambienti domestici, industrie alimentari, mense, asili, ristoranti, ospedali ecc..

## 1. L'ORDINE *BLATTARIA*

L'Ordine *Blattaria* comprende circa 3000 specie, terrestri, per la maggior parte tropicali o subtropicali, di varie dimensioni, caratterizzate da corpo appiattito di colore generalmente bruno o scuro.

Il capo dei blattodei è mobile, gli occhi sono solitamente ben sviluppati e di norma sono presenti anche due ocelli; le antenne sono filiformi multiarticolate, lunghe anche più della lunghezza del corpo. L'apparato boccale di questi insetti è di tipo masticatore tipico. Il pronoto è di forma discoidale, ampio e ricopre in parte il capo; meso e metatorace sono più piccoli del protorace. Le zampe sono di tipo cursorio, infatti questi insetti sono in grado di spostarsi velocemente e inoltre, grazie alle due unghie e all'arolio costituenti il pretarso, sono spesso in grado di arrampicarsi su superfici pressoché lisce. Le blatte possono essere alate, attere o subattere e talvolta si registrano al riguardo differenze tra maschi e femmine della stessa specie. Le ali sono membranose e quelle anteriori sono solitamente più sclerificate di quelle posteriori. Solo poche specie sono capaci di volare in modo attivo. L'addome è sessile, composto da 11 uriti, l'ultimo dei quali è di ridotte dimensioni; sono presenti 2 cerci.

Lo sviluppo postembrionale è di tipo eterometabolico (paurometabolico, o pseudometabolico nelle forme attere); la riproduzione è sessuata ma non sono rari casi di partenogenesi. Le blatte possono essere ovipare, vivipare od ovovivipare. Nelle specie ovipare le uova sono contenute in un involucro prodotto dalle ghiandole colleteriche che prende il nome di ooteca; qui le uova sono disposte verticalmente, in file parallele ed in numero costante per una determinata specie. Solitamente le ooteche sono abbandonate o deposte poco dopo la formazione, ma in alcuni casi, come in

*Blattella germanica* (Linnaeus), vengono trasportate dalla femmina fino al momento della schiusa.

Il regime alimentare delle blatte è prevalentemente fitofago, talvolta zoofago o xilofago. Le specie associate alla presenza dell'uomo sono pressoché onnivore e in casi di elevate infestazioni si registrano facilmente fenomeni di cannibalismo. Si tratta di insetti per lo più lucifughi, attivi soprattutto al crepuscolo o nelle ore notturne.

## 2. LE BLATTE SINANTROPICHE PRESENTI IN ITALIA

In Italia le specie che più frequentemente si rinvencono nelle case sono *Blattella germanica* e *Blatta orientalis* Linnaeus, sebbene anche altre due specie (*Periplaneta americana* (Linnaeus) e *Supella longipalpa* (Fabricius)) siano in via di diffusione. Nell'Italia meridionale è presente inoltre una quinta specie, *Polyphaga aegyptiaca* (Linnaeus) che occasionalmente viene segnalata come infestante; un'ulteriore specie, *Periplaneta australasiae* (Fabricius) è stata segnalata nel 2001 a Milano (Pilon, 2004).

SPECIE	CARATTERISTICHE		
	<i>lunghezza adulto (mm)</i>	<i>colore</i>	<i>ooteca (mm)</i>
<i>Blatta orientalis</i>	20-25	bruno scuro	10-12
<i>Blattella germanica</i>	10-15	giallo-bruno con strisce bruno-neri sul pronoto	7-9
<i>Supella longipalpa</i>	10-12	giallognolo rossastro	5
<i>Periplaneta americana</i>	35-50	rosso ferrugineo	8-10

Tabella 1 - Alcune caratteristiche delle blatte più diffuse in Italia.

### 2.1. *BLATTELLA GERMANICA* (LINNAEUS) (NOME COMUNE: BLATTELLA)

È lo scarafaggio maggiormente diffuso a livello mondiale; si rinviene quasi sempre all'interno degli edifici ed è generalmente associato ad ambienti con elevata umidità, come cucine e bagni.

Il colore è bruno-giallastro, con due strisce longitudinali scure sul pronoto. Entrambi i sessi possiedono ali ben sviluppate, pur non essendo in grado di volare; nel maschio le ali ricoprono interamente l'addome (fig. 1).



Figura 1 - Maschio di *Blattella germanica*.

Questa specie ha la capacità di arrampicarsi con facilità su qualsiasi superficie, anche su pareti lisce e verticali, grazie a particolari strutture presenti nelle zampe. Il pretarso presenta l'arolio, una struttura a forma di lobo, disposto fra le unghie; queste ultime permettono l'adesione a superfici scabre, mentre l'arolio è usato a guisa di ventosa facendo aderire l'insetto a superfici lisce, come ad esempio il vetro.

La femmina, nella sua vita, produce da 4 a 8 ooteche contenenti 30-40 uova, che trasporta fino alla schiusa, la quale, in condizioni microclimatiche favorevoli avviene entro 15-20 giorni. Lo sviluppo postembrionale è, a 30 °C, di circa 40 giorni.

## 2.2. *BLATTA ORIENTALIS* LINNAEUS (NOME COMUNE: BLATTA NERA)

Si può trovare all'esterno degli edifici ma spesso colonizza gli ambienti domestici in cerca di rifugio, soprattutto nei mesi freddi. Infesta frequentemente cantine, magazzini e altri luoghi freschi e umidi, annidandosi vicino agli scarichi fognari o dietro le tubazioni. A differenza di *B. germanica* non possiede la capacità di arrampicarsi su pareti lisce.

È di colore bruno nerastro lucente, il corpo è robusto e le antenne sono corte. Il maschio adulto presenta ali ben sviluppate (lunghe circa i 3/4 dell'addome) (fig. 2), mentre la femmina adulta ha solo due brevi abbozzi alari. La femmina trasporta l'ooteca per uno o due giorni, dopodiché la deposita; può produrre circa 8 ooteche contenenti 12-20 uova.



Figura 2 - Maschio di *Blatta orientalis*.

Il suo regime alimentare include sostanze di vario genere, tra cui insetti morti, piccoli molluschi, animali morti, escrementi di uccelli o sostanze di origine vegetale. Le blatte nere non sono territoriali ma possono vagare per lunghi tratti in cerca di cibo. Si rinvencono tipicamente nei centri storici e nei vecchi edifici ma si diffondono rapidamente colonizzando le periferie.

### 2.3. *PERIPLANETA AMERICANA* (LINNAEUS) (NOME COMUNE: BLATTA ROSSA)

Questo scarafaggio, tipico delle città di mare e diffuso prevalentemente in Italia centrale e meridionale, predilige condizioni di elevate temperatura e umidità; in ambiente urbano si può insediare, anche con popolazioni numerose, in sistemi fognari e in condotti di aerazione ma si annida anche all'interno di edifici, attorno ai tubi dei bagni e in luoghi dove si conservano derrate alimentari.



Figura 3 - Maschio di *Periplaneta americana*.

Di colore rossastro ferrugineo, le blatte rosse sono gli scarafaggi di maggiori dimensioni presenti in Italia (fino a 5 cm). Entrambi i sessi presentano ali ben sviluppate (nel maschio più lunghe dell'addome (fig. 3), nella femmina di pari lunghezza) che permettono di compiere brevi voli.

Le ooteche sono di color bruno scuro, sono lunghe circa 8 mm e contengono 14-16 uova. Le uova schiudono in circa due mesi e la maturità è raggiunta in circa 6 mesi. La femmina può produrre 12-14 ooteche e il potenziale infestante della specie è piuttosto elevato.

Le blatte rosse sono onnivore e si cibano di qualsiasi substrato organico, sono particolarmente ghiotte di liquidi fermentati, e sono state rinvenute anche in bottiglie di birra semivuote. Sono buone arrampicatrici e, dalle fognature, possono giungere all'interno di bagni o cucine tramite i tubi di scarico.

#### 2.4. *SUPELLA LONGIPALPA* (FABRICIUS) (NOME COMUNE: BLATTA DEI MOBILI)

Questo piccolo scarafaggio introdotto in Italia in tempi recenti (Arzone, 1979), è meno diffuso della blattella, con la quale viene spesso confuso; a differenza di *B. germanica*, non presenta macchie brune longitudinali sul pronoto, il colore del corpo è giallognolo-rossastro e le antenne sono lunghe circa una volta e mezzo il corpo. Le ooteche contengono 14-18 uova, e vengono incollate sotto mobili, dietro cornici, pareti e soffitti. Una femmina depone circa 14 ooteche nel corso della sua vita. Le ali sono presenti in entrambi i sessi ma sono più sviluppate nei maschi (fig. 4) che, se disturbati, possono compiere brevi voli.



Figura 4 - Maschio di *Supella longipalpa*.

A causa della lunghezza del suo ciclo di sviluppo (oltre 9 mesi (Mallis, 1990)), il potenziale di infestazione è minore rispetto a *B. germanica*. Questa specie predilige temperature abbastanza alte e vive e cresce anche in luoghi con scarsa umidità (Melton, 1995), motivo per cui può essere rinvenuta, oltre che in bagni e cucine, anche in qualsiasi altra stanza di un appartamento. Aggregazioni di individui si trovano spesso a media altezza, dietro scaffali, mensole, quadri, vicino ai motori degli elettrodomestici, a macchine da caffè, timer e televisori.

Come *B. germanica* è originaria dell’Africa, ma già dai primi del ‘900 è stata accidentalmente introdotta nelle aree meridionali degli Stati Uniti e ora in alcune regioni ha sostituito la blattella come insetto infestante predominante nelle abitazioni (Robinson, 1996).

### **3. LOTTA ALLE BLATTE**

Gli scarafaggi si insediano con successo negli ambienti domestici perché vi possono trovare facilmente adeguate quantità di acqua, cibo e nascondigli e condizioni microclimatiche favorevoli al loro sviluppo. Le tipologie di ambienti infestati sono le più diverse comprendendo abitazioni e uffici, mense, fast food, ospedali, scuole e asili, ristoranti e bar, nonché industrie alimentari e magazzini di conservazione e stagionatura di cibi.

L'eliminazione o la riduzione dei fattori che possono favorire l'insediamento delle blatte è indubbiamente un'efficace misura di prevenzione delle infestazioni.

L'aumento delle preoccupazioni per la salute umana legate all'impiego di insetticidi negli ambienti domestici o civili/pubblici, ha stimolato l'uso di strategie di gestione delle infestazioni che possono essere integrate fra loro per ridurre il carico di prodotti chimici e i rischi di insorgenza di fenomeni di resistenza negli insetti bersaglio dei trattamenti: queste strategie sono conosciute come IPM (integrated pest management). Una corretta e moderna strategia di lotta alle blatte deve comprendere tre distinte fasi: la prevenzione, la lotta diretta e il monitoraggio, volto a mantenere la situazione sotto controllo.

La prevenzione consiste nell'eliminare o ridurre significativamente tutti i fattori che possono favorire l'insediamento di questi insetti e la loro moltiplicazione, ed è di fondamentale importanza nel controllo delle infestazioni.

Innanzitutto è necessario mettere in pratica tutti gli accorgimenti necessari per evitare che le blatte possano penetrare e quindi insediarsi negli edifici, utilizzando ad esempio come vie di accesso le condotte e le canalette degli impianti elettrici, di riscaldamento e/o di raffreddamento, in special

modo in muri comunicanti con altri edifici; attenzione particolare deve anche essere posta verso scarichi di acque di lavaggio e scarichi delle acque nere. Ovviamente costituisce un rischio anche la presenza di fessure in porte e finestre e di crepe e fessure nelle strutture murarie. Il ridotto spessore del corpo delle blatte e la loro capacità di attraversare anche tratti di tubature rendono molto difficile isolare un ambiente o renderlo per loro inaccessibile.

I punti critici da tenere costantemente sotto controllo per attuare adeguate misure preventive sono costituiti da: pavimentazioni e rivestimenti murari con presenza di piastrelle scollate, fessurate o rotte; griglie o tombini di scolo in particolare se danneggiati; presenza di materiali termo-isolanti che possono andare incontro a usura o scollamenti; cappe di aspirazione; presenza di controsoffittature non ispezionabili, pareti perlineate o ricoperte e presenza di strutture in cartongesso, sempre sconsigliate in locali ad uso cucina, mensa o dispensa. Ovunque si riscontrino situazioni di deterioramento o danneggiamento è necessario programmare i relativi interventi di pulizia, manutenzione o sostituzione. È opportuno anche provvedere alla rimozione di impianti o strutture in disuso o non strettamente necessari.

L'eliminazione dell'accesso a fonti di acqua porterebbe ad un effetto significativo ma è spesso difficile da attuare: si pensi a rubinetti, tubi e scoli presenti nei bagni e nelle cucine, nonché a scolapiatti, frigoriferi, a varie attrezzature industriali ecc..

Le blatte possono nutrirsi di un'abbondante varietà di sostanze. Ne consegue che è di fondamentale importanza, per prevenire l'insediamento e l'espansione di una popolazione di scarafaggi, provvedere ad un'adeguata pulizia di tutti i locali. Infatti sporcizia, briciole, residui della lavorazione di prodotti alimentari possono fungere da richiamo per insetti in cerca di cibo.

Una particolare attenzione va posta ai rifiuti organici: la presenza e il deposito per tempi prolungati di rifiuti e immondizie varie può rappresentare un grave problema portando in breve tempo alla formazione di focolai di infestazione di varie specie di blatte. È per questo motivo indispensabile che i rifiuti siano allontanati dalle aree urbane ed eliminati al più presto. Ne sono dimostrazione le vicende riguardanti l'emergenza rifiuti in Campania del 2008, dove la scorretta gestione dei rifiuti ha rapidamente determinato gravi problemi di infestazioni di blatte (oltre che di ratti).

Altri fattori che possono facilitare l'ingresso di scarafaggi negli edifici e a cui è necessario prestare grande attenzione sono ad esempio l'introduzione in un ambiente pulito di scatoloni, cartoni o imballaggi, che sono spesso scelti dalle blatte come punti di riparo, oppure l'introduzione in un locale di stagionatura di derrate già infestate.

Qualora le misure preventive non fossero risultate sufficienti e si sia in presenza di infestazioni, diviene necessario attuare interventi di lotta diretta che comprendono l'impiego di prodotti insetticidi.

Ogni intervento di disinfestazione deve essere condotto in modo tale che i formulati impiegati e gli eventuali residui negli ambienti ove sono stati applicati non costituiscano pericolo. Qualora si operi con trattamenti convenzionali, che prevedono cioè l'impiego di formulati liquidi o spray, è opportuno privilegiare l'impiego di attrezzature in cui l'erogazione dell'insetticida sia sempre controllabile in termini di direzione e quantità; si privilegia a tale scopo l'utilizzo di pompe manuali a bassa pressione e di nebulizzatori elettrici a flusso variabile, con i quali è possibile controllare l'entità della dispersione dell'insetticida (a differenza di quanto avviene se si utilizzano pompe ad alta pressione).

Le tipologie di intervento di lotta chimica contro le blatte si possono riassumere nei tre modi di seguito descritti:

- a) Trattamento delle superfici di probabile transito con prodotti in grado di persistere per un discreto periodo di tempo; in questo caso l'insetto entra in contatto con l'insetticida camminando sulle superfici trattate (Zhai & Robinson, 1990). Si tratta di un'applicazione convenzionale, la cui buona riuscita è talvolta compromessa dall'esecuzione di lavaggi delle superfici particolarmente intensi (ad esempio con idropulitrice). Buoni risultati possono essere ottenuti con l'impiego di formulati microincapsulati.
- b) "Crack and crevice treatment", letteralmente: trattamento di crepe e fessure, ossia applicazione di insetticida, con idonee attrezzature, in anfratti che si ritiene possano fungere da riparo/nido per le blatte. In questo caso vengono impiegati anche prodotti con effetto "snidante" ovvero in grado di provocare una rapida reazione da parte degli insetti che escono allo scoperto nel tentativo di fuggire. Questo metodo può portare a buoni risultati con una dispersione relativamente modesta di principio attivo nell'ambiente, ma richiede una grande esperienza nell'individuazione dei punti da trattare.
- c) Trattamento mediante esche. Si tratta di prodotti costituiti da un'esca alimentare e da un insetticida attivo per ingestione, anche in minime quantità (Koehler *et al.*, 1991; Pospichil *et al.*, 1999). Questo metodo presenta alcuni indubbi vantaggi rispetto alle applicazioni tradizionali ma, anche in questo caso, non deve essere sottovalutata la capacità dell'operatore nel collocare l'esca avvelenata.

In caso di infestazioni molto elevate questi tipi di trattamenti possono essere combinati fra loro per ottenere migliori risultati.

Per dovere di cronaca si ricorda che sono stati studiati anche sistemi di lotta biologica nei confronti delle blatte, ad esempio con Imenotteri Calcidoidei che parassitizzano le ooteche (Slater *et al.*, 1980) o con Nematodi (Koehler *et al.*, 1992). È però ovvio che si tratta solo di

metodologie sperimentali che non hanno alcuna applicabilità in ambiente domestico.

Ultimo, ma non per importanza, aspetto della lotta è il monitoraggio, che ha la duplice funzione di accertare (e quantificare) la presenza di infestanti prima di un'azione di controllo e di verificarne i risultati poi.

Nei locali sottoposti ad intervento e in quelli immediatamente confinanti è opportuno allestire una rete di monitoraggio per valutare l'efficacia del trattamento tramite la collocazione di trappole a fondo adesivo innescate con un attrattivo alimentare o feromonico. Solitamente, a distanza di circa 15 giorni dall'esecuzione dell'intervento si procede ad un'ispezione delle trappole per rilevare le eventuali catture e poter così valutare il perdurare o meno dell'infestazione.

Il monitoraggio consente anche di rendersi conto del verificarsi di una possibile reinfestazione e programmare l'esecuzione delle azioni necessarie per il controllo.

L'IPM garantisce ottimi risultati se le strategie che compongono questo modo di gestire le infestazioni sono applicate correttamente, anche se i costi possono essere elevati (Miller & Meek, 2004).

### 3.1. FORMULATI LIQUIDI E SPRAYS

È da premettere che i trattamenti chimici con formulati liquidi o con sprays, sebbene siano spesso efficaci, non sono sempre effettuabili; si pensi ad esempio a locali in cui sono presenti prodotti alimentari di difficile movimentazione (come magazzini di stagionatura di salumi o formaggi) oppure a reparti di lavorazione e manipolazione di cibi in aziende con produzione continua. Inoltre si deve considerare il rischio nei confronti di persone, in particolar modo bambini, qualora si decida di impiegare prodotti ad azione residuale, che perdura cioè nel tempo.

In ambienti infestati i trattamenti tradizionali prevedono l'impiego di insetticidi formulati liquidi ad elevato potere abbattente distribuiti direttamente sulle superfici frequentate dagli insetti e altresì di insetticidi ad azione residuale su superfici dove probabilmente passano gli insetti nei loro spostamenti in cerca di cibo e acqua; i prodotti residuali mantengono la loro efficacia per settimane dopo la distribuzione (Locatelli, 1984).

I prodotti blatticidi tradizionali ad attività residuale attualmente più impiegati sono chlorpiriphos, diazinone, bendiocarb, propoxur, deltametrina e cipermetrina (Süss & Locatelli, 2001). Sono disponibili anche piretrine sotto forma di formulati microincapsulati, in grado di aumentarne la persistenza d'azione.

L'utilizzo di insetticidi per la lotta alle blatte è efficace soprattutto se vengono scelti con cura i punti in cui distribuire il prodotto: particolarmente utile risulta l'intervento con irrorazioni in crepe, intercapedini e fessure, anche molto piccole, nelle quali spesso le blatte si annidano. Oltre a questi, altri punti dove facilmente gli scarafaggi si nascondono sono gli stipiti delle porte, i lavelli e i sanitari e altri punti dove si può formare condensa, gli spazi adiacenti a tavole o strutture in legno e gli scarichi fognari.

### 3.2. ESCHE

Sono disponibili in commercio diverse tipologie di esche: si tratta di prodotti con azione attrattiva (dovuta a ingredienti di tipo alimentare o feromonico) generalmente posti all'interno di astucci di plastica (fig. 5) o cartone, che ne evitano l'eventuale contatto con persone o animali domestici. L'esca contiene al suo interno un principio attivo insetticida ad azione non fortemente abbattente: l'insetto cioè non muore appena ha consumato il prodotto ma soltanto alcune ore più tardi, dopo essere tornato nel proprio rifugio. Poiché un tipico comportamento degli scarafaggi è quello di nutrirsi

dei cadaveri (Le Patourelle, 2000) e degli escrementi di altri individui della propria specie, anche le blatte che non sono venute a diretto contatto con l'esca in questo modo la assumono e muoiono creando un effetto "a cascata" che prolunga l'attività dell'insetticida. È tanto più probabile che le blatte trovino l'esca quanto più essa è posta vicino al loro rifugio (Albertazzi, 1996).

### 3.3. TRAPPOLE ADESIVE

Si tratta di trappole di cartone o materiale plastico aventi il fondo ricoperto da collante (fig. 6). Sono usualmente innescate con un attrattivo alimentare o feromonico in forma di pastiglia o di erogatore in gomma o feltro impregnati di sostanze odorose. Gli insetti attirati all'interno della trappola rimangono invischiati nel fondo adesivo e muoiono; inoltre, poiché le blatte emettono un feromone in grado di determinare aggregazione di individui e, come già menzionato, hanno l'abitudine di cibarsi anche di insetti conspecifici morti, la stessa presenza di insetti già catturati all'interno della trappola può ulteriormente incrementarne l'efficacia (tuttavia in alcuni casi la presenza di insetti già catturati sembra non esercitare né attrazione né repellenza (Appel, 1998)).

Queste trappole sono generalmente impiegate per lo più a scopo di monitoraggio, ma in caso di lievi infestazioni possono anche diventare un discreto mezzo di lotta (Kaakeh & Bennet, 1997a, 1997b). La corretta collocazione delle trappole in punti di passaggio delle blatte o nelle vicinanze di probabili punti di rifugio ha una grande influenza sulle catture. Anche il materiale e la forma della trappole possono influire significativamente sulle catture (Phillips & Wyatt, 1992).



Figura 5 - Trappola contenente esca insetticida.



Figura 6 - Trappola in cartone con il fondo adesivo.

#### 3.4. FORMULATI GEL

Come per le convenzionali esche insetticide l'utilizzo di formulati gel prevede, a differenza delle altre forme di lotta, che siano le blatte a trovare attivamente e consumare il prodotto. Ciò è sostanzialmente molto differente rispetto a quanto avviene con prodotti spray e liquidi, dove l'insetto semplicemente percorre o sosta nelle zone trattate con l'insetticida. Pertanto, sebbene l'efficacia del principio attivo e la sua eventuale repellenza siano fattori molto importanti che influiscono sulla performance di un'esca o di un formulato gel, il potere attrattivo delle sostanze presenti nella base del formulato ha un'importanza ancora maggiore (Lee, 2002).

L'utilizzo di prodotti formulati in gel consente di diminuire le quantità di principio attivo insetticida applicato nell'ambiente, evitando anche gli effetti secondari di repellenza caratteristici di alcuni piretroidi o la presenza nell'ambiente trattato di odori sgradevoli e persistenti causati dall'impiego di formulati in emulsione concentrata (e pertanto ricchi di solventi). Si tratta per lo più di insetticidi inodori, come ad esempio il fipronil (Srinivasan *et*

al., 2005) che vengono incorporati in una base di gel alimentare, spesso resa particolarmente appetibile con l'aggiunta di altri attrattivi.

I formulati gel vengono applicati in forma di gocce mediante una pistola dosatrice di precisione (figg. 5, 6, 7): la cartuccia contenente il prodotto viene innestata e il gel viene dispensato con l'ausilio di numerosi accessori (puntali in plastica o acciaio inox, prolunghe, illuminatore) che permettono di raggiungere facilmente anche punti nascosti e di deporre il gel stesso in fessure o crepe sottili.

Il trattamento può essere effettuato con sicurezza anche in presenza di persone e animali domestici.



Figura 5 - Valigetta con pistola dosatrice e accessori.



Figura 6 - Pistola con cartuccia innestata.



Figura 7 - Utilizzo della pistola per raggiungere punti difficili.

#### 4. RUOLO DEI SEMIOCHIMICI NELLA COMUNICAZIONE FRA INSETTI

I sistemi di comunicazione fra insetti comprendono stimoli visivi, sonori (come in grilli e cicale) e i cosiddetti “semiochimici” (dal greco *semeion* = messaggio). Questi segnali di tipo chimico servono per regolare la comunicazione fra individui e per indurre determinate reazioni nei confronti dell’ambiente.

Negli anni passati le metodologie impiegate per valutare le risposte a stimoli esterni prevedevano semplicemente l’applicazione dello stimolo e la valutazione visiva della risposta, osservando se l’insetto si muoveva verso lo stimolo o si allontanava da esso. Oggi questo tipo di studi può invece essere condotto con moderne tecniche elettrofisiologiche che valutano direttamente sul sistema nervoso dell’insetto la risposta allo stimolo.

*Fotorecettori*: il più importante organo di senso verso stimoli luminosi è costituito dagli occhi composti, che nelle blatte, come avviene anche in altri insetti, garantiscono una vista ad ampio angolo. Tuttavia le blatte rifuggono la luce e mostrano preferenza per luoghi scuri e bui di giorno, entrando in attività prevalentemente di sera.

*Recettori di contatto*: il “tatto” è un senso particolarmente importante per le blatte. Sulle antenne sono presenti numerosi sensilli di tipo meccanorecettore tattile; strutture simili, ma più grandi, sono presenti sulle zampe e sul corpo e appaiono come spine. Tutte queste strutture cuticolari sono rinnovate ad ogni muta. Altri recettori di contatto che hanno una grande importanza sono localizzati sui palpi mascellari; è infatti molto facile vedere una blatta che “esplora” tramite i palpi una sostanza con cui viene a contatto.

*Recettori sonori*: insetti come grilli e cicale, per i quali la comunicazione sonora ha grande rilevanza, hanno organi ben sviluppati sia per la produzione di suoni sia per la ricezione. Poiché i suoni determinano

movimenti dell'aria e variazioni di pressione, negli insetti privi di organi timpanici complessi sono sensilli tricoidei a registrarli. Nelle blatte, i cerci sono particolarmente ricchi di questo tipo di recettori. In realtà è difficile distinguere gli organi che rispondono a vibrazioni da quelli che percepiscono suoni, poiché che il meccanismo di percezione è identico.

*Chemiorecettori*: la percezione di sostanze chimiche volatili è assai importante per gli insetti in quanto permette sia di trovare e scegliere il cibo, rispondendo anche alle variazioni di concentrazione di stimoli olfattivi (Hinterwirth *et al.*, 2004), sia di percepire vari semiochimici, messaggeri fondamentali per la comunicazione fra individui. Nelle blatte, chemiorecettori sono distribuiti su cerci, tarsi o altre parti delle zampe, oltre a palpi labiali e mascellari, labbro, ipofaringe e antenne (Ramaswamy & Gupta, 1981); i sensilli presenti sulle parti boccali sono anche responsabili del senso del “gusto”.

Si deve ricordare che la numerosità e la disposizione dei sensilli varia anche all'interno della medesima specie, in particolare ci possono essere notevoli differenze tra maschi e femmine, come nel caso dei sensilli presenti sui palpi mascellari in *S. longipalpa* (Prakash *et al.*, 1995).

Tra i semiochimici, i più diffusi in natura e i più studiati sono i feromoni, sostanze emesse da un soggetto e che diffuse nell'ambiente e percepite da un altro individuo stimolano in quest'ultimo un tipico comportamento. Con il termine “feromoni” si intendono quei semiochimici che permettono la comunicazione fra individui della stessa specie, mentre tra quelli che riguardano la comunicazione tra specie differenti, gli “allomoni” favoriscono chi li emette, i “cairomoni” favoriscono chi li riceve (sono ad esempio utilizzati dai parassitoidi per individuare gli ospiti o recepiti da insetti ma emessi da specie vegetali) e i “sinomoni” sono vantaggiosi sia per la specie che li emette sia per quella che li riceve.

Solitamente i feromoni sono prodotti da cellule epidermiche modificate oppure da ghiandole di origine epidermica, talvolta munite di un apposito dotto per la secrezione. In alcuni casi poi, accade che vengano prodotti da organi che hanno una differente funzione primaria, come avviene ad esempio da parte delle pareti del tubo digerente nei *Blattaria* (Domenichini & Croveti, 1989).

I feromoni possono essere distinti in due grandi categorie: quelli aggreganti e quelli disperdenti; i primi inducono avvicinamento alla fonte che li ha emessi, i secondi inducono allontanamento.

Tra i feromoni aggreganti sono da ricordare i feromoni sessuali che, emessi da individui di un sesso hanno funzione attrattiva nei confronti di individui di sesso opposto, i feromoni afrodisiaci che hanno funzione simile ai precedenti, i feromoni traccia emessi ad esempio dalle formiche e in certi casi dalle ghiandole sternali delle blatte (Krivosheina & Shatov, 1995a, 1995b), i feromoni di coesione di una famiglia fra cui il feromone prodotto dall'ape regina, i feromoni di aggregazione, tra cui quelli delle blatte, che inducono un comportamento aggregativo in individui di sesso ed età differente, i feromoni gregarizzanti che possono portare alcuni insetti come le locuste dalla forma solitaria a quella gregaria e i feromoni di allarme di alcuni insetti sociali in grado di difendersi, come api e vespe, che inducono atteggiamento di aggressività nei confronti di una minaccia per la colonia.

Tra quelli disperdenti invece è opportuno ricordare i feromoni di allarme di insetti che non sono in grado di difendersi come gli afidi, che se minacciati da un predatore o disturbati emettono una sostanza che provoca la fuga e la dispersione dell'aggregazione di individui, i feromoni territoriali di alcuni insetti sociali che fanno sì che i nidi di insetti conspecifici siano a debita distanza, i feromoni antiaggreganti emessi da alcuni Coleotteri per evitare un numero eccessivo di insetti su una stessa fonte di nutrimento, i

feromoni deterrenti emessi ad esempio da alcuni Ditteri per evitare che venga deposto più di un uovo su uno stesso frutto e i feromoni antiafrodisiaci emessi da alcuni Coleotteri per evitare che le femmine con cui si sono accoppiati si accoppino nuovamente con altri maschi.

#### 4.1. FEROMONE SESSUALE

Quello che viene comunemente indicato con il termine “feromone sessuale” è in realtà una complessa miscela di composti chimici (a volte solo due ma spesso più di dieci (Chapman, 1998)), denominata anche *bouquet*, caratteristica per ogni specie. In questo *bouquet* di sostanze è presente una molecola principale che è responsabile del potere attrattivo, unitamente ad alcune altre molecole accessorie, sovente degli isomeri della prima, che contribuiscono a “completare” la miscela: ci sono sostanze che coadiuvano la molecola principale ad esempio aumentandone l’efficacia, oppure possono essere presenti anche componenti con effetto inibitorio verso specie affini a quella che li emette, oppure sostanze ad effetto eccitante o arrestante che agiscono a breve distanza favorendo l’accoppiamento una volta richiamato a sé il partner (Eliyahu *et al.*, 2004).

I feromoni sessuali sono in molte specie di insetti rilasciati dalle femmine per attrarre, anche da notevoli distanze, i maschi conspecifici (Abed *et al.*, 1993). Gli attrattivi sessuali volatili di numerose specie di insetti sono stati identificati chimicamente e talvolta sintetizzati, fornendo così un interessante strumento per il controllo delle infestazioni; infatti quantità ridotte di queste sostanze possono essere applicate ottenendo buoni risultati con varie modalità, come ad esempio per la cattura massale, per il monitoraggio, per il metodo della confusione sessuale ecc..

I componenti principali dei feromoni sessuali di alcune specie di blatte sono noti già da tempo: il periplanone-B, componente primario del

feromone sessuale di *P. americana*, è stato isolato ed è conosciuta anche la configurazione chimica (Adams *et al.*, 1979; Persoons *et al.*, 1981; Nishino *et al.*, 1982); il feromone sessuale di *B. germanica* è stato oggetto di studio negli anni '70 (Nishida *et al.*, 1976a, 1976b) ed è stato identificato in studi recenti (Nojima *et al.*, 2005) e, infine, anche il feromone sessuale di *B. orientalis* fu studiato da Warthen *et al.*(1983).

#### 4.2. FEROMONE DI AGGREGAZIONE

Come è già stato descritto poco sopra, tra i feromoni cosiddetti aggreganti, vi è un feromone in grado di determinare comportamenti aggregativi in un gran numero di individui della stessa specie, siano essi maschi o femmine, adulti o stadi giovanili: si tratta del feromone di aggregazione. Limitatamente a quanto riguarda i *Blattaria*, il feromone di aggregazione è prodotto nelle papille rettali ed è escreto con le feci; si tratta di una miscela di composti chimici volatili e non volatili che agiscono simultaneamente per attrarre altri individui e ne arrestano i movimenti una volta avvenuto il contatto con la fonte del feromone stesso. I componenti principali di tale feromone sono: ammoniaca, metilammine, dimetilammine e trimetilammine (Sakuma & Fukami, 1990).

#### **BIBLIOGRAFIA**

- ABED D., BROSSUT R., FARINE J-P., 1993 – Evidence for sex pheromones produced by males and females in *Blatta orientalis* (Dictyoptera, Blattidae). – *Journal of Chemical Ecology*, 19(12): 2831-2853.
- ADAMS M.A., NAKANISHI K., STILL W.C., ARNOLD E.V., CLARDY J., PERSOONS C.J., 1979 – Sex pheromone of the American cockroach:

- absolute configuration of Periplanone-B. – *Journal of American Chemical Society*, 101:2495-2498.
- ALBERTAZZI G., 1996 – Esche insetticide e trappole a feromoni per il controllo della *Blattella germanica*. – *Disinfestazione*, Luglio-Agosto 1996: 37-38.
- APPEL A.G., 1998 – Daily pattern of trap-catch of German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) in kitchens. – *Journal of Economic Entomology*, 91(5): 1136-1141.
- ARZONE A., 1979 – Nuova blatta delle derrate alimentari in Italia - *Atti del II Simposio su “La difesa antiparassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti”*, Piacenza 28-30.IX.1977, Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Piacenza: 367-371.
- CHAPMAN R.F., 1998 – *The Insects, Structure and Function*. – Cambridge University Press, Cambridge.
- CORNWELL P.B., 1968 – *The cockroach*. – Ed. Hutchinson & Co LTD, London.
- DOMENICHINI G., CROVETTI A., 1989 – *Entomologia urbana e sanità ambientale*. – Ed. UTET, Torino.
- EGGLESTON P.A., ARRUDA L.K., 2001 – Ecology and elimination of cockroaches and allergens in the home. – *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(3 Supplement): s422-s429.
- ELIYAHU D., MORI K., TAKIKAWA H., LEAL W.S., SCHAL C., 2004 – Behavioural activity of stereoisomers and a new component of the contact sex pheromone of female German cockroach, *Blattella germanica*. – *Journal of Chemical Ecology*, 30(9): 1839-1848.
- HINTERWIRTH A., ZEINER R., TICHY H., 2004 – Olfactory receptor cells on the cockroach antennae: responses to the direction and rate of change in food odour concentration. – *European Journal of Neuroscience*, 19: 3389-3392.

- KAAKEH W., BENNETT G.W., 1997a – Evaluation of commercial sticky traps used for German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Agriculture Entomology*, 14(3): 349-353.
- KAAKEH W., BENNETT G.W., 1997b – Evaluation of trapping and vacuuming compared with low-impact insecticide tactics for managing German Cockroaches in residence. – *Journal of Economic Entomology*, 90(4): 976-982.
- KOEHLER P.G., ATKINSON T.H., PATTERSON R.S., 1991 – Toxicity of Abamectin to Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae). – *Journal of Economic Entomology*, 84(6): 1758-1762.
- KOEHLER P.G., PATTERSON R.S., MARTIN W.R., 1992 – Susceptibility of Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae) to infection by *Steinernema carpocapsae*. – *Journal of Economic Entomology*, 85(4) 1184-1187.
- KRIVOSHEINA G.G., SHATOV K.S., 1995a – Function of the cockroach (*Blattidae*) sternal gland. – *Pheromones*, 5(1-2): 3-12.
- KRIVOSHEINA G.G., SHATOV K.S., 1995b – Specificity of cockroach trail pheromones. – *Pheromones*, 5(1-2): 13-22.
- LEE D.K., 2002 – Evaluation on the lethal, choice and secondary effects of four insecticidal baits against the German cockroach (Blattaria: Blattellidae). – *Korean Journal of Entomology*, 32(2): 107-112.
- LE PATOUREL G., 2000 – Secondary transmission of fipronil toxicity between Oriental cockroaches *Blatta orientalis* L. in arenas. – *Pest Management Science*, 56: 732-736.
- LOCATELLI D.P., 1984 – Valutazione dell'efficacia di alcuni principi attivi ad attività blatticida - *Atti del III Simposio su "La difesa antiparassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti"*, Piacenza 22-24.IX.1982, Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Piacenza: 243-248.
- MALLIS A., 1990 – Handbook of pest control, Ed. Franzak & Foster Co., Cleveland. – Ohio.

- MELTON R.H., 1995 – Differential adaptation to water deprivation in first-instar nymphs of the German cockroach (*Blattella germanica*) and the brown-banded cockroach (*Supella longipalpa*). – *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 77(1): 61-68.
- MILLER D.M., MEEK F., 2004 – Cost and efficacy comparison of integrated pest management strategies with monthly spray insecticide applications for German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control in public housing. – *Journal of Economic Entomology*, 97(2): 559-569.
- NISHIDA R., KUWAHARA Y., FUKAMI H., ISHII S., 1976a – Female sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: Blattellidae), responsible for male wing-raising. II. 29-hydroxy-3,11-dimethyl-2-nonacosanone. – *Journal of Chemical Ecology*, 2: 449-455.
- NISHIDA R., SATO T., KUWAHARA Y., FUKAMI H., ISHII S., 1976b – Female sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: Blattellidae), responsible for male wing-raising. IV The absolute configuration of the pheromone, 3,11-dimethyl-2-nonacosanone. – *Journal of Chemical Ecology*, 5(2): 289-297.
- NISHINO C., MANABE S., KUWABARA K., KIMURA R., TAKAYANAGI H., 1982 – Isolation of sex pheromone of the american cockroach by monitoring with electroantennogram responses. – *Insect Biochemistry*, 13(1): 65-70.
- PERSOONS G.J., VERWIEL P.E.J., RITTER F.J., NOOYEN W.J., 1981 – Studies on sex pheromone of American cockroach, with emphasis on structure elucidation of Periplanone-A. – *Journal of Chemical Ecology*, 8(2): 439-451.
- PHILLIPS A.D.G., WYATT T.D., 1992 – Beyond origami: using behavioural observations as a strategy to improve trap design. – *Entomologia experimentalis applicata*, 62: 67-74.
- PILON N., 2004 – Due nuove specie di infestanti in Italia: *Periplaneta australasiae* e *Tapinoma melanocephalum*. – *Igiene Alimenti - Disinfestazione & Igiene Ambientale*, Gennaio/Febbraio 2004: 18-19.

- POSPISCHIL R., SCHNEIDER U., BÖCKER T., JUNKERSDORF J., NENTWIG G., SMITH G., SONNECK R., 1999 – Efficacy of Imidacloprid for cockroach control in a gel bait formulation. – *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 52(9): 376-390.
- PRAKASH S., MENDKI M.J., RAO K.M., SINGH K., SINGH R.N., 1995 – Sensilla on the maxillary and labial palps of the cockroach *Supella longipalpa* Fabricius (Dictyoptera: Blattellidae). – *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, 24(1): 13-34.
- RAMASWAMY S.B., GUPTA P., 1981 – Sensilla of the antennae and the labial and maxillary palps of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): their classification and distribution. – *Journal of Morphology*, 168: 269-279.
- RIVAULT C., CLOAREC A., LE GUYADER A., 1994 – Cockroaches as vectors of pathogenic bacteria in urban environments. – *Ecologie*, 25(2): 103-109.
- ROBINSON W.H., 1996 – Urban entomology. – Ed. Chapman & Hall, London.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1990 – The aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): isolation and identification of the attractant components of the pheromone. – *Applied Entomology and Zoology*, 25(3): 355-368.
- SLATER A.J., HURLBERT J., LEWIS V.R., 1980 – Biological control of Brownbanded cockroach. – *California Agriculture*, 34(8/9): 16-18.
- SRINIVASAN R., JAMBULINGAM P., SUBRAMANIAM S., KALYANASUNDARAM M., 2005 – Laboratory evaluation of fipronil against *Periplaneta americana* & *Blattella germanica*. – *Indian Journal of Medical Research*, 122: 57-66.
- SÜSS L., LOCATELLI D.P., 2001 – I parassiti delle derrate. – Ed. Calderini Ed agricole, Bologna.
- WARTHEN JR. J.D., UEBEL E.C., LUSBY W.R., ADLER V.E., 1983 – Investigation of a sex pheromone for the oriental cockroach, *Blatta orientalis*. – *Journal of Insect Physiology*, 29(8): 605-609.

ZHAI J., ROBINSON W.H., 1990 – The walking behavior of German cockroaches. – *Pest Control Technologies*, July 1990: 44-46.

# OBIETTIVI GENERALI

## OBIETTIVI GENERALI

Gli obiettivi generali della presente tesi di Dottorato sono:

- Approfondire le conoscenze biologiche e comportamentali sul Blattellide *Supella longipalpa* (F.), con particolare attenzione ai sistemi di comunicazione basati sullo scambio di messaggeri chimici, quali feromone sessuale e feromone di aggregazione. La conoscenza delle risposte di questo insetto a tali semiochimici permetterà di valutare la possibilità di un loro impiego nei sistemi di monitoraggio e controllo delle infestazioni.
- Mediante l'utilizzo di un microscopio elettronico a scansione, effettuare studi morfologici sulle principali specie di blatte sinantropiche presenti in Italia; in particolare, su *S. longipalpa*, cercare di localizzare i siti di produzione e rilascio del feromone sessuale, partendo da quanto appreso dagli studi comportamentali.
- Verificare l'effettiva efficacia di alcuni formulati gel disponibili in commercio nei confronti di *Blattella germanica* e *S. longipalpa* e predisporre una nuova esca, migliorata con l'impiego di nuove sostanze attrattive. Gettare le basi per una possibile futura messa a punto di un nuovo formulato gel sicuro e "easy to use", contribuendo così al miglioramento della lotta alle blatte in ambito domestico-civile.

# MATERIALI E METODI GENERALI

## MATERIALI E METODI GENERALI

### 5. GESTIONE DEGLI ALLEVAMENTI

Per l'attività di ricerca è di fondamentale importanza avere sempre a disposizione insetti vivi con i quali effettuare le sperimentazioni, il che presuppone allevamenti sempre efficienti in tutto l'arco dell'anno. Spesso il lavoro necessario per la gestione degli allevamenti è sottovalutato per tempo e impegno di cui esso necessita.

Sebbene le blatte siano insetti piuttosto adattabili, che non hanno particolari esigenze alimentari essendo pressoché onnivori, il loro allevamento non è semplice come potrebbe apparire.

In particolare con alcune specie di blatte dal ciclo di sviluppo lento, se non si adottassero le misure necessarie per avvicinarsi il più possibile all'*optimum* di sviluppo, il ciclo risulterebbe talmente lungo da non garantire affatto la disponibilità costante di insetti.

In special modo con *Supella longipalpa* che è uno degli oggetti di questa tesi e che ha un ciclo di sviluppo piuttosto lento (tab. 1) è stato indispensabile trovare le condizioni ideali di allevamento.

Intervallo minimo tra la muta immaginale e l'accoppiamento	3 giorni (maschio) 4 giorni (femmina)
Intervallo tra la muta immaginale e la produzione della prima ooteca	10 giorni
Intervallo tra l'inizio della formazione dell'ooteca e la deposizione	18 ore

Ooteche prodotte per femmina	5-18 (media 11)
Intervallo tra ooteche successive	6 giorni
Periodo di incubazione dell'ooteca	40 giorni
Uova per ooteca	16
Uova schiuse per ooteca	12
Percentuale di insetti che giungono a maturazione	85%
Numero di mute	6-8
Periodo di sviluppo ninfale: in isolamento: 6 mute 8 mute	69 giorni (femmina) 114 giorni (femmina)
in gruppi:	54 giorni (maschio) 56 giorni (femmina)
Vita media dell'adulto	90 giorni (femmina) 115 giorni (maschio)

Tabella 1 – Tempi medi di sviluppo di *Supella longipalpa* in condizioni sperimentali di laboratorio a 30°C (da Cornwell, 1968).

Alcuni miglioramenti sono stati apportati alle consuete tecniche di allevamento: precedentemente venivano utilizzati vasi cilindrici in vetro aventi volume di 5 litri, forniti di coperchio in materiale plastico, nei quali era posto all'interno cartone ondulato arrotolato con la funzione di "nido", pellet per gatti come alimento e una provetta tappata con cotone idrofilo come fonte di acqua. Con questo sistema di allevamento si rendeva necessario anestetizzare le blatte ogni qualvolta si dovesse aprire il vaso, per evitare la fuga degli insetti che, come nel caso di *B. germanica* e *S. longipalpa*, sono perfettamente in grado di arrampicarsi sulle pareti verticali in vetro. Alcuni studi di Brooks (1957, 1965), confermati più recentemente da Branscome *et al.* (2005) hanno evidenziato come l'anestesia con CO<sub>2</sub>, se ripetuta nel tempo, possa causare consistenti ritardi nello sviluppo delle blatte ed influenzare il loro comportamento. Si è ritenuto necessario per

questo motivo adottare un sistema che permettesse di gestire gli allevamenti senza ricorrere all'anestesia, come consigliato anche da Koehler *et al.* (1994).

Sono stati utilizzati a tale scopo contenitori in materiale plastico bianco opaco, delle dimensioni di 20 x 30 x 40 cm (fig. 1); per garantire un adeguato ricircolo di aria sul coperchio sono stati praticati 5 fori di 9 cm di diametro sui quali si è fissata una rete plastica a maglia fine (~ 0,5 mm).

Per evitare la fuga delle blatte, i 7 cm superiori delle pareti interne del contenitore sono stati cosparsi di una miscela di vaselina solida e olio di paraffina, sulla quale gli insetti faticano ad arrampicarsi. Numerose altre soluzioni, quali l'impiego di Teflon (politetrafluoroetilene) liquido o spray, sono state sperimentate ma senza risultati soddisfacenti. Per la preparazione della miscela adottata è stata seguita la seguente procedura: 20 grammi di paraffina solida (Carlo Erba, code n°356601) sono stati addizionati a 30 grammi di olio di vaselina (Carlo Erba, code n°356854) e miscelati a caldo in bagnomaria con acqua a 40-45 °C fino ad ottenere un prodotto uniforme; dopo aver lasciato raffreddare lentamente fino a temperatura ambiente sono stati aggiunti altri 10 grammi di olio di vaselina e si è mescolato a lungo. Questa miscela, che ha mostrato una buona efficacia nell'evitare la fuga di insetti, deve essere sostituita ogni 30-60 giorni.

I nidi sono stati costruiti con numerosi quadrati di trucioloato "*medium density*" (10 cm di lato e 3-6 mm di spessore) distanziati fra loro di pochi millimetri (a seconda della specie) e tenuti rialzati di circa 1 cm dal fondo del contenitore tramite 4 tappi di plastica.

Non è stato utilizzato alcun substrato alimentare artificiale ma solamente alimenti pronti come pellets per gatti, crackers, fette biscottate, biscotti, crusca, frutta disidratata, frutta secca e altro, in accordo con quanto sostenuto da Cohen *et al.* (1987), secondo cui non deve mancare un apporto

di carboidrati. Il cibo è stato fornito *ad libitum*, così come l'acqua, sempre disponibile in un abbeveratoio appositamente costruito; in questo modo l'acqua evapora lentamente limitando l'influenza sui parametri di umidità relativa e riducendo il rischio di formazione di muffe.

Poiché inevitabilmente alcuni esemplari, soprattutto negli stadi giovanili, riescono a superare la barriera costituita dalla vaselina, è stato necessario adottare altre misure di sicurezza per evitare la fuga degli insetti e la conseguente infestazione delle celle entomologiche e dei locali attigui.

Sono stati utilizzati tre diversi sistemi, tutti egualmente funzionanti. Il primo consiste nel porre la scatola di allevamento all'interno di un vassoio di dimensioni maggiori (50 x 70 cm) contenente acqua addizionata di una piccolissima quantità di detersivo per piatti. La presenza di detersivo nell'acqua ne abbassa la tensione superficiale, impedendo agli insetti che eventualmente fuggono dal coperchio, di attraversarla. Un secondo sistema consiste nel posizionare sotto ai contenitori di allevamento un cartone ondulato di dimensione 65 x 50 cm avente la parte marginale cosparsa di colla (TemoStick® Kollant).



Figura 1 - Contenitore per l'allevamento massale di *Blattella germanica*.



Figura 2 - Cartone con colla per evitare la fuga degli insetti.

Come si nota nella figura 2 il bordo del cartone è stato sigillato con nastro adesivo per impedire l'ingresso di piccoli insetti in cerca di rifugio,

eventualmente presenti negli ambienti climatizzati di allevamento. Lo stesso nastro adesivo è stato impiegato per ricoprire la parte in cui è poi stata messa la colla per facilitare le operazioni di manutenzione (periodicamente è necessario rimuovere la colla invecchiata e applicarla nuovamente).

Un terzo sistema adottato, apparentemente più complicato, è stato quello di installare all'interno delle scatole di allevamento una barriera elettrificata, come suggerito da Farr (1980) e da Howell *et al.* (1982). Tale barriera è costituita da due sottilissime strisce di rame leggermente sovrapposte ma separate da un isolante, una collegata al polo positivo e l'altra al negativo di un circuito a 24 Volt (corrente continua VDC).

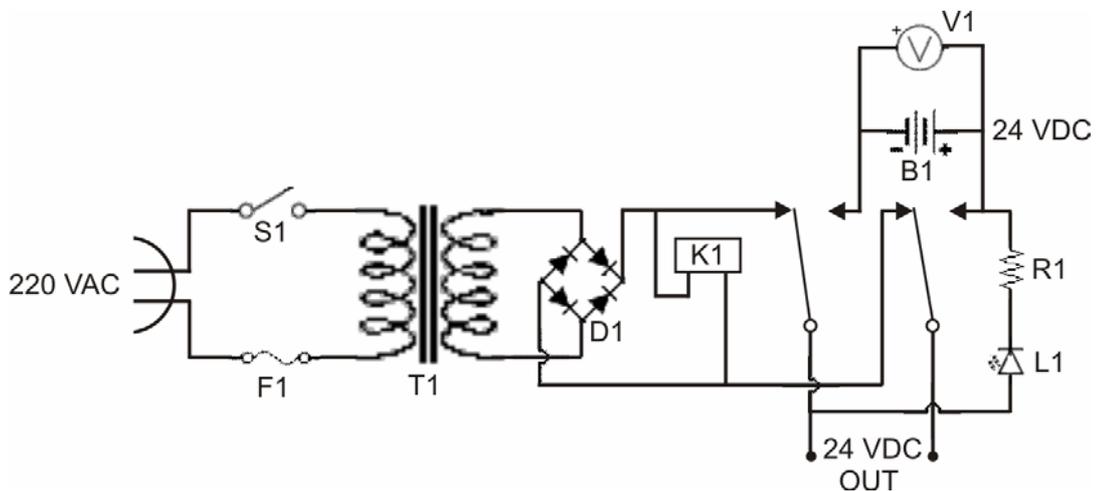


Figura 3 - Schema della barriera elettrica (S1=interruttore, F1=fusibile, T1=traformatore 24 Volt, D1=ponte raddrizzante, K1=relé, B1=batteria 24 Volt, V1=voltmetro, R1=resistenza, L1=led).

Quando l'insetto tocca con le zampe entrambe le strisce chiude il circuito e viene colpito da una leggera scarica elettrica che lo fa cadere sul fondo del contenitore di allevamento. Questa tecnica funziona perfettamente con tutte le specie che non sono in grado di volare o che, come le blatte, qualora in grado, volano rarissimamente. Il metodo ha il grosso vantaggio di non uccidere l'insetto che tenta di scappare, come invece avviene con l'acqua e detersivo e con la colla; tuttavia per mantenere efficiente il sistema

elettrico è necessario provvedere almeno una volta alla settimana ad un'accurata pulizia delle strisce di rame con prodotti in grado di eliminare la patina di ossido che continuamente si forma, nonché di mantenere sempre carica la batteria.

Le operazioni richieste per un corretto mantenimento degli allevamenti di blatte consistono in: 1) una periodica pulizia dei contenitori dall'accumulo di escrementi, esuvie, ooteche e insetti morti, che formerebbero rapidamente uno strato compatto sul fondo in grado di trattenere umidità e favorire la comparsa di muffe; 2) la sostituzione della vaselina posta nella parte alta interna dei contenitori, che a causa del deposito di polveri perde in parte la sua efficacia (operazione da effettuarsi ogni 4-8 settimane circa); 3) a seconda del metodo impiegato per evitare la fuga degli insetti è necessario sostituire l'acqua e il detersivo posti nel vassoio, oppure come già menzionato cambiare la colla sul cartone o mantenere pulite le strisce di rame; 4) mantenere sempre la disponibilità di acqua e cibo; 5) evitare che la popolazione di insetti (soprattutto con *B. germanica*) cresca eccessivamente in numero, trasferendo o eliminando quando necessario gli individui in eccesso (in caso di sovrannumero si instaurano fenomeni di cannibalismo).

## **6. RACCOLTA DI MATERIALE FECALE E PREPARAZIONE DI ESTRATTI**

Il materiale fecale è stato raccolto settimanalmente dal fondo dei contenitori di allevamento di *B. germanica*, *S. longipalpa*, *B. orientalis* e *P. americana* e separato da materiale estraneo (individui morti, esuvie, ooteche, residui di alimento, etc.) mediante un setaccio a maglia fine (mesh n°10); le feci raccolte sono state poste in congelatore (-20 °C) per conservarne intatte

le caratteristiche, fino all'accumulo di una quantità di materiale idonea per procedere all'estrazione di alcuni componenti.



Figura 4 - Feci di *Blattella germanica*.



Figura 5 - Feci di *Blatta orientalis*.



Figura 6 - Feci di *Periplaneta americana*.



Figura 7 - Feci di *Supella longipalpa*.

Poiché si ritiene che i principali componenti attrattivi dei feromoni di aggregazione delle blatte siano per lo più costituiti da alchilammine, forse presenti come sali nelle feci (Sakuma *et al.*, 1997a, 1997b) l'estrazione è stata effettuata con due differenti modalità: con metanolo e, come consigliato da alcuni autori (Miller *et al.*, 2000), con acqua.

Per entrambe le estrazioni, con metanolo e con acqua, è stata adottata la stessa procedura, riportata qui di seguito: a 10 grammi di feci sono stati uniti 30 g di solvente (miscela 1:3 di feci:solvente in peso) in un matraccio (V=50 ml) e dopo aver mescolato a lungo (per circa 60 minuti) mediante l'agitatore magnetico, la miscela ottenuta è stata centrifugata per 5 minuti a

1000 rpm per separare la fase liquida da quella solida. Il surnatante così ottenuto è stato prelevato e posto in una provetta di vetro conservata a temperatura di refrigerazione (4 °C) fino all'utilizzo per le verifiche di attrattività in olfattometro e per le prove con i formulati gel.

Un'ulteriore strategia per raccogliere materiale fecale è stata quella di porre nei contenitori di allevamento massale alcuni dischi di carta da filtro (Filter paper circles - Schleicher & Schuell) e li lasciarli per circa 15 giorni (Sakuma & Fukami, 1991). Successivamente la carta da filtro "imbrattata" dalle blatte è stata raccolta e impiegata in prove olfattometriche di verifica o in biosaggi in arena (che verranno descritti nel capitolo IV); la carta da filtro non immediatamente utilizzata è stata conservata in congelatore a -20 °C.

## **7. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER IL S.E.M.**

Nel microscopio elettronico a scansione (o S.E.M. - Scanning Electron Microscope) un fascio di elettroni prodotto da un filamento di tungsteno colpisce il campione che si vuole osservare, solitamente in condizioni di vuoto (il vuoto è necessario per evitare la collisione con le molecole d'aria e la conseguente deviazione degli elettroni). Quando la superficie del campione viene colpita dal fascio elettronico si verifica produzione di elettroni secondari e retrodiffusi (*backscattering*), i quali vengono raccolti da un rivelatore e convertiti in impulsi elettrici; il fascio non è fisso ma viene fatto scandire: viene cioè fatto passare sul campione in una zona rettangolare, riga per riga, in sequenza. Uno specifico software converte i segnali elettrici in pixel e si ottiene su un monitor l'immagine (in bianco e nero) della superficie del campione.

La procedura utilizzata per la preparazione dei campioni da osservare ha previsto le seguenti fasi: 1) pulizia del campione; 2) disidratazione in concentrazioni crescenti di etanolo; 3) disidratazione al punto critico; 4) posizionamento del campione su un supporto; 5) metallizzazione con oro.

Per una corretta preparazione del campione è necessario assicurarsi che la superficie da esaminare sia pulita e priva di materiale estraneo. Questa operazione è particolarmente importante per insetti come le blatte che vivono a stretto contatto con il substrato alimentare e con i propri escrementi. Infatti polveri, cere, frammenti di substrato, di feci, di insetti morti o esuvie ecc. possono coprire i piccolissimi particolari che ci si appresta a osservare. Ovviamente si deve intervenire con operazioni di pulizia che non rischino di danneggiare le delicate strutture presenti.

Nella maggior parte dei casi si è proceduto come segue: il campione è stato abbondantemente sciacquato con acqua distillata e filtrata, dopodichè è stata effettuata una pulizia con acetone o con KOH 10%.

Uno dei problemi centrali nella preparazione di campioni per S.E.M. con materiale biologico è la rimozione dell'acqua. La procedura di disidratazione corrisponde al passaggio del campione in concentrazioni crescenti di etanolo, metanolo o acetone, seguito da disidratazione al punto critico (*critical point drying*).

Nel caso in oggetto, la disidratazione è avvenuta in soluzioni di etanolo a concentrazione crescente (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, etanolo assoluto) lasciando il campione in ogni concentrazione per circa 1 ora e in etanolo assoluto per almeno un giorno. Le diverse concentrazioni di etanolo sono state ottenute mediante acqua distillata ed etanolo assoluto, entrambi precedentemente filtrati (filtro "Schleicher & Schuell", FP 30/0,2 CA-S) allo scopo di evitare contaminazioni con polveri o altro materiale estraneo.

Quando il campione è in etanolo assoluto si provvede alla disidratazione mediante una tecnica denominata “*critical point drying*”, ovvero disidratazione al punto critico. Tale procedura si basa sul fatto che lo stato a due fasi (gassoso e liquido) della maggior parte dei liquidi volatili scompare ad un certo valore di temperatura e pressione, che viene appunto detto “punto critico”. Al punto critico le due fasi sono in equilibrio, l’interfaccia scompare e di conseguenza non c’è tensione superficiale (Goldstein *et al.*, 1981). Una disidratazione all’aria, al contrario, a causa della tensione superficiale dovuta all’evaporazione dell’acqua, porterebbe al danneggiamento del campione. La disidratazione al punto critico viene effettuata all’interno di una specifica strumentazione (BAL-TEC CPD 030) (fig. 10) nella quale il fluido intermedio (in questo caso l’etanolo) viene sostituito dal “fluido di transizione” ossia CO<sub>2</sub>. Solitamente come fluido di transizione si preferisce la CO<sub>2</sub> perché il punto critico si raggiunge a 31°C e 528 PSI (73.8 bar), condizioni che evitano il danneggiamento dei campioni di materiale biologico. Quando l’anidride carbonica è completamente passata allo stato gassoso, il campione è disidratato.

I campioni appena disidratati sono fortemente igroscopici e per questo motivo è necessario effettuare il trattamento successivo, la metallizzazione, il più presto possibile.

Il materiale biologico presenta un’alta resistività elettrica, perciò si caricerebbe velocemente se fosse irradiato da un fascio elettronico ad alta energia, ossia produrrebbe cariche elettrostatiche che disturberebbero la rivelazione degli elettroni secondari. La conduttività del campione deve pertanto essere fortemente incrementata ricoprendolo con un sottilissimo strato di un materiale conduttore; nel caso specifico i campioni sono stati ricoperti da un conduttore metallico (oro), da cui deriva il nome di questo procedimento, la metallizzazione.

Lo strumento utilizzato per effettuare la metallizzazione (Pabish Top Autocoater SC-20) (fig. 11), detto “*sputter coater*”, impiega un campo elettrico e gas argon: il campione viene posto in una piccola camera in condizioni di vuoto, poi viene fatto fluire gas argon nel campo elettrico, facendo sì che un elettrone venga rimosso dall’argon, creando atomi caricati positivamente; gli ioni di argon vengono dunque attratti da un foglio d’oro caricato negativamente, dal quale strappano atomi di oro che vanno a depositarsi sulla superficie del campione, costituendo una sottilissima patina.

Per eseguire la doratura, i campioni vengono posti su appositi supporti, chiamati “*stubs*”; lo *stub* utilizzato altro non è che un dischetto di alluminio del diametro di 12,5 mm con un cilindretto coassiale del diametro di 3 mm e lungo 7,5 mm (si veda fig. 12) che serve per montarlo sul portacampioni del S.E.M.. Il campione biologico viene appoggiato sullo *stub* e fissato con nastro biadesivo; per aumentare la conduzione del campione, che come già detto migliora la risposta al fascio elettronico, in alcuni casi si usa uno speciale nastro biadesivo al carbonio.

Una volta eseguita la metallizzazione il campione è pronto per essere osservato. Qualora non venisse osservato in tempi brevi o comunque per conservarlo per future ulteriori osservazioni, è consigliabile mantenere il campione dorato in essiccatoio, per evitare la reidratazione o il deterioramento del campione stesso.



Figura 8 - Strumentazione S.E.M..



Figura 9 - Vano porta-campioni e cannone elettronico.



Figura 10 - Strumento per la disidratazione al “punto critico” dei campioni.



Figura 11 - *Sputter coater* per la metallizzazione dei campioni.



Figura 12 – Esempio di stubs dorati; in alto a sinistra uno stub in preparazione non ancora metallizzato

## 8. BIOSAGGI IN ARENE

Le arene utilizzate per i biosaggi sono state appositamente costruite con PVC (polivinilcloruro) espanso bianco avente spessore di 5 mm (fig. 13). La misura interna del fondo di ciascuna arena è di 100 x 100 cm e le pareti sono alte 12 cm. L'assemblaggio del fondo con i lati è stato eseguito con una speciale colla (Henkel - Tangit PVC-U).

I 9 cm superiori delle pareti verticali delle arene sono stati cosparsi di vaselina e paraffina per evitare che gli insetti vi camminassero: in questo modo la reale superficie "calpestabile" è di 1 m<sup>2</sup>. Sono poi stati predisposti dei coperchi, realizzati con un telaio in legno (115 x 115 cm) a cui è fissata una rete a maglia fine in materiale plastico; il peso del telaio, di dimensioni maggiori rispetto all'arena, fa sì che la rete aderisca perfettamente al bordo superiore dei lati, in modo tale da impedire la fuga di insetti che avessero eventualmente superato la barriera costituita dalla miscela paraffina/vaselina (fig. 14).

Dopo ogni biosaggio la superficie interna delle arene è stata pulita accuratamente e lavata con acqua per evitare inquinamenti con sostanze utilizzate per i test o rilasciate dagli insetti (solitamente non si impiegano detersivi per la pulizia per evitare che rimangano odori o sostanze che potrebbero inficiare le prove successive).



Figura 13 - Arena in PVC bianco.



Figura 14 - Arena provvista del coperchio costituito da una rete montata su un telaio in legno.

## 9. BIOSAGGI IN OLFATTOMETRO

Un olfattometro a “doppia scelta” è stato utilizzato per eseguire i tests comportamentali. Si tratta di un sistema, appositamente costruito in plexiglas trasparente, costituito da 10 parti tubolari che assemblate formano una “Y” (fig. 15). Il corpo dell’olfattometro ha sezione circolare con diametro interno di 28 mm e spessore di 2 mm. La possibilità di scomporre l’olfattometro in più parti permette una pulizia più accurata ed efficace (fig. 16). Il braccio principale ha una lunghezza totale di 60 cm, ed ogni braccio dopo la diramazione misura 48 cm. Una gabbietta costituita da un pezzo dello stesso tubo di plexiglas (lunga 10 cm) provvista di una porticina scorrevole in alluminio traforato è usata per introdurre la blatta nell’estremità sottovento dell’olfattometro (fig. 17). Le altre estremità sono costituite da una gabbietta a tubo a 2 comparti separati da una griglia metallica: uno per accogliere la blatta al termine del test e l’altro per contenere l’attrattivo (fig. 18). Alle stesse estremità sono collegati 2 tubicini mediante i quali è garantito il flusso d’aria.

L’aria, prodotta da un compressore, passa dapprima in un filtro a carboni attivi con effetto deodorante (S-Trap Supelpure HC – Supelco) (fig. 21) e, dopo essere passata in un primo manometro per la regolazione principale del flusso (fig. 22), viene divisa in due flussi separati regolabili distintamente. Tramite due manometri di precisione (High Flow Flowmeter Kit – Supelco) i flussi dei rami destro e sinistro dell’olfattometro vengono regolati (fig. 23); la misurazione precisa è fornita da un flussimetro elettronico (Agilent – VeriFlow 500) (fig. 24). L’aria è poi sottoposta ad umidificazione facendola passare in acqua distillata dopo essere stata micronizzata da una pietra porosa (figg. 25-26).

Tramite alcune prove preliminari è stato stimato che un flusso di aria idoneo per insetti come *B. germanica* e *S. longipalpa* si attesta intorno a 250 ml/min per ogni braccio, per un totale di 0,5 litri/min nel braccio principale dell'olfattometro. Questo modesto flusso d'aria infatti è tale da trasportare efficacemente le sostanze odorose poste nei porta-campioni dell'olfattometro verso l'estremità sottovento determinando rapide risposte negli insetti posti nella gabbietta di introduzione e senza infastidirne i movimenti nel braccio principale.

Per diminuire le possibilità di errori dovuti all'influenza di fattori esterni è stata oscurata la finestra presente nel locale ove sono state effettuate le prove e si è adoperata unicamente illuminazione artificiale; inoltre l'area di lavoro è stata delimitata da tessuti bianchi (fig. 27).

L'illuminazione consiste in due lampade inattiniche rosse (bulbi da fotografo a luce attenuata, come in fig. 28) poste a circa 1,2 m sopra l'olfattometro. Questo tipo di illuminazione permette di effettuare le prove durante la scotofase senza alterare il comportamento degli insetti.

Questo tipo di olfattometro a due vie permette di avere una risposta qualitativa, ossia valuta se la sostanza utilizzata abbia un effetto attrattivo oppure no. Per questo motivo, solitamente, si valuta un solo prodotto alla volta, lasciando vuoto uno dei due comparti porta-attrattivo o inserendo un "controllo" solitamente costituito da un pezzo di carta da filtro inumidito con acqua distillata. In tal modo risulta più significativa la scelta dell'insetto.

Ad ogni prova è stato attribuita in modo casuale la posizione (all'estremità di una diramazione dell'olfattometro o a quella opposta) dell'attrattivo. Dopo ogni utilizzo l'olfattometro è stato accuratamente pulito e lavato con acqua.

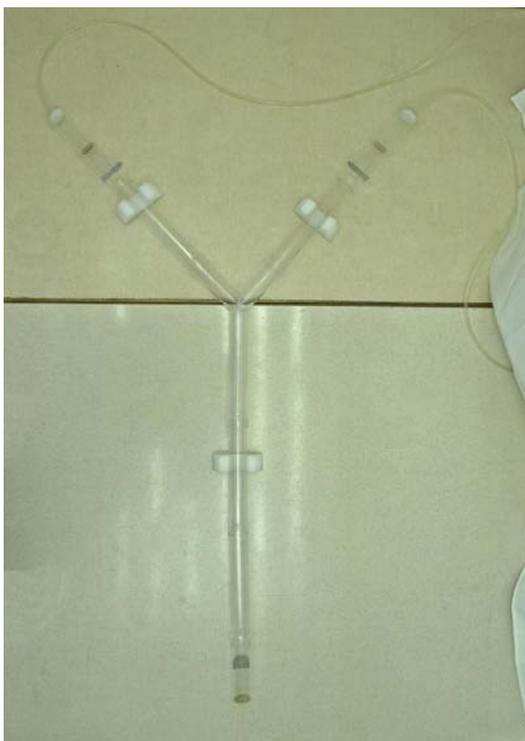


Figura 15 - Olfattometro.

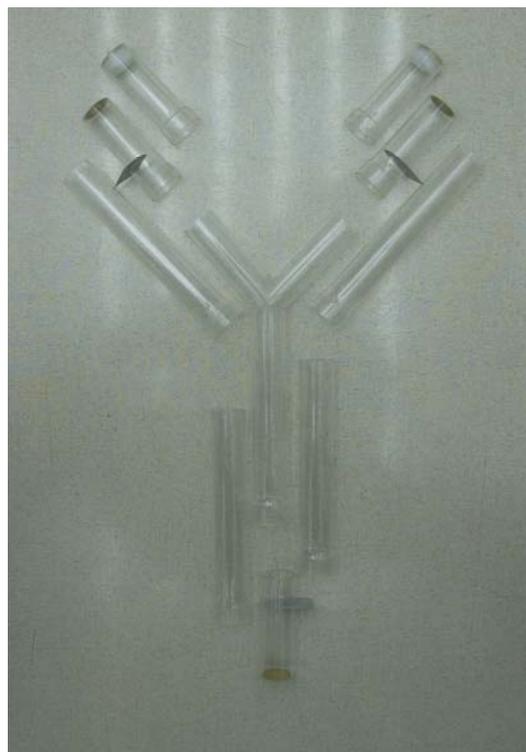


Figura 16 – L'olfattometro smontato per il lavaggio.



Figura 17 – Gabbietta in cui è posto l'insetto all'inizio del test.



Figura 18 – Parte terminale: gabbietta raccogli-insetto e vano porta-campione.

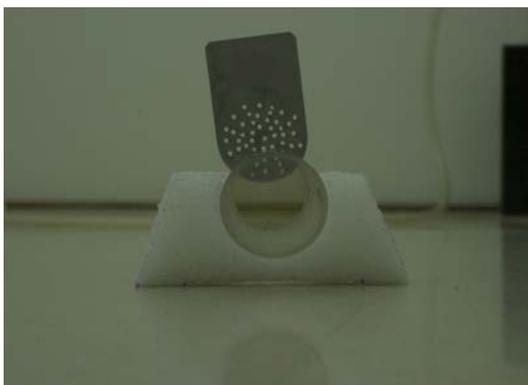


Figura 19 – Sistema di apertura e chiusura della porticina metallica.



Figura 20 – Particolare della porticina chiusa.



Figura 21 – Filtro a carboni attivi.



Figura 22 – Primo manometro per regolare il flusso.



Figura 23 – I due regolatori di precisione per moderare separatamente i due flussi.



Figura 24 – Flussimetro elettronico.



Figura 25 – Sistema di umidificazione dell'aria.



Figura 26 – Particolare della micronizzazione dell'aria nell'acqua distillata.

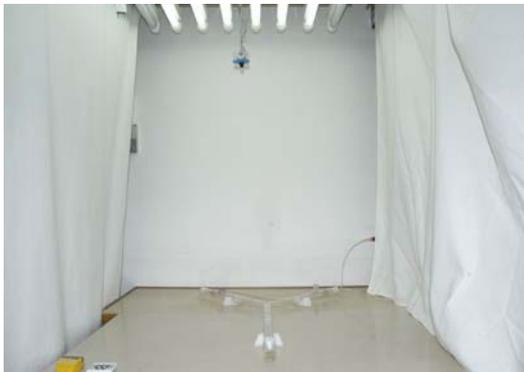


Figura 27 – Area di lavoro.



Figura 28 – Particolare della illuminazione usata durante le prove.

Per ogni biosaggio in olfattometro è stato impiegato un solo insetto per volta introducendolo nella gabbietta all'estremità sottovento e lasciando 10 minuti per l'acclimatamento. Quindi è stata aperta la gabbia di partenza ed è stato osservato il comportamento della blatta. Poiché si è constatato che spesso la blatta non effettua immediatamente una scelta ma talvolta esplora varie parti dell'olfattometro prima di mostrare preferenza per l'attrattivo o per il controllo, si è dato un tempo massimo di 5 minuti ad ogni insetto e la risposta è stata valutata positiva qualora esso avesse sostato per almeno un minuto consecutivo nel braccio dell'olfattometro contenente l'attrattivo, e negativa in corrispondenza di una sosta di almeno un minuto nel braccio

contenente il controllo. Nei casi in cui l'insetto avesse sostato per oltre un minuto nel braccio principale dell'olfattometro, non avesse sostato per oltre un minuto in nessun braccio (destro o sinistro della "Y"), non si fosse mosso dalla gabbietta di introduzione o avesse vagato per l'olfattometro senza sostare, non è stata registrata alcuna risposta.

Di ciò è stato tenuto conto nell'elaborazione dei dati ottenuti dalle prove olfattometriche descritte in vari capitoli di questa tesi: in accordo con quanto effettuato in studi analoghi (Schal *et al.*, 1992) e in seguito a comunicazione diretta con il Prof. Coby Schal della North Carolina State University (N.C., United States), si è deciso di non considerare ai fini statistici gli insetti che non hanno effettuato alcuna scelta nell'olfattometro.

## **BIBLIOGRAFIA**

- BRANSCOME D.D., KOEHLER P.G., OI F.M., 2005 – Influence of carbon dioxide gas on German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) knockdown, recovery, movement and feeding. – *Physiological Entomology*, 30: 144-150.
- BROOKS M.A., 1957 – Growth-retarding effect of carbon-dioxide anaesthesia on the German cockroach. – *Journal of Insect Physiology*, 1: 76-84.
- BROOKS M.A., 1965 – The effects of repeated anaesthesia on the biology of *Blattella germanica* (Linnaeus). – *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 8: 39-48.
- COHEN R.W., HEYDON S.L., WALDBAUER G.P., FRIEDMAN S., 1987 – Nutrient self-selection by the omnivorous cockroach *Supella longipalpa*. – *Journal of Insect Physiology*, 33(2): 77-82.
- CORNWELL P.B., 1968 – The cockroach. – Ed. Hutchinson & Co LTD, London.

- HOWELL H.N., MOORE W.S., GRANOVSKY T.A., 1982 – An improved electric barrier for confining insects in containers. – *The Southwestern Entomologist*, 7(4): 260-262.
- KOEHLER P.G., STRONG C.A., PATTERSON R.S., 1994 – Rearing improvements for the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Medical Entomology*, 31(5): 704-710.
- FARR D.V., 1980 – Electric barrier for confining insects in rearing containers. – *New Zealand Entomologist*, 7(2): 192-193.
- GOLDSTEIN J. I., NEWBURY D. E., ECHLIN P., JOY D. C., FIORI C., LIFSHIN E., 1981 – Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. – Plenum Press, New York.
- MILLER D.M., KOEHLER P.G., NATION L., 2000 – Use of fecal extract trails to enhance trap catch in German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) monitoring stations. – *Journal of Economic Entomology*, 93(3): 865-870.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1991 – Aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): choice-chamber assay for arrestant component(s). – *Applied Entomology and Zoology*, 26(2): 223-235.
- SAKUMA M., FUKAMI H., KUWAHARA Y., 1997a – Aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): controlled release of attractant amines by salt formation. – *Applied Entomology and Zoology*, 32(1): 143-152.
- SAKUMA M., FUKAMI H., KUWAHARA Y., 1997b – Attractiveness of alkylamines and aminoalcohols related to the aggregation attractant pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Applied Entomology and Zoology*, 32(1): 197-205.
- SCHAL C., LIANG D., HAZARIKA L.K., CHARLTON R.E., ROELOFS W.L., 1992 – Site of pheromone production in female *Supella longipalpa* (Dictyoptera: Blattellidae): behavioral, electrophysiological, and morphological evidence. – *Annals of the Entomological Society of America*: 85(5): 605-611.

# CAPITOLO I

## CAPITOLO I

### STUDIO DEL COMPORTAMENTO RIPRODUTTIVO E DELLE PREFERENZE DI OVIDEPOSIZIONE IN *SUPELLA LONGIPALPA*

Sebbene *Supella longipalpa* (Fabricius) sia un infestante piuttosto comune in diverse regioni del mondo, poco ancora si conosce circa il suo comportamento.

Precedenti studi sui comportamenti riproduttivi delle blatte hanno dimostrato che vengono prodotti dall'insetto alcuni composti chimici con azione attrattiva che, captati tramite specifici chemiorecettori da individui di sesso opposto, ne stimolano il "corteggiamento" (Nishida *et al.*, 1978). Nella maggior parte delle specie è la femmina ad emettere un feromone sessuale volatile in grado di attrarre il maschio, prodotto da apposite ghiandole situate nella regione addominale.

Gli studi maggiormente approfonditi finora effettuati sul comportamento di richiamo tramite emissione del feromone sessuale da parte delle femmine (indicato frequentemente con il termine "*calling behavior*"), riguardano *Blattella germanica* (L.) (Liang & Schal, 1993a, 1993b, 1993c, 1994), mentre pochi studi sono stati effettuati su *S. longipalpa*. Anche il feromone sessuale di *Periplaneta americana* (L.) è stato ampiamente studiato e si è dimostrato che il componente principale, denominato periplanone B, esercita un'azione attrattiva, oltre che intraspecifica, anche nei confronti di *Blatta orientalis* L., il cui feromone sessuale non è ancora stato individuato con chiarezza.

Smith & Schal (1991) hanno dimostrato che il picco di produzione del feromone sessuale in *S. longipalpa* si verifica al quarto giorno dopo la muta immaginale, mentre il cosiddetto “*calling behavior*” inizia al quinto o sesto giorno, esclusivamente durante la scotofase.

In corrispondenza di questo comportamento di richiamo viene rilasciata una sostanza volatile che provoca agitazione e stimola il corteggiamento nei maschi che la recepiscono. Sia il comportamento di richiamo della femmina che il corteggiamento del maschio si interrompono dopo l'accoppiamento.

Il presente studio ha approfondito alcuni aspetti del comportamento riproduttivo e della dinamica di deposizione delle ooteche in *S. longipalpa*.

## **MATERIALI E METODI**

### **Comportamento riproduttivo**

Ninfe di *S. longipalpa* sono state prelevate dai contenitori di allevamento massale e poste individualmente in piccoli barattoli in materiale plastico trasparente (70 x 70 x 35 mm) unitamente a cibo (pellet per gatti e biscotti secchi) e acqua *ad libitum*; gli adulti qui sfarfallati non sono stati messi in contatto con individui di sesso opposto fino al momento della prova.

La temperatura è stata mantenuta a  $26 \pm 1$  °C e l'umidità relativa a  $64 \pm 10$  %, con fotoperiodo L:D = 12:12. Per poter effettuare le osservazioni durante la scotofase è stato utilizzato un bulbo fotografico a luce rossa attenuata (lampada inattinica), che non influenza il comportamento delle blatte (Koehler *et al.*, 1987).

Lo studio del comportamento riproduttivo è stato effettuato impiegando femmine vergini a partire dal secondo giorno dalla muta immaginale e maschi dal terzo giorno. Per le osservazioni riguardanti l'emissione del feromone sessuale da parte delle femmine, queste sono state messe a contatto con maschi in contenitori in materiale plastico privi di coperchio, con i 3 cm superiori delle pareti cosparsi di una miscela di vaselina e paraffina per evitare la fuga degli insetti.

### **Osservazioni sull'ovideposizione**

Individui adulti maschi e femmine sono stati posti in vasi di vetro da 5 litri con coperchio in materiale plastico.

Per le osservazioni relative alle preferenze dei siti di deposizione delle ooteche, in ogni vaso sono stati collocati 15 maschi e 10 femmine e sono stati impiegati in totale 6 vasi. All'interno di ogni vaso sono stati posti due substrati differenti come possibili siti di ovideposizione: cartone ondulato e un pezzo di faesite delle dimensioni di 10 x 8 cm formante un angolo di circa 30° con le pareti verticali del vaso (come descritto da Benson & Huber, 1989); questa disposizione è volta a imitare crepe e fessure che queste blatte possono incontrare nelle abitazioni. Nel vaso erano presenti anche una piastra Petri in materiale plastico (diametro 9 cm) contenente cibo pellettato per gatti *ad libitum* e una provetta in materiale plastico contenente acqua e tappata con cotone idrofilo. L'ambiente è stato mantenuto a  $26 \pm 1$  °C e umidità relativa  $64 \pm 10$  %, con fotoperiodo L:D = 12:12.

La verifica delle deposizioni di ooteche è stata effettuata ogni settimana per 8 settimane.

Per quanto riguarda invece le osservazioni dirette sul comportamento delle femmine durante la deposizione dell'ooteca è stato utilizzato un vaso da 5 litri contenente 15 femmine, 15 maschi e 20 neanidi; il vaso è stato

mantenuto a  $27 \pm 1,5$  °C e umidità relativa  $52 \pm 8$  %, con fotoperiodo L:D = 12:12 “traslato” in modo tale da poter effettuare le osservazioni al crepuscolo o nelle prime ore di buio servendosi, anche in questo caso, di una lampada inattinica.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Descrizione del comportamento riproduttivo di *S. longipalpa*

Prima dell'accoppiamento le femmine di *S. longipalpa* si posizionano su una superficie (orizzontale o verticale indifferentemente) e stanno ferme con il corpo arcuato dorsalmente, in modo da mantenere le ali discostate e mostrare i tergiti addominali; le zampe vengono allungate e il torace e l'addome vengono in questo modo tenuti lontani dal substrato. Contemporaneamente l'addome viene rigonfiato e le aperture genitali periodicamente mostrate (fig. 1). Tale comportamento viene ripetuto fino all'eventuale contatto con un maschio recettivo.

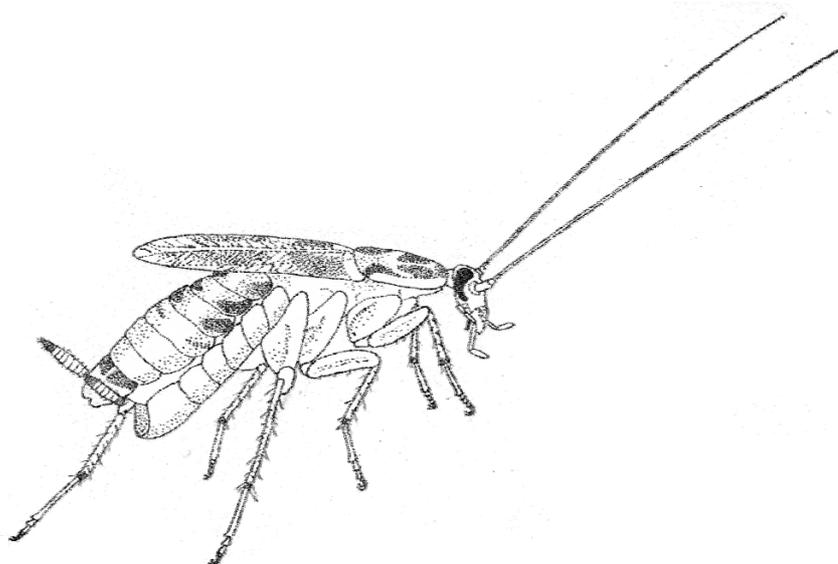


Figura 1 - Femmina di *Supella longipalpa* in atteggiamento di richiamo sessuale.

I maschi posti in un contenitore con una femmina in fase di richiamo agitano velocemente le antenne e si muovono freneticamente. Quando sono a circa 2-3 centimetri dalla femmina alzano anch'essi le ali dall'addome mostrando i propri tergiti. La femmina recettiva si avvicina posteriormente al maschio e si ciba di una secrezione prodotta dal maschio stesso da una ghiandola che sbocca sul VII tergite addominale, analogamente a quanto accade in *B. germanica* (Nojima *et al.*, 1999 e 2002). A questo punto il maschio indietreggia stando sotto l'addome della femmina e stabilisce il contatto genitale. L'accoppiamento avviene molto rapidamente, in circa un minuto, dopodichè entrambi i sessi riassumono la classica postura "lineare" con l'addome molto vicino al substrato. Alcune femmine giovani, al terzo o quarto giorno dalla muta immaginale, sembrano indurre nei maschi il comportamento riproduttivo pur non mostrando un evidente comportamento di richiamo sessuale ma in questo caso non si cibano della secrezione maschile né si accoppiano.

Per verificare l'esistenza di una correlazione tra il comportamento di richiamo e la recettività sessuale nelle femmine di *S. longipalpa*, femmine "calling" e "non-calling" sono state poste in contenitori dove era presente un maschio ed è stato osservato il loro comportamento: ritenendo "recettive" le femmine che hanno stimolato nel maschio il corteggiamento ed hanno proseguito cibandosi del secreto delle ghiandole tergalì dello stesso e successivamente con l'accoppiamento, l'80% delle femmine "calling" è stato giudicato recettivo (32 risposte positive, n=40), mentre tra le femmine "non-calling", alcune hanno determinato risposte nel maschio senza però arrivare all'accoppiamento (10% al terzo giorno, 15% al quarto giorno); nessuna femmina "non-calling" si è accoppiata. C'è quindi una chiara correlazione tra il comportamento di richiamo sessuale e la recettività sessuale nelle femmine di *S. longipalpa*.

Nel grafico 1 è indicata la percentuale di femmine che ha presentato il comportamento di richiamo sessuale, e quella relativa alle femmine che successivamente si sono anche accoppiate, in riferimento all'età (giorni dalla muta immaginale).

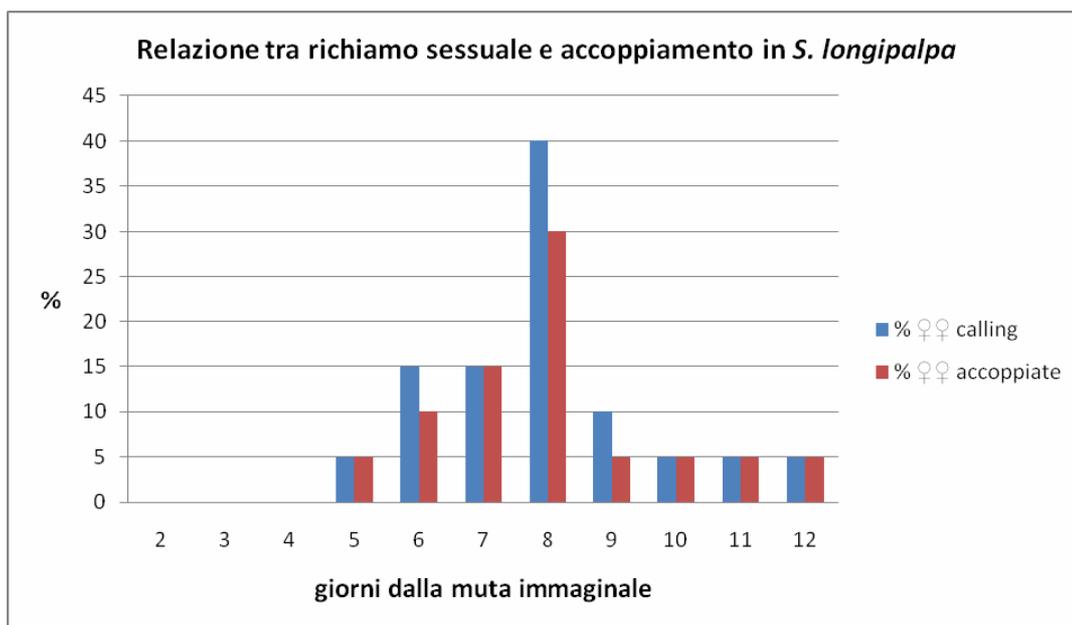


Grafico 1 - Percentuale di femmine “calling” e femmine accoppiate in funzione dei giorni trascorsi dalla muta immaginale.

Le femmine che si sono accoppiate non hanno più mostrato il comportamento di richiamo per tutto il periodo di formazione ed emissione dell'ooteca.

Queste osservazioni concordano con quanto affermato anche da Hales & Breed (1983). A differenza di quanto essi sostengono, il comportamento di “calling” da parte delle femmine di *S. longipalpa*, è stato osservato anche nella fotofase, ossia nel periodo di illuminazione dei locali di allevamento. In particolare si è registrato il comportamento di richiamo a partire delle ultime 3 ore della fotofase e per parte della scotofase, con un picco nelle prime ore di buio. Nel grafico 2 è mostrato il numero di femmine che hanno iniziato il richiamo in relazione al ritmo circadiano (totale 40 femmine).

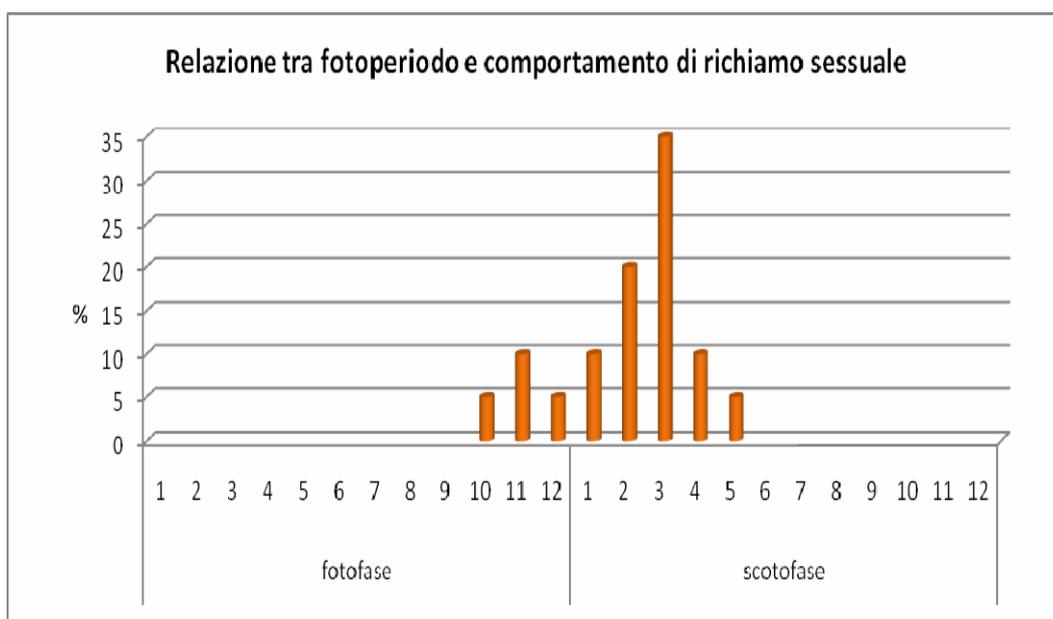


Grafico 2 - Percentuale di femmine di *Supella longipalpa* in fase di richiamo sessuale in relazione al ritmo circadiano.

Wright (1977) ha osservato che la produzione di feromone sessuale da parte delle femmine è massima nella prima parte della vita adulta, e decresce gradualmente nel tempo. Dalle nostre osservazioni è risultato che la vita media delle femmine di *S. longipalpa* è di circa 3-4 mesi, e che la massima produzione di ooteche avviene nei primi 2 mesi di vita.

### Osservazioni sulle preferenze di ovideposizione

Differentemente da quanto accade in *B. germanica*, le femmine di *S. longipalpa* non portano con sé l'ooteca fino alla sua schiusa, ma la fissano ad un substrato. Il fissaggio avviene mediante un fluido coloso, prodotto dalla femmina stessa, che ricopre l'ooteca al momento della deposizione. Van Driesche & Hulbert (1984) hanno scoperto che questo fluido agisce da caïromone nei confronti dell'imenottero parassitoide *Comperia merceti* (Compere) (Hymenoptera: Chalcidoidea); agisce cioè da attrattivo per questo parassitoide segnalandogli la presenza dell'ooteca.

Si è osservato che quando l'ooteca è già ben formata, quasi completamente visibile all'esterno dell'apertura genitale, la femmina comincia a esplorare le superfici mediante i palpi mascellari fino al momento della deposizione vera e propria. Differentemente da quanto osservato da Benson & Huber (1989) in questo studio si è registrato un periodo di ricerca del punto di deposizione dell'ooteca piuttosto breve (questo può essere spiegato dalla differenza di volume e di superficie interna dei contenitori utilizzati): generalmente l'ooteca è stata fissata ad un substrato entro i 30 minuti a partire dall'inizio della ricerca di un sito idoneo da parte della femmina (occorre tenere presente che non è semplice discernere tra la normale attività dell'insetto e l'inizio della ricerca di un sito di ovideposizione).

L'esplorazione del substrato con i palpi mascellari è concentrata soprattutto nei punti depressi del cartone ondulato, che sovente vengono proprio scelti come sito idoneo (fig. 2) e sulla faesite nei punti di contatto con il fondo del vaso (fig. 3).

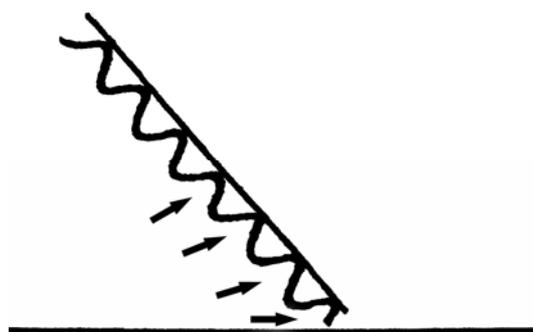


Figura 2 - Punti di deposizione dell'ooteca su cartone ondulato.

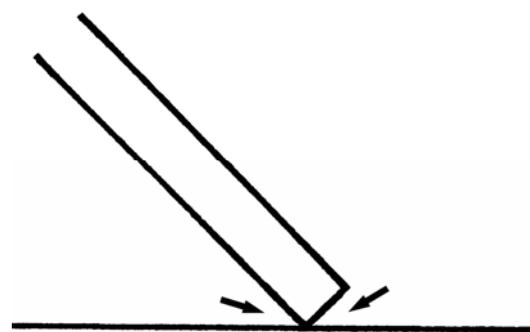


Figura 3 - Punti di deposizione dell'ooteca tra faesite e fondo del vaso.

Quando è stato individuato un punto adatto per l'ovideposizione, la femmina muove le zampe protoraciche (una sola per volta) avanti e indietro come se stesse cercando di scavare: questo comportamento rispecchia probabilmente quanto questi insetti fanno in natura. La femmina ruota quindi

di 180 gradi e deposita l’ooteca, dopodichè emette una piccola goccia di fluido genitale che fissa l’ooteca stessa al substrato; ruota nuovamente di 180 gradi e tocca ripetutamente l’ooteca con i palpi mascellari per  $24\pm 9$  secondi e poi si allontana.



Figura 4 - Gruppo di ooteche di *Supella longipalpa*.

È stato anche osservato in molti casi che l’ooteca viene depositata nelle immediate vicinanze di altre ooteche precedentemente deposte (non necessariamente dalla stessa femmina) a formare dei piccoli gruppi (fino a 7 ooteche).

Questo fa supporre che la presenza di ooteche funga da stimolo per la deposizione e che probabilmente il fluido genitale impiegato dalle femmine per il fissaggio dell’ooteca al substrato abbia una funzione aggregante o di richiamo per altre femmine.

La maggior parte delle ooteche deposte è stata fissata sul cartone ondulato, in particolare negli spazi più stretti determinatisi da piccole pieghe del cartone; alcune ooteche sono state “abbandonate” sul fondo del vaso di vetro o sono state fissate sulla faesite, mentre poche sono state deposte sulla plastica della capsula Petri (contenitore del cibo) o fissate direttamente sul substrato alimentare. Nessuna ooteca è stata fissata sulle pareti vetrose verticali del vaso. In totale, nei 6 vasi osservati per 8 settimane (60 femmine) sono state deposte 88 ooteche. Nella tabella 1 è mostrato in dettaglio il numero di ooteche per tipologia di sito.

	Fondo del vaso	Pareti del vaso	Substrato alim.	Cartone ondulato	Faesite	Capsula Petri
Vaso 1	-	-	1	11	4	-
Vaso 2	3	-	-	7	3	1
Vaso 3	6	-	-	6	3	-
Vaso 4	-	-	2	9	4	1
Vaso 5	1	-	1	7	5	-
Vaso 6	2	-	2	6	3	-
Totale	12	0	6	46	22	2

Tabella 1 - Numero di ooteche deposte in differenti siti.

L'incubazione delle uova (16 per ogni ooteca, eccezionalmente 18) si è protratta per un periodo variabile tra 45 e 110 giorni.

*S. longipalpa* ha quindi mostrato una predilezione per le superfici ruvide e per i punti più nascosti e riparati, come le aree depresse dei cartoni ondulati, in special modo in siti dove fossero già presenti altre ooteche.

La conoscenza del comportamento riproduttivo e del criterio di scelta di un sito di deposizione dell'ooteca può aiutare a migliorare le tecniche di monitoraggio e controllo delle infestazioni. Ad esempio l'efficacia delle trappole adesive, che è scarsa nei confronti di questa blatta, potrebbe essere incrementata fornendo le trappole stesse di superfici idonee per l'ovideposizione o innescandole con attrattivi feromonici.

## BIBLIOGRAFIA

BENSON E.P., HUBER I., 1989 – Oviposition behavior and site preference of the brownbanded cockroach, *Supella longipalpa* (F.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Entomological Science*, 24(1): 84-91.

- HALES R.A., BREED M.D., 1983 – Female calling and reproductive behavior in the Brownbanded cockroach, *Supella longipalpa* (F.) (Orthoptera: Blattellidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, 76(2): 239-241.
- KOEHLER P.G., AGEE H.R., LEPPLA N.C., PATTERSON R.S., 1987 – Spectral sensitivity and behavioural response to light quality in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, 80(6): 820-822.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1993a – Calling behavior of the female German cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Insect Behavior*, 6(5): 603-614.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1993b – Ultrastructure and maturation of a sex pheromone gland in the female German cockroach, *Blattella germanica*. – *Tissue and Cell*, 25(5): 763-776.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1993c – Volatile sex pheromone in the female German cockroach. – *Experientia*, 49: 324-328.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1994 – Neural and hormonal regulation of calling behavior in *Blattella germanica* females. – *Journal of Insect Physiology*, 40(3): 251-258.
- NISHIDA R., KUWAHARA Y., FUKAMI H., ISHII S., 1976a – Female sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: Blattellidae), responsible for male wing-raising. II. 29-hydroxy-3,11-dimethyl-2-nonacosanone. – *Journal of Chemical Ecology*, 2: 449-455.
- NOJIMA S., SAKUMA M., NISHIDA R., KUWAHARA, 1999 – A glandular gift in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera : Blattellidae) : The courtship feeding of a female on secretions from male tergal glands. – *Journal of Insect Behavior*, 12(5): 627-640.
- NOJIMA S., KUGIMIYA S., NISHIDA R., SAKUMA M., KUWAHARA Y., 2002 – Oligosaccharide composition and pheromonal activity of male tergal gland secretions of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). – *Journal of Chemical Ecology*, 28(7): 1483-1494.

- SMITH A.F., SCHAL C., 1991 – Circadian calling behaviour of the adult female brown-banded cockroach, *Supella longipalpa* (F.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Insect Behavior*, 4: 1-14.
- VAN DRIESCHE R.G., HULBERT C., 1984 – Host acceptance and discrimination by *Comperia merceti* (Compere) (Hymenoptera: Encyrtidae) and evidence for an optimal density range for resource utilization. – *Journal of Chemical Ecology*, 10(9):1399-1409.
- WRIGHT C.G., 1977 – Sex pheromone release by virgin females of the brown-banded cockroach, *Supella longipalpa* (F.). – *Journal of Georgia Entomological Society*, 12: 281-283.

# CAPITOLO II

## CAPITOLO II

### OSSERVAZIONI MORFOLOGICHE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (S.E.M.): EVIDENZE DEI SITI DI PRODUZIONE DEL FEROMONE SESSUALE IN *SUPELLA LONGIPALPA*

Le femmine di *Supella longipalpa* (Fabricius) mostrano un comportamento di richiamo sessuale a partire dal quinto o sesto giorno dalla muta immaginale. Tale comportamento può essere osservato facilmente durante la scotofase (con fotoperiodo L:D 12:12), come indicato anche da Schal *et al.* (1992), e talvolta anche durante la fotofase. Quando la femmina è in atteggiamento di richiamo sessuale, come è stato descritto nel capitolo I, discosta le ali dall'addome, incurva quest'ultimo e occasionalmente espande l'atrio genitale.

Smith & Schal (1991) hanno mostrato che la femmina di *S. longipalpa* inizia a produrre feromone al quarto giorno di vita adulta, sebbene come già ricordato l'emissione cominci uno o due giorni più tardi; anche in questo studio si è potuto osservare che il rilascio di feromone sessuale induce nel maschio uno stato di agitazione e stimola il comportamento di corteggiamento. Sia il comportamento di richiamo della femmina sia il corteggiamento del maschio si interrompono dopo l'accoppiamento.

Viene qui presentato uno studio nel quale si sono individuati e localizzati i probabili siti di produzione e rilascio del feromone sessuale in *S.*

*longipalpa*, servendosi di un microscopio elettronico a scansione ed estendendo la ricerca anche a esemplari maschi.

## **MATERIALI E METODI**

Adulti maschi e femmine neo-sfarfallati di *S. longipalpa* sono stati prelevati dalla colonia allevata nei nostri laboratori e uccisi ponendoli in congelatore (-20 °C) per circa un'ora.

### **Osservazioni al microscopio biologico**

È stato separato l'addome dal resto dell'insetto (individui sia maschi sia femmine) ed è stato posto in potassa (KOH 10%) per circa 6 ore. La successiva separazione dei vari tergiti è stata effettuata con l'ausilio di un microscopio stereoscopico; i tergiti addominali così separati, sono stati posti separatamente su vetrini con glicerina e, posto il coprioggetto, sono stati osservati con un microscopio biologico (Olympus BH2-DA) a 200 x e 400 x. Sono stati osservati in totale 10 tergiti addominali di 5 maschi e 5 femmine.

### **Osservazioni al S.E.M.**

La preparazione dei campioni è avvenuta come descritto in “materiali e metodi generali”. Oltre alle osservazioni specifiche riguardanti i tergiti addominali di maschi e femmine di *S. longipalpa*, sono state anche eseguite scansioni di altri particolari morfologici di *S. longipalpa*, *Blattella germanica*, *Blatta orientalis* e *Periplaneta americana*.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **Osservazioni al microscopio biologico**

Partendo dalle osservazioni comportamentali che hanno evidenziato da parte della femmina “recettiva” l’esposizione dei tergiti addominali mediante l’incurvamento dell’addome ed il conseguente allontanamento delle ali, sono state effettuate osservazioni dettagliate dei tergiti. Già Schal *et al.* (1992) hanno evidenziato la presenza di numerosi pori sulla superficie dei tergiti, collegati a cellule epidermiche modificate tramite sottili dotti e hanno ipotizzato che si trattasse di siti di produzione del feromone sessuale, limitando però l’osservazione alle sole femmine. Questa indagine ha riguardato individui di entrambi i sessi.

Osservando al microscopio biologico (figg. 1 e 2) 10 tergiti addominali di 5 femmine si è potuto osservare che la densità di piccoli pori cuticolari cresce gradualmente dal I al IV/V per poi decrescere rapidamente fino al X; in particolare è stato osservato un numero elevato di questi pori sui margini laterali dei tergiti stessi. Negli esemplari maschi è stato osservato un andamento simile: i pori cuticolari sono presenti in numero maggiore lungo i margini laterali e i tergiti con densità maggiore sono il V e il VI; la frequenza di questo tipo di pori cuticolari è comunque maggiore nelle femmine. In figura 3 è rappresentata una indicativa mappa della distribuzione dei suddetti pori cuticolari nella femmina e nel maschio.

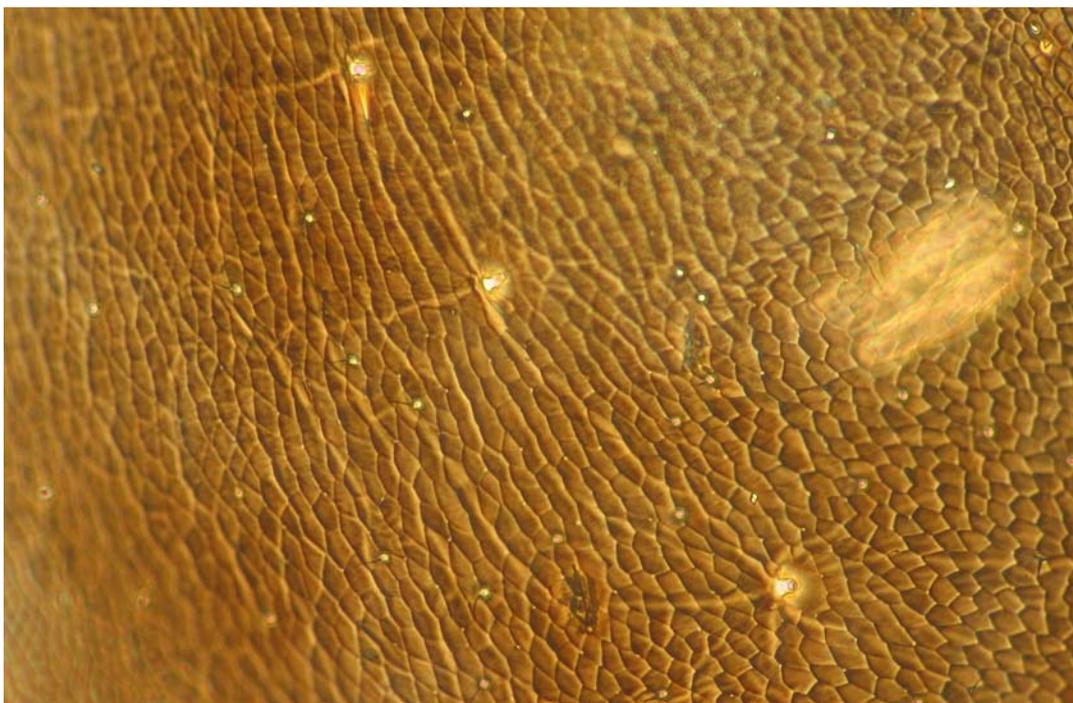


Figura 1 - Tergite addominale femminile di *Supella longipalpa* osservato a 200x.

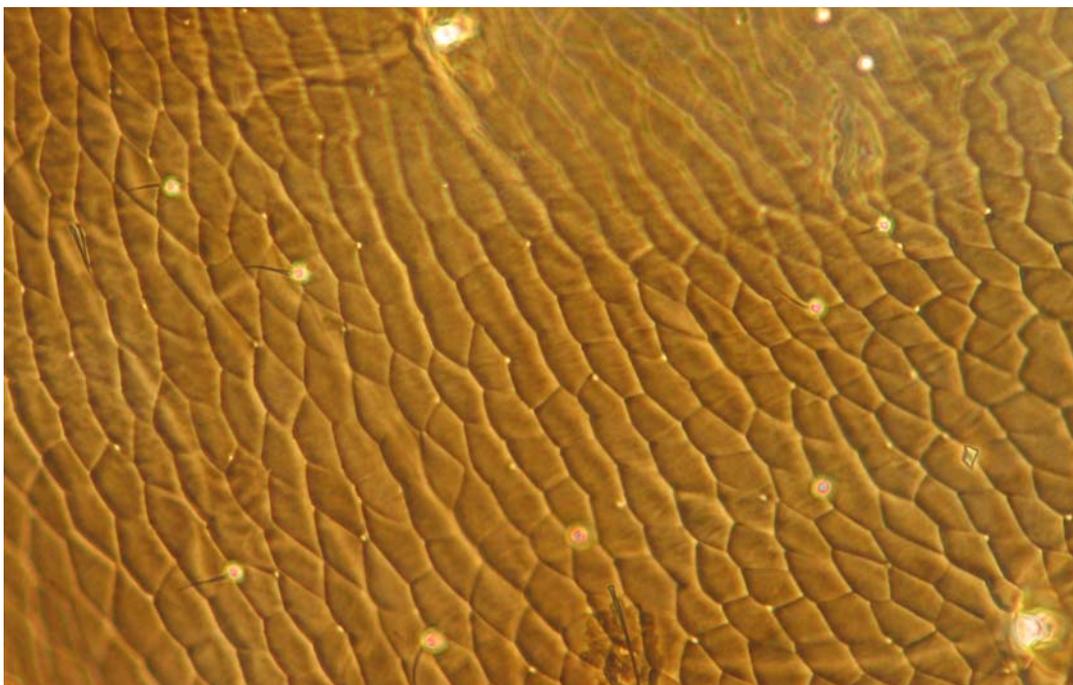


Figura 2 - Tergite addominale femminile di *Supella longipalpa* osservato a 400x (si notano bene numerosi piccoli pori cuticolari).

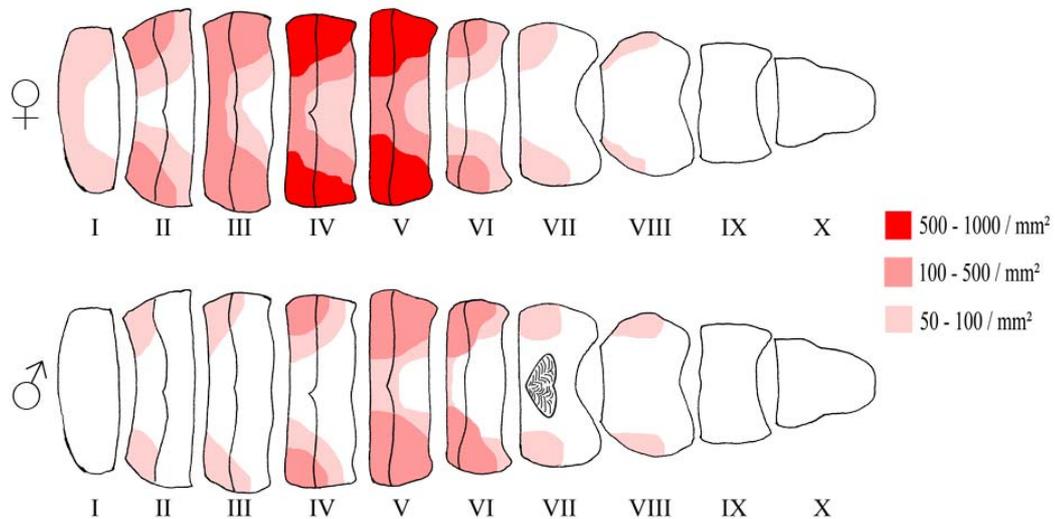


Figura 3 - Densità dei pori cuticolari osservata in femmine e maschi di *S. longipalpa*.

### Osservazioni al S.E.M.

In questo studio sono state condotte numerose osservazioni al S.E.M. per approfondire le conoscenze su alcuni aspetti morfologici delle blatte, in particolare di *S. longipalpa*. Sono stati evidenziati e messi a confronto alcuni particolari di antenne, capo, apparato boccale e strutture tarsali di *B. orientalis*, *P. americana*, *B. germanica* e *S. longipalpa*.

Le osservazioni più approfondite sono state eseguite sui tergiti addominali di adulti di *S. longipalpa*. Dalle osservazioni preliminari al microscopio biologico si è infatti potuto constatare che in questi punti sono presenti numerosi pori (figg. 4 - 7), maggiormente diffusi sui margini laterali del III, IV, V e VI tergite.

I pori cuticolari in oggetto, che secondo Schal *et al.* (1992) rappresentano il punto di sbocco delle ghiandole feromonalì, hanno un diametro di circa 300-400 nm, (figg. 8 e 9).

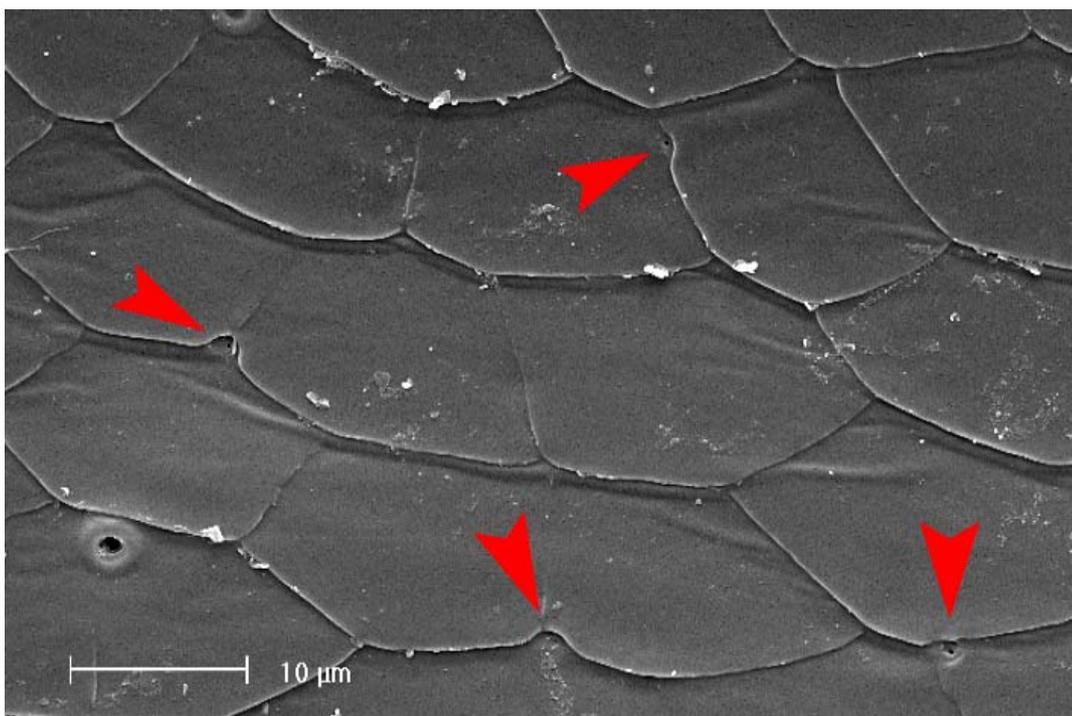


Figura 4 - Alcuni pori cuticolari presenti su tergiti addominali di una femmina di *Supella longipalpa* sono indicati dalle frecce.

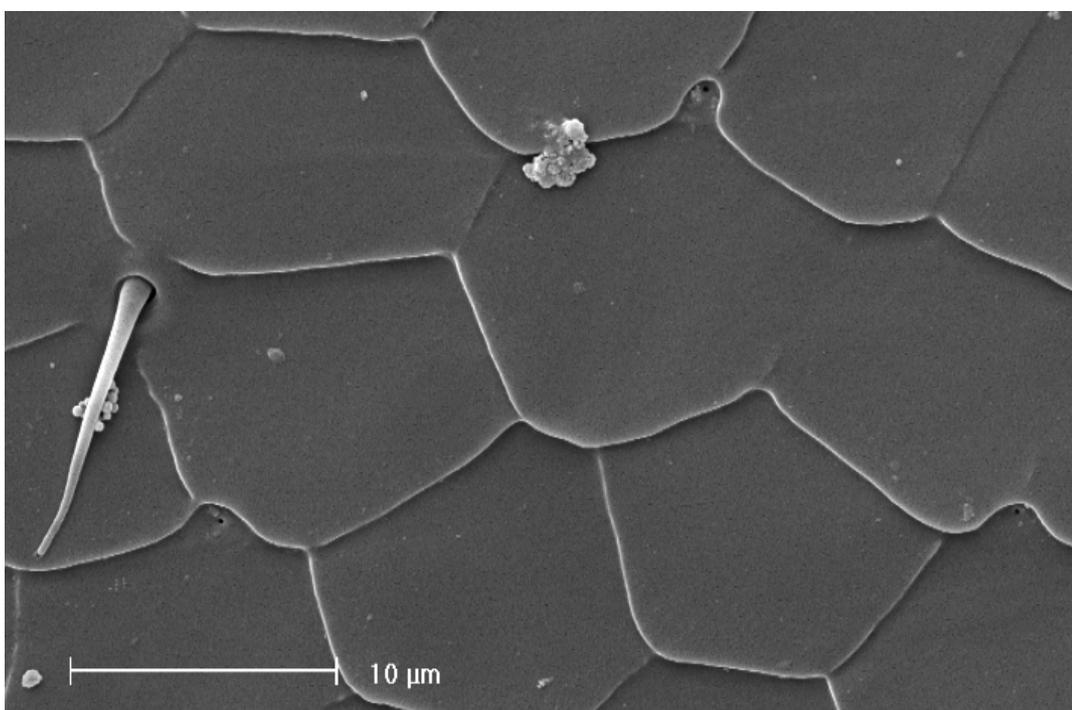


Figura 5 - Pori cuticolari sulla parte centrale di un tergite addominale femminile di *Supella longipalpa*.

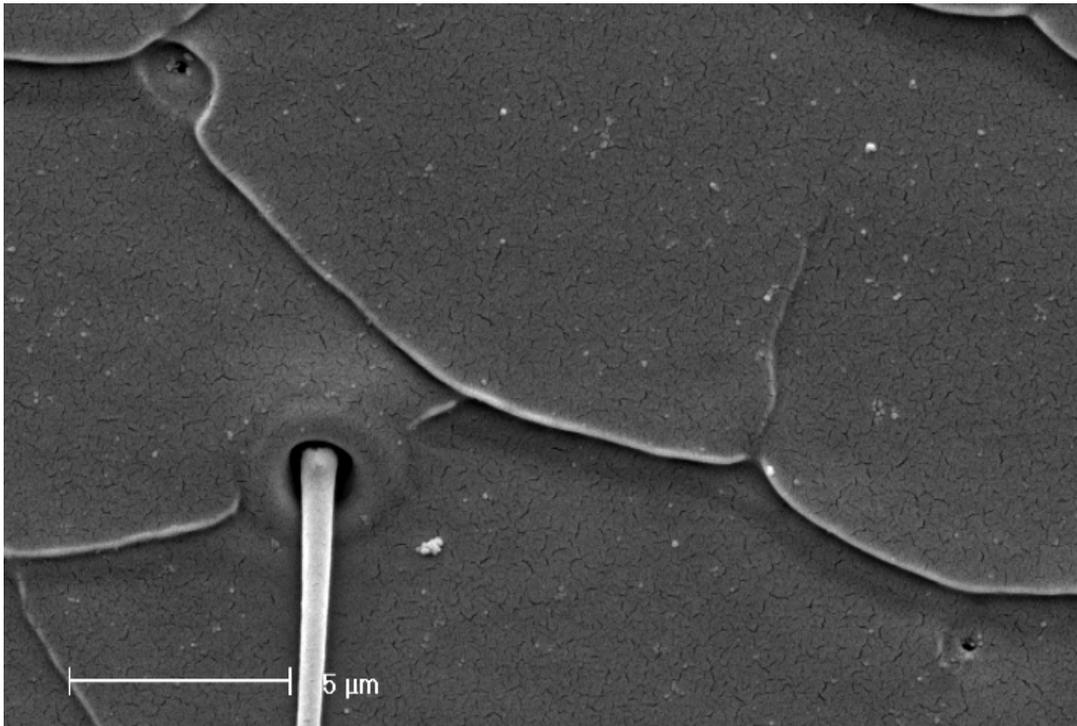


Figura 6 - Pori cuticolari su un tergite addominale di una femmina di *S. longipalpa*.

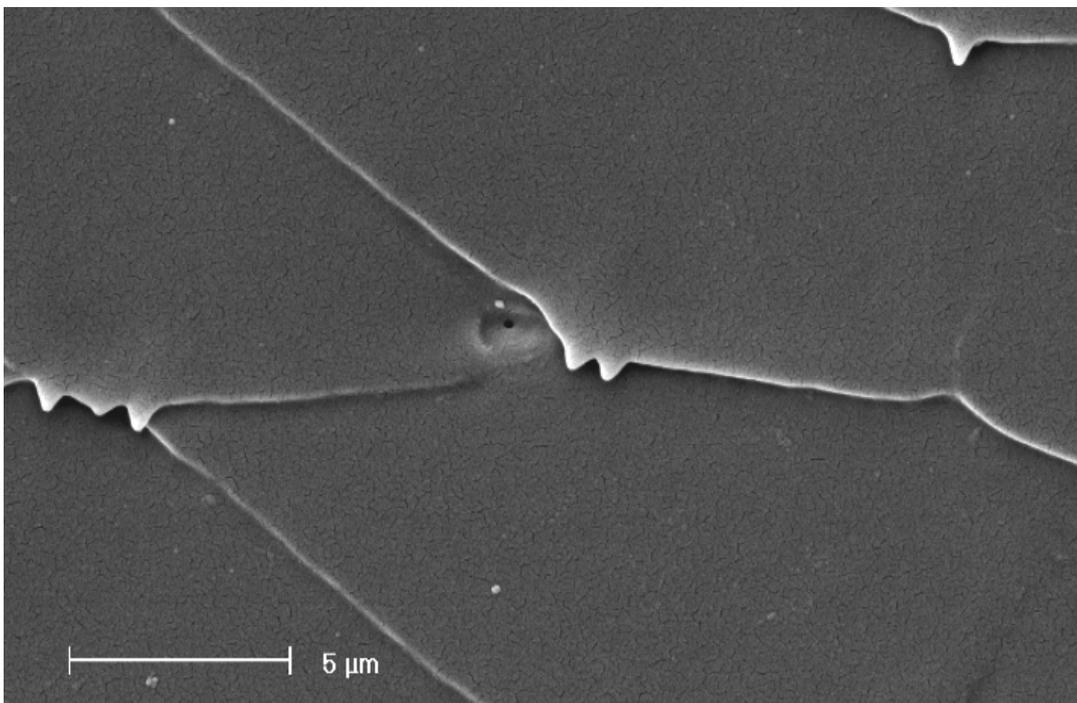


Figura 7 - Pori cuticolari sul margine laterale di un tergite addominale di un maschio di *S. longipalpa* (le sculture presenti sulla cuticola si differenziano in base alla posizione sul tergite) .

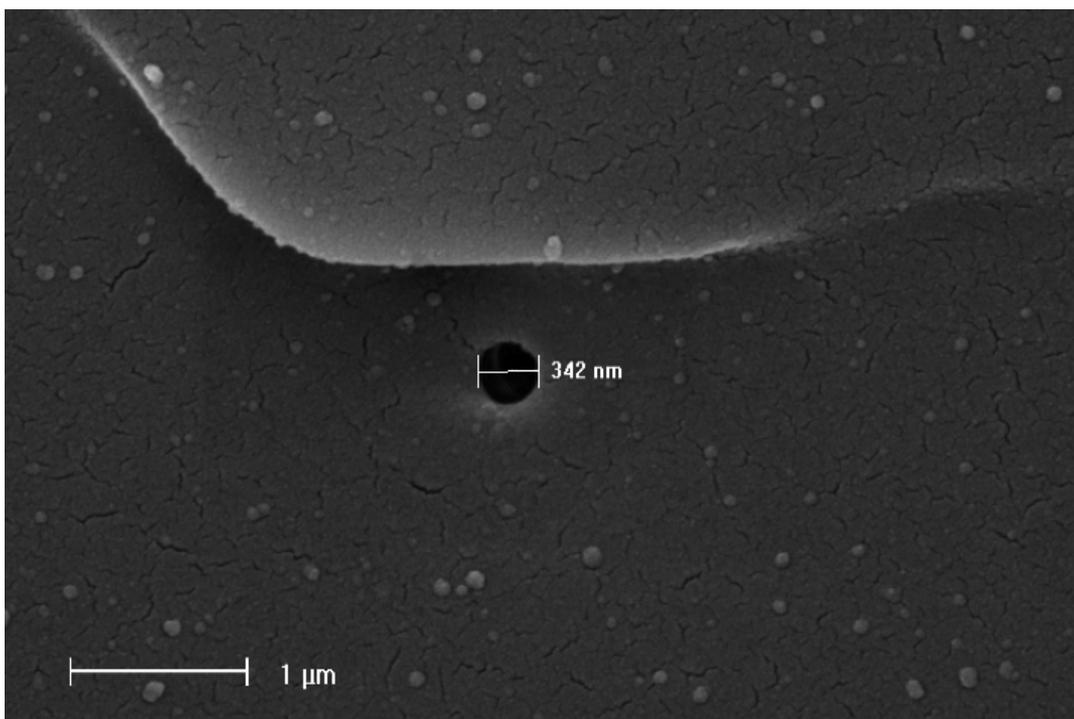


Figura 8 - Particolare di un poro cuticolare femminile.

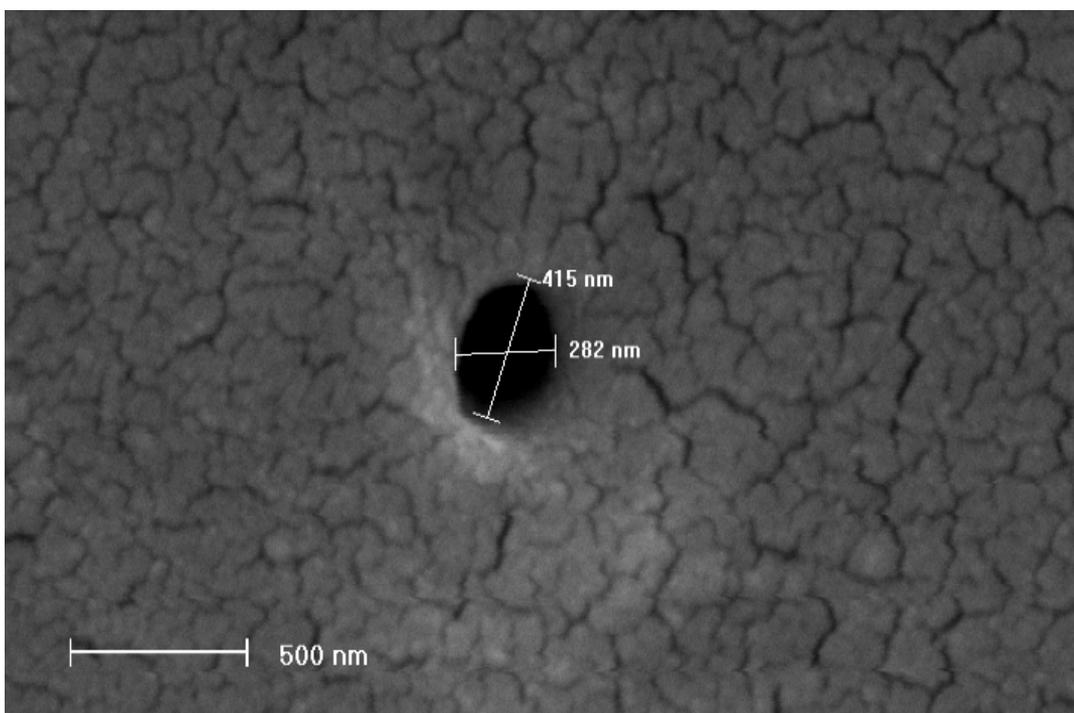


Figura 9 - Particolare di un poro cuticolare femminile.

Al S.E.M. è stato osservato anche il lato inferiore dei tergiti (quello che corrisponde alla superficie del tegumento rivolta verso l'interno del corpo dell'insetto) dove sono state riscontrate sottilissime strutture, simili a dotti, che partono da cellule ghiandolari (figg. 10 - 13). Questo suggerisce che si tratti proprio di ghiandole feromonalì che attraverso strutture tubolari e relativi pori cuticolari rilasciano il secreto all'esterno del corpo della blatta. Queste osservazioni devono essere confermate da studi ultrastrutturali, in corso di realizzazione, con osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione (T.E.M.).

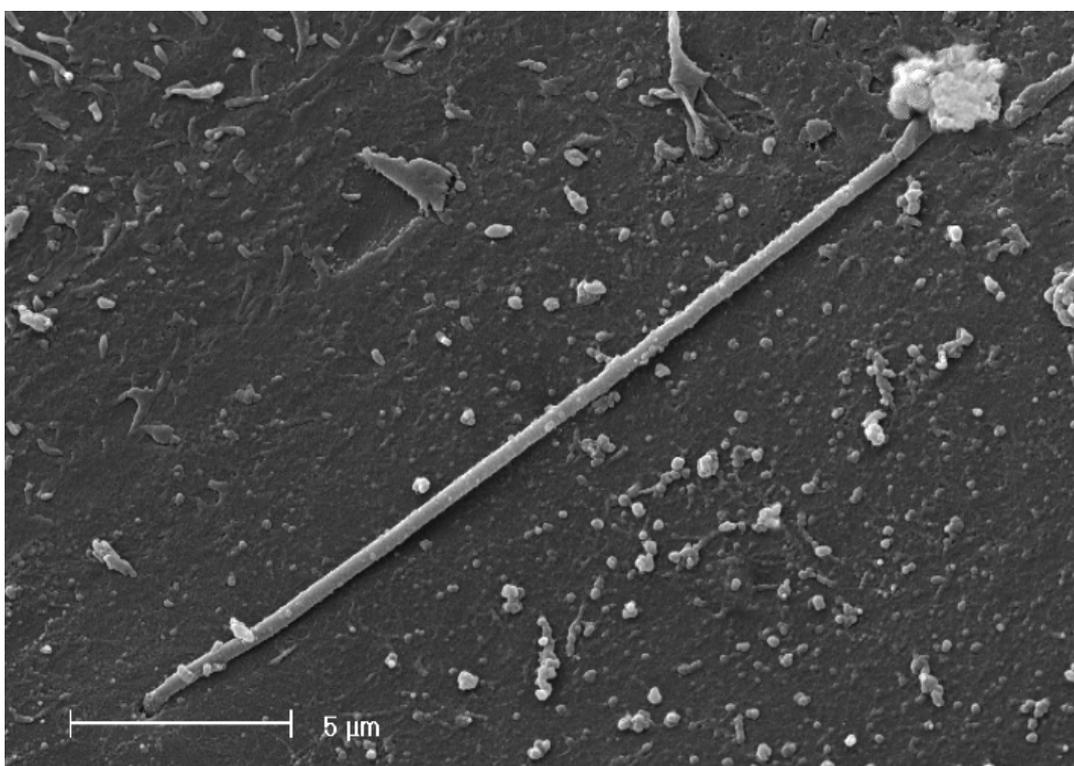


Figura 10 - Sottile dotto che termina in una struttura ghiandolare (*Supella longipalpa*).

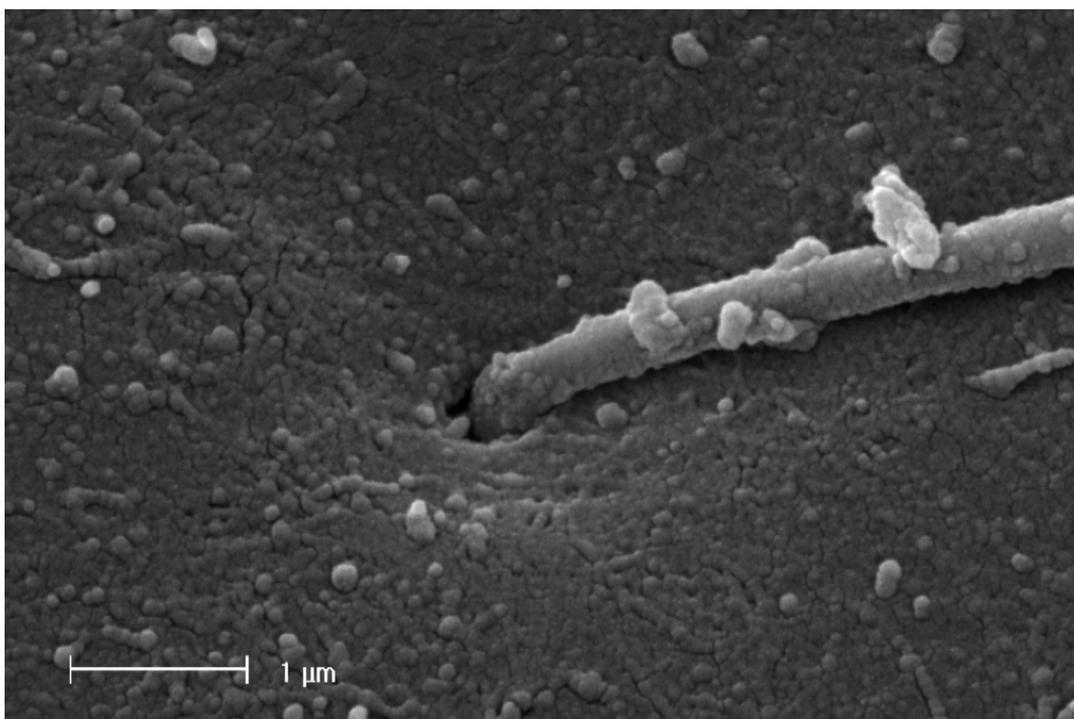


Figura 11 - Particolare del punto di sbocco del sottile dotto.

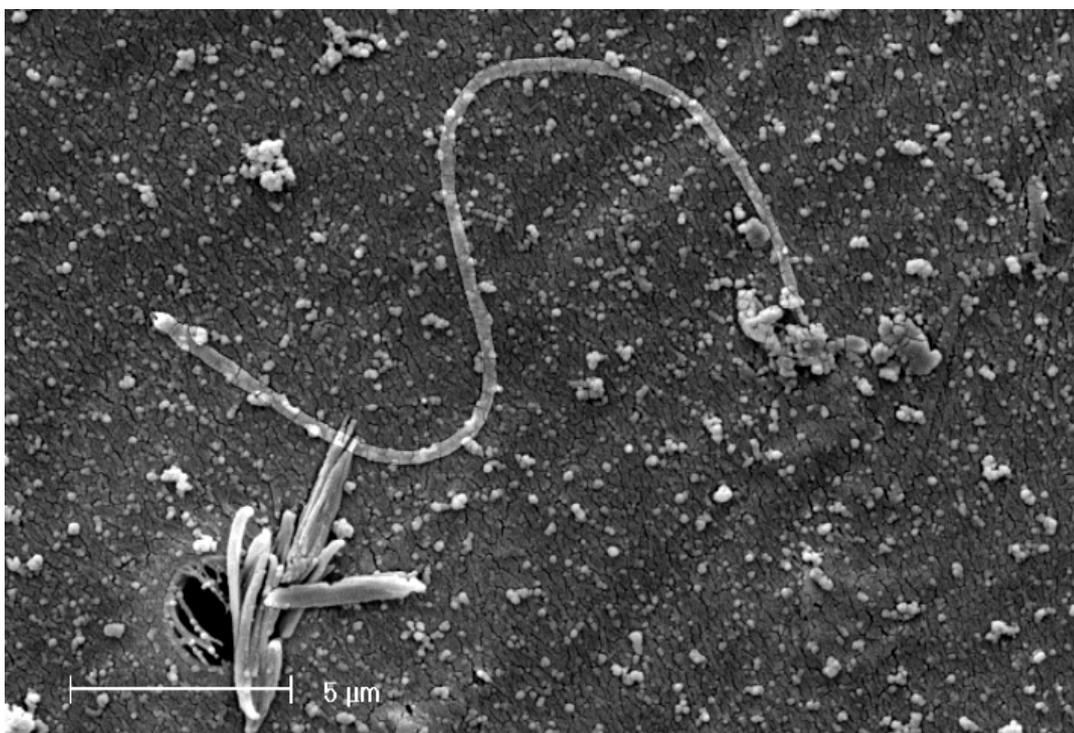


Figura 12 - Struttura osservata sulla parte interna di un tergite addominale femminile di *Supella longipalpa*.

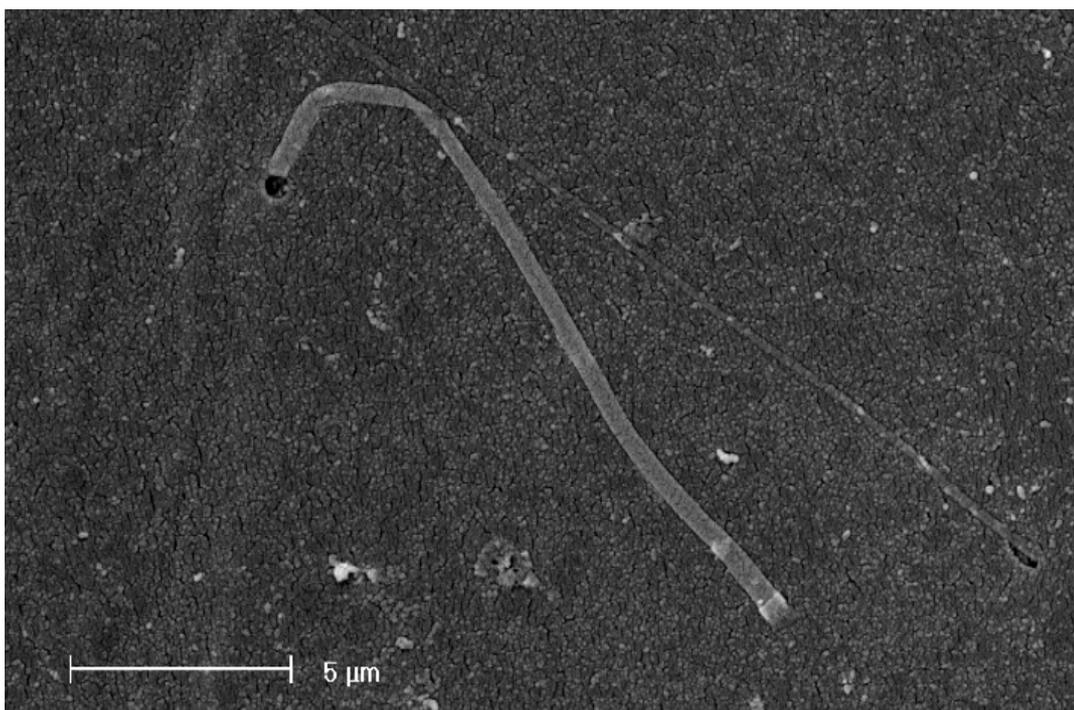


Figura 13 - Struttura osservata sulla parte interna di un tergite addominale femminile di *Supella longipalpa*.

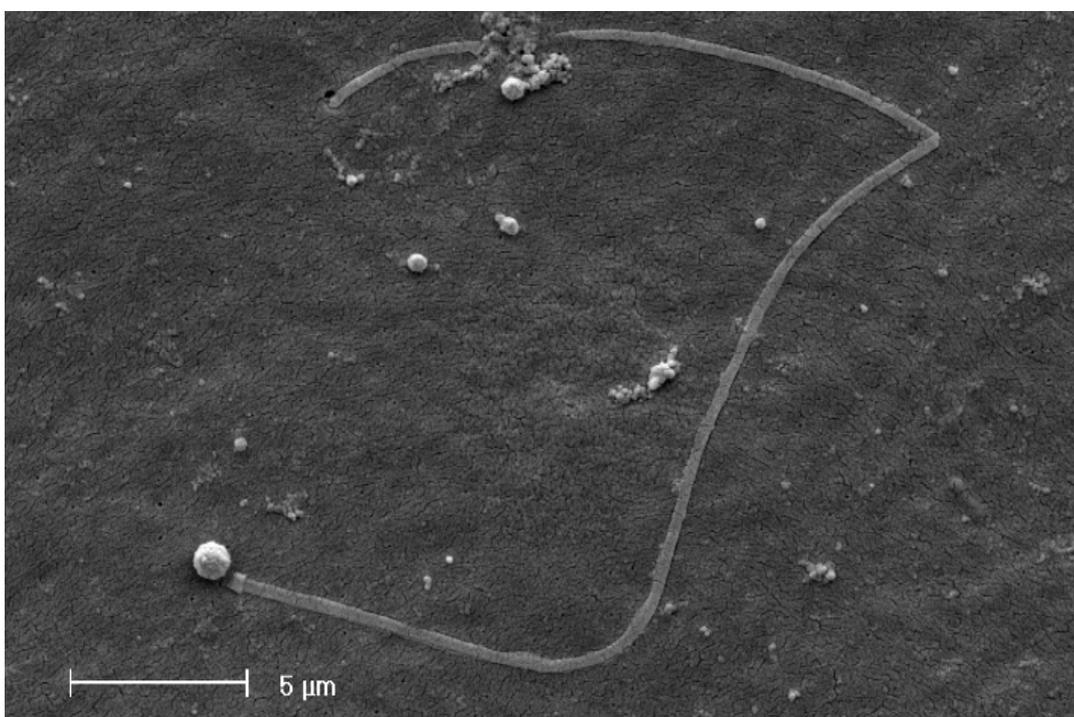


Figura 14 - Struttura osservata sulla parte interna di un tergite addominale maschile di *Supella longipalpa*.

Strutture del tutto analoghe sono state riscontrate in questo studio anche negli esemplari maschi di *S. longipalpa* (fig. 14). Lo studio del comportamento riproduttivo, descritto nel capitolo I, ha confermato che anche nei maschi di *S. longipalpa*, proprio come in *B. germanica* (Gemeno & Schal, 2004), si ha produzione di un attrattivo efficace a breve distanza, prodotto dalle ghiandole tergalì (fig. 15) e coinvolto in alcune fasi dell'accoppiamento. Si ipotizza per questo motivo anche gli esemplari maschi di *S. longipalpa* producano ed emettano un feromone sessuale o afrodisiaco in grado di attrarre le femmine. Come già accennato, tale feromone potrebbe avere un breve range di efficacia, analogamente al secreto delle ghiandole tergalì dei maschi stessi, oppure potrebbe essere prodotto e rilasciato in quantità difficilmente apprezzabili senza il ricorso a strumenti particolarmente sensibili, come un elettroantennografo.

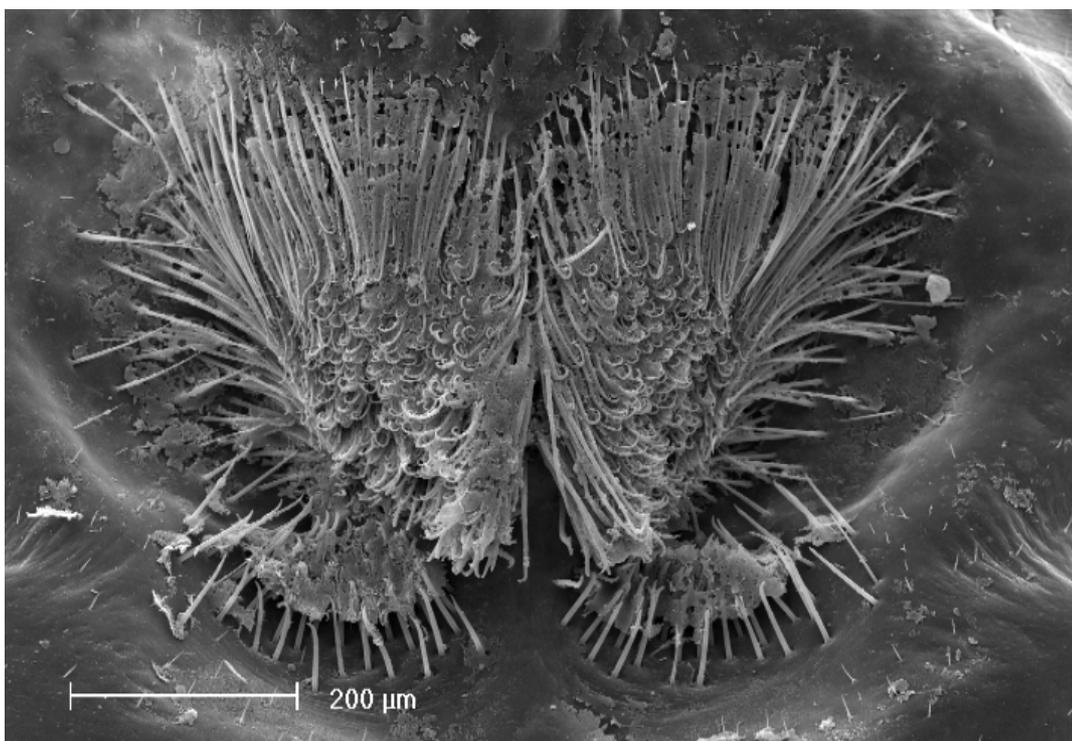


Figura 15 - Ghiandola tergalè presente sul VII tergite del maschio di *Supella longipalpa* fotografata al S.E.M..

Partendo da queste osservazioni morfologiche sono state predisposte alcune verifiche in olfattometro per vedere se esiste una correlazione tra la presenza delle strutture osservate e l'eventuale risposta comportamentale. Queste prove verranno descritte nel capitolo successivo.

## **BIBLIOGRAFIA**

GEMENO C., SCHAL C., 2004 – Sex Pheromones of Cockroaches – *Advances in Insect Chemical Ecology* (R.T. Carde and J. Millar, Eds.), Chapter 6, pp. 179-247, Cambridge University Press, New York.

SCHAL C., LIANG D., HAZARIKA L.K., CHARLTON R.E., ROELOFS W.L., 1992 – Site of pheromone production in female *Supella longipalpa* (Dictyoptera: Blattellidae): behavioral, electrophysiological, and morphological evidence. – *Annals of the Entomological Society of America*: 85(5): 605-611.

SMITH A.F., SCHAL C., 1991 – Circadian calling behaviour of the adult female brown-banded cockroach, *Supella longipalpa* (F.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Insect Behavior*, 4: 1-14.

# CAPITOLO III

## CAPITOLO III

### **RISPOSTE COMPORTAMENTALI DI *SUPELLA LONGIPALPA* NEI CONFRONTI DI SOSTANZE FEROMONICHE E VARI ATTRATTIVI ALIMENTARI**

Con l'aumento della consapevolezza del possibile pericolo rappresentato dalla dispersione di principi attivi insetticidi nell'ambiente, è progressivamente aumentato l'interesse verso prodotti eco-compatibili in grado di portare comunque in modo efficace al controllo delle infestazioni di insetti. In particolare negli ultimi decenni la ricerca si è orientata verso lo studio dei feromoni sessuali, soprattutto dei Lepidotteri. Questi sono costituiti da miscele di molecole chimiche specie-specifiche che hanno un elevato potenziale per il monitoraggio, la cattura di massa, le tecniche di confusione sessuale e disorientamento, nonché per le strategie di “*attract-and-kill*” applicabili per numerosi insetti.

Già da prove condotte in laboratorio e in campo negli anni '70 e '80 (Bell *et al.*, 1977, 1984; Waldow & Sass, 1983; Takahashi *et al.*, 1988) era noto che l'impiego di feromone sessuale di *Periplaneta americana* era in grado di incrementare il numero di catture di esemplari maschi e inoltre di ridurre la repellenza agli insetticidi, garantendo migliori risultati nelle disinfestazioni.

I sistemi di monitoraggio e lotta alle blatte attualmente disponibili in commercio, che basano la loro efficacia sulla capacità attrattiva nei confronti delle blatte, sono scarsamente efficaci verso *S. longipalpa* (Moore &

Granovsky, 1983), e poiché il feromone sessuale emesso dalla femmina di questa specie è stato identificato (Charlton *et al.* 1993) e sintetizzato (Fujita & Mori, 2001), si ritiene che dopo le necessarie sperimentazioni, possa essere valutata una sua possibile applicazione pratica.

Le osservazioni morfologiche effettuate su *S. longipalpa* descritte nel capitolo II, hanno evidenziato la presenza, in particolare sulle femmine, di strutture che sembrano coinvolte nella produzione e nel rilascio di sostanze feromoniche; in questo capitolo vengono mostrati i risultati di prove condotte in olfattometro impiegando come attrattivi varie parti del corpo di *S. longipalpa* e in particolare di tergiti addominali (sui quali erano state osservate le strutture menzionate) per valutare le eventuali risposte comportamentali indotte in individui conspecifici.

Inoltre si ritiene utile valutare quali attrattivi alimentari siano maggiormente appetiti da questo Blattellide, essendo anch'essi una componente importante delle esche; feromoni e attrattivi alimentari idonei potrebbero essere utilizzati unitamente per incrementare l'efficacia della trappole a fondo adesivo (Schal & Hamilton, 1990; Liang *et al.*, 1998).

## **MATERIALI E METODI**

Per i tests è stato utilizzato un olfattometro a “doppia scelta”, simile a quello utilizzato da altri autori in lavori precedenti con Blattellidi (Tokro *et al.*, 1993; Nalyanya & Schal, 2001), già descritto nella sezione “Materiali e Metodi generali”. Sia per le prove eseguite usando come attrattivo alcune parti dell'insetto, sia per quelle con attrattivi alimentari, il flusso d'aria è stato regolato su 250 ml/min per ogni braccio, per un totale di 0,5 litri/min nel braccio principale (Wileyto & Boush, 1983).

## **Biosaggi in olfattometro**

Per le verifiche dell'attrattività di parti del corpo di *S. longipalpa*, sono state adottate le seguenti metodologie:

a) Sono stati asportati dall'addome di una femmina di *S. longipalpa* di 5 giorni di età (in fase di richiamo sessuale) i tergiti addominali (fino allo strato ipodermico) e, dopo omogeneizzazione, sono immediatamente stati introdotti nel porta-campione; 50 individui maschi di *S. longipalpa* sono stati introdotti nella gabbietta all'estremità sottovento dell'olfattometro, uno alla volta, e dopo un tempo di acclimatamento di 10 minuti, è stata osservata la risposta, dando un tempo massimo di reazione di 5 minuti. In accordo con quanto osservato da Liang & Schal (1990a, 1990b), le prove olfattometriche sono state effettuate durante la scotofase. La prova è stata considerata positiva qualora l'insetto avesse trascorso almeno 1 minuto consecutivo nel braccio dell'olfattometro ove era posto l'attrattivo da valutare.

b) Una prova è stata condotta, sempre con 50 maschi adulti, ponendo in un braccio dell'olfattometro il "controllo" ossia carta da filtro bagnata con acqua distillata, e lasciando vuoto l'altro braccio. In questo modo si è inteso osservare il comportamento degli insetti in olfattometro in assenza di attrattivo.

c) Differentemente da quanto descritto nel punto a), anziché omogeneizzare varie parti di addome, i tergiti sono stati saggiati separatamente; non tutti i tergiti sono stati impiegati in questo tipo di prove ma solo quelli che nelle osservazioni al microscopio biologico avevano mostrato un'alta densità di pori cuticolari (dal II all'VIII). La dissezione dell'addome per la separazione dei tergiti è avvenuta sotto un microscopio stereoscopico; per evitare contaminazioni sono state utilizzate forbici e spilli differenti per i vari tergiti e l'attrezzatura è stata lavata con acetone prima di

un nuovo utilizzo. Per queste prove sono stati utilizzati tergiti addominali femminili per vedere quali inducessero nei maschi il comportamento di “corteggiamento”. Il biosaggio è stato effettuato impiegando 20 individui maschi per ogni attrattivo; dato l’elevato numero di maschi necessari per effettuare questi test, alcuni insetti sono stati utilizzati più di una volta, lasciando trascorrere 24 ore tra una prova e la successiva.

d) Alcune prove di confronto sono state effettuate utilizzando come attrattivo un omogeneizzato dei soli sterniti addominali femminili e di testa+torace di femmine di *S. longipalpa*.

e) Alcuni tests sono altresì stati condotti immettendo nella cella porta campione dell’olfattometro, tergiti addominali maschili di *S. longipalpa* (V e VI e VII); in questo caso si è valutata la risposta di 20 femmine della stessa specie.

### **Attrattivi alimentari**

I tests sono stati effettuati con individui adulti di entrambi i sessi, e con neanidi a partire dalla seconda età; sono stati impiegati 10 maschi, 10 femmine e 20 neanidi per ogni attrattivo alimentare saggiato.

Le modalità di esecuzione sono state le seguenti: nelle prove effettuate ogni insetto ha avuto a disposizione 5 minuti per effettuare la sua scelta; anche in questo caso sono stati lasciati 8-10 minuti di acclimatamento ad ogni insetto. La prova è stata considerata positiva nel caso la blatta avesse raggiunto l’estremità dell’olfattometro contenente l’attrattivo in esame e lì avesse trascorso almeno un minuto ed è stato registrato anche il tempo trascorso sull’alimento, dando un massimo di 2 minuti. Al contrario l’esito è stato considerato negativo nel caso in cui la blatta avesse trascorso un minuto nell’estremità senza attrattivo o nel braccio principale dell’olfattometro, oppure nel caso non si fosse mossa dalla gabbietta di partenza.

Per queste prove sono stati pesati, come fonte attrattiva, 5 grammi di alimento. Gli attrattivi utilizzati nei biosaggi sono stati: pellets per gatti, crackers, buccia di banana, albicocche disidratate, marmellata di pesca, noci, cioccolato al latte, cioccolato fondente, burro di arachidi, marmellata di albicocche, datteri, pane secco e biscotti frollini.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **Biosaggi in olfattometro**

a, b) I risultati delle prove olfattometriche hanno confermato quanto atteso: un'elevata percentuale di maschi reagisce positivamente allo stimolo, muovendosi dapprima in direzione della fonte attrattiva e, giunto a breve distanza dal contenitore porta-campioni, mostra un comportamento assai simile a quello registrato nelle osservazioni sul comportamento riproduttivo descritte nel capitolo I: in prossimità dell'attrattivo i maschi muovono rapidamente le antenne e dopo alcuni istanti fanno vibrare le ali, quindi le discostano dall'addome mostrando i tergiti addominali.

Su 50 maschi (per ogni attrattivo) di *S. longipalpa* introdotti nell'olfattometro, 41 hanno risposto positivamente all'omogeneizzato ottenuto dai tergiti addominali femminili (82%) ( $\chi^2 = 35,372$ ,  $P = 0$ ). Questo dato sembrerebbe confermare l'ipotesi che i siti di produzione ed emissione del feromone sessuale siano localizzati, nelle femmine di *S. longipalpa*, proprio sui tergiti addominali, come ipotizzato dagli studi al S.E.M., descritti nel capitolo II.

La prova condotta senza attrattivo, ha portato ad avere un'elevata percentuale di insetti che non hanno risposto (94%), non muovendosi dalla gabbia di partenza o vagando per l'olfattometro senza sostare per oltre 1

minuto in nessun braccio (destro o sinistro della “Y”). Questo test ha permesso di verificare che in assenza di attrattivo (o in presenza di attrattivo non efficace come il “controllo”) la blatta non necessariamente effettua una scelta; di ciò è stato tenuto conto nell’elaborazione dei dati ottenuti dalle prove olfattometriche, e, come già spiegato nella sezione “Materiali e Metodi generali - Biosaggi in olfattometro”, non sono stati considerati ai fini statistici gli insetti che non hanno effettuato alcuna scelta nell’olfattometro. Il grafici che seguono mostrano la proporzione tra risposte positive, risposte al controllo e assenza di risposta, nelle prove effettuate con omogeneizzato dei tergiti addominali femminili e nella prova condotta senza attrattivo.

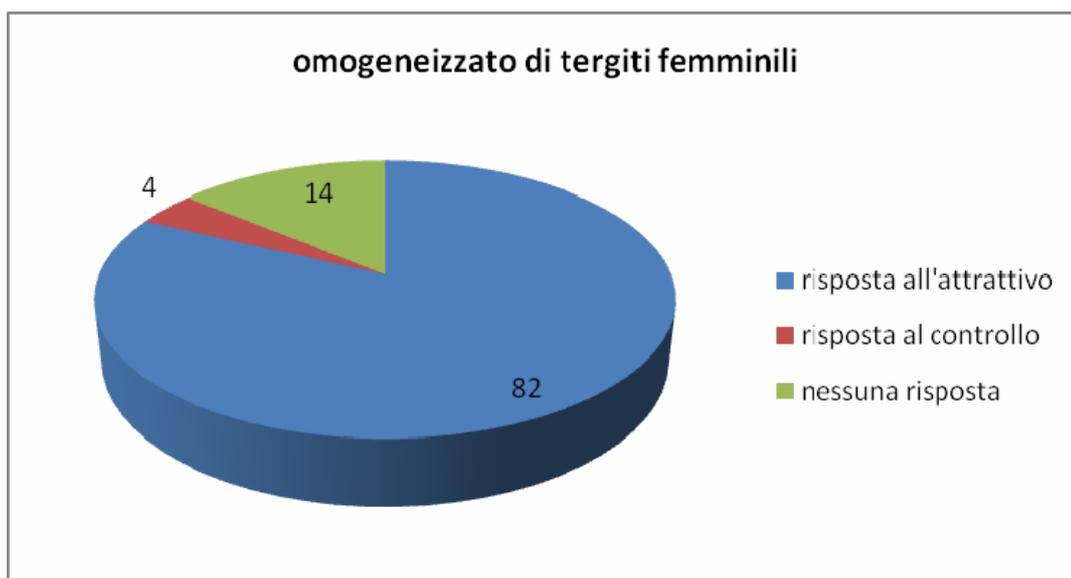


Grafico 1 - Percentuale di risposta a omogeneizzato di tergiti femminili da parte di maschi di *Supella longipalpa*.

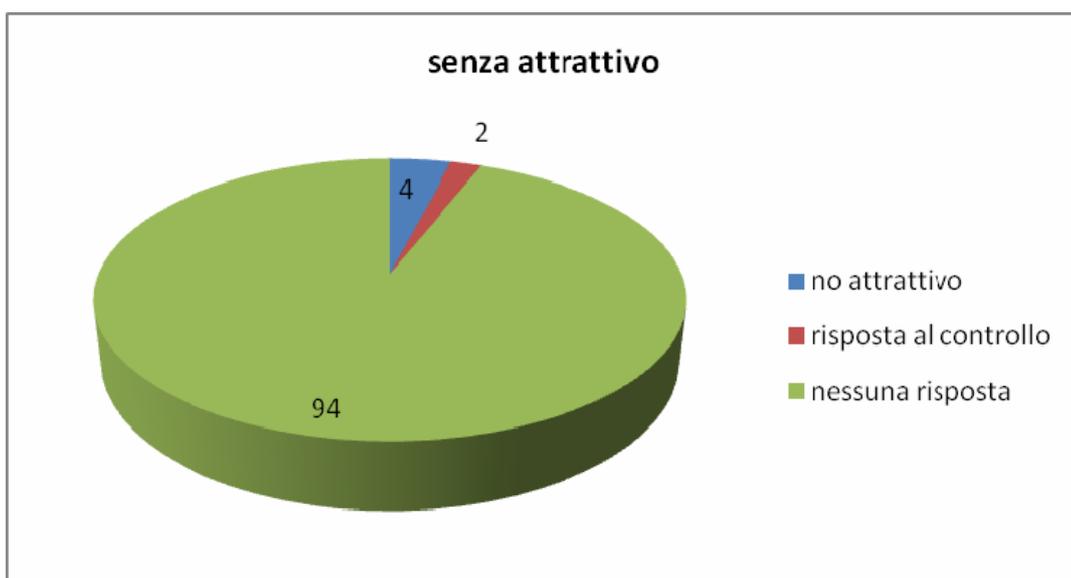


Grafico 2 - Risposte di *Supella longipalpa* in olfattometro in assenza di attrattivo.

c, d) I dati relativi ai maschi adulti di *S. longipalpa* attratti dai singoli tergiti addominali e dagli omogeneizzati di sterniti e di testa+torace, tutti di individui femmine, sono mostrati nel grafico 3.

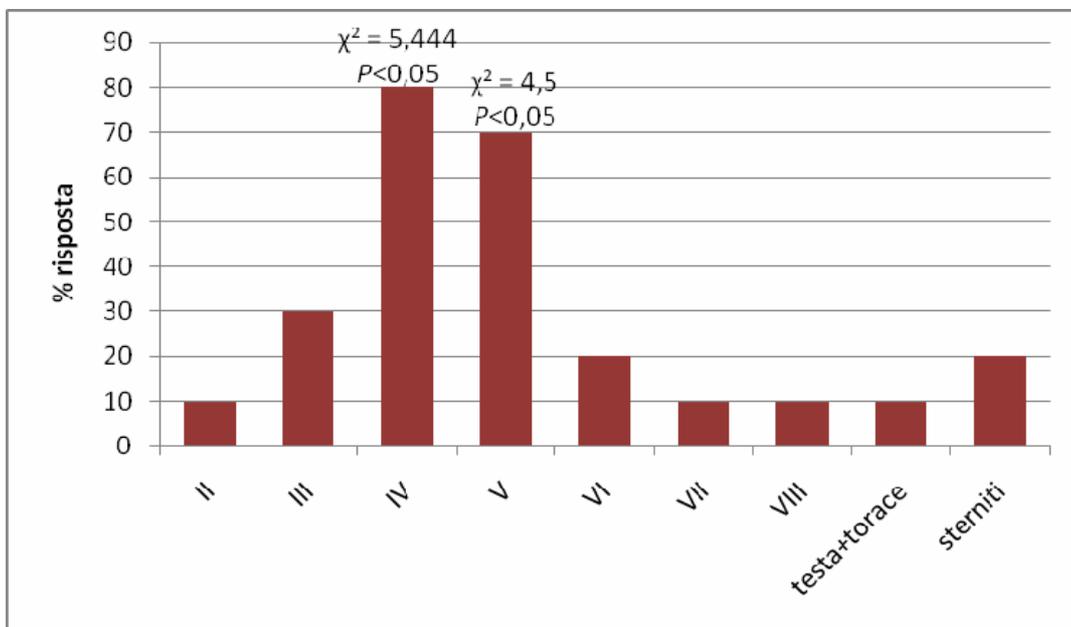


Grafico 3 - Percentuale di risposta di maschi di *Supella longipalpa* a tergiti addominali e altre parti del corpo di femmine conspecifiche.

I risultati confermano l'ipotesi che sono proprio i tergiti ad esercitare il maggior grado di attrattività nei confronti dei maschi, mentre scarse risposte positive si sono avute con altre parti del corpo di femmine. I tergiti che hanno mostrato il maggior potere attrattivo sono stati il IV e il V. I risultati ottenuti con questi tergiti sono statisticamente significativi: per il IV  $\chi^2 = 5,444$ ,  $P < 0,05$  e per il V  $\chi^2 = 4,5$ ,  $P < 0,05$  (sia per il III sia per VI tergite  $P > 0,05$ ). Questo concorda con le osservazioni effettuate al microscopio, rivelando una chiara correlazione tra il numero di piccoli pori cuticolari osservati ed il potere attrattivo. Con ogni probabilità questo indica che tali strutture sono coinvolte nella produzione e/o nel rilascio del feromone sessuale.

e) I biosaggi effettuati per valutare l'eventuale attrattività di tergiti addominali maschili nei confronti di femmine hanno fornito i risultati seguenti: l'attrattività del V e VI tergite è stata solo del 20% mentre quella del VII tergite (ovvero quello in cui sbocca la ghiandola che produce un secreto di cui si ciba la femmina immediatamente prima dell'accoppiamento) è stata del 30%; ciò può essere dovuto al fatto che l'eventuale feromone sessuale/afrodisiaco prodotto dal maschio sia efficace solo a breve distanza o sia prodotto e rilasciato in quantità minime. In questo caso informazioni più dettagliate potranno essere fornite con l'ausilio di tecniche di studio elettroantennografiche.

### **Attrattivi alimentari**

Nei grafici 4, 5, 6 e 7 è indicata la percentuale di individui di *S. longipalpa* che hanno risposto in maniera positiva ai vari attrattivi alimentari, divisi in maschi, femmine, neanidi, e media di tutti gli stadi. Come si può notare, sebbene le differenze non siano significative, le

femmine hanno spesso risposto in percentuale maggiore, seguite dalle neanidi, mentre le risposte minori si sono avute nei maschi.

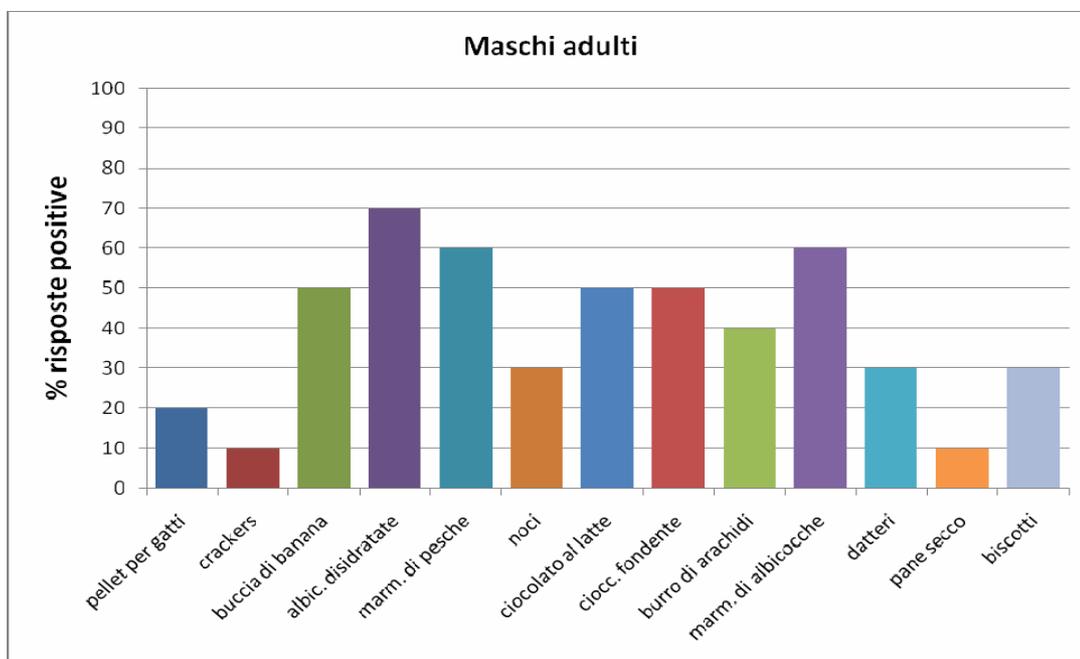


Grafico 4 - Percentuale di risposte positive di maschi di *Supella longipalpa* a vari attrattivi alimentari, prove in olfattometro.

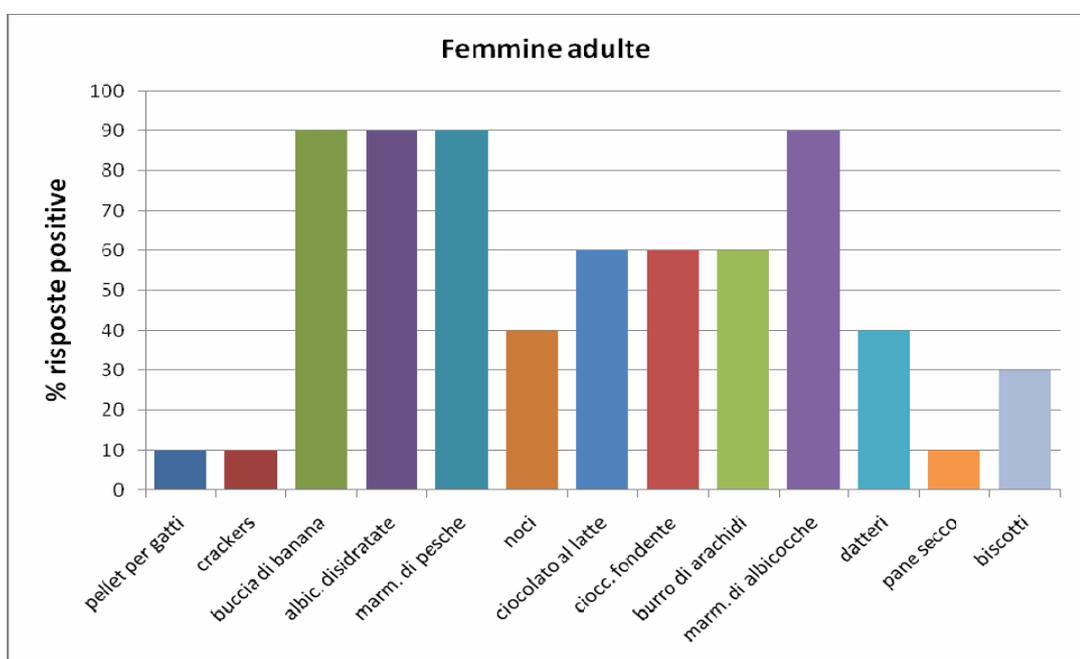


Grafico 5 - Percentuale di risposte positive di femmine di *Supella longipalpa* a vari attrattivi alimentari, prove in olfattometro.

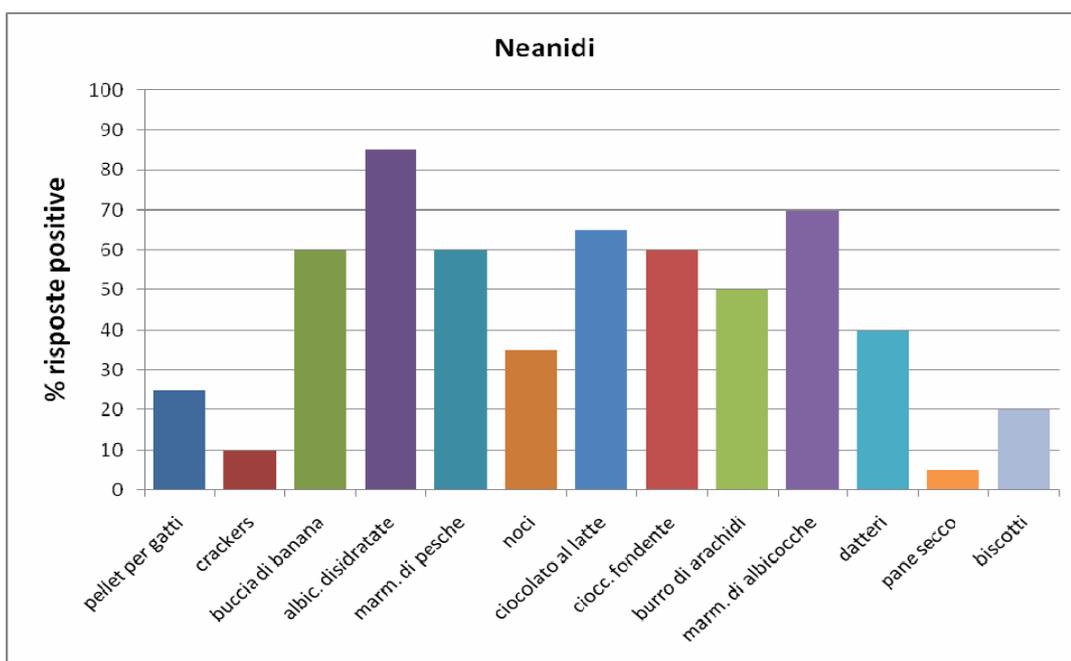


Grafico 6 - Percentuale di risposte positive di neanidi di *Supella longipalpa* a vari attrattivi alimentari, prove in olfattometro.

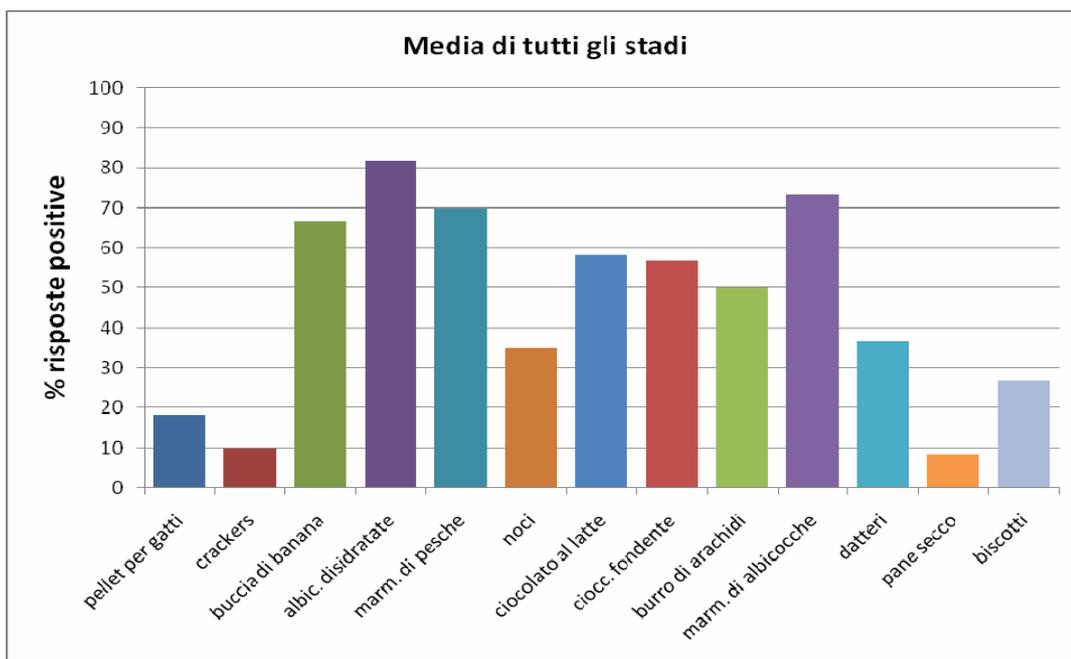


Grafico 7 - Percentuale di risposte positive (media di tutti gli stadi) in *Supella longipalpa* a vari attrattivi alimentari, prove in olfattometro.

La tabella 1 e i grafici che seguono mostrano invece il tempo medio trascorso sull'alimento  $\pm$  l'errore standard della media (nei grafici indicato dalle barre); anche in questo caso le femmine adulte hanno trascorso un tempo medio sull'alimento superiore a quello di maschi adulti e neanidi.

	maschi	femmine	neanidi	media
pellet per gatti	3,5 $\pm$ 1,5	10,00	7,8 $\pm$ 1,24	7 $\pm$ 1,13
crackers	4,00	6,00	6 $\pm$ 2	5,5 $\pm$ 0,96
buccia di banana	29,8 $\pm$ 4,27	43,11 $\pm$ 5,16	34,83 $\pm$ 6,72	36,73 $\pm$ 3,7
albicocche disidratate	41,57 $\pm$ 9,24	56,56 $\pm$ 5,94	55,94 $\pm$ 4,8	53,06 $\pm$ 3,59
marmellata di pesche	27,5 $\pm$ 4,12	44,44 $\pm$ 7,11	38,25 $\pm$ 3,77	37,92 $\pm$ 3,17
noci	12,67 $\pm$ 4,63	14,5 $\pm$ 2,78	13,57 $\pm$ 3,21	13,64 $\pm$ 1,91
cioccolato al latte	14 $\pm$ 4	12,83 $\pm$ 4,94	12,46 $\pm$ 3,03	12,88 $\pm$ 2,13
cioccolato fondente	5,8 $\pm$ 1,69	5,17 $\pm$ 1,14	4,67 $\pm$ 0,43	5,04 $\pm$ 0,5
burro di arachidi	23,5 $\pm$ 2,53	24,83 $\pm$ 5,28	22,7 $\pm$ 2,97	23,5 $\pm$ 2,13
marmellata di albicocche	30,83 $\pm$ 6,1	50,67 $\pm$ 6,98	42,07 $\pm$ 6,98	42,41 $\pm$ 4,28
datteri	13 $\pm$ 2,52	20,5 $\pm$ 1,58	18,25 $\pm$ 3,51	17,8 $\pm$ 2,04
pane secco	6,00	6,00	3,00	5 $\pm$ 1
biscotti	9,67 $\pm$ 1,45	12,33 $\pm$ 3,18	9,75 $\pm$ 0,63	10,5 $\pm$ 1,01

Tabella 1 - Tempo medio trascorso su attrattivi alimentari da *Supella longipalpa*.

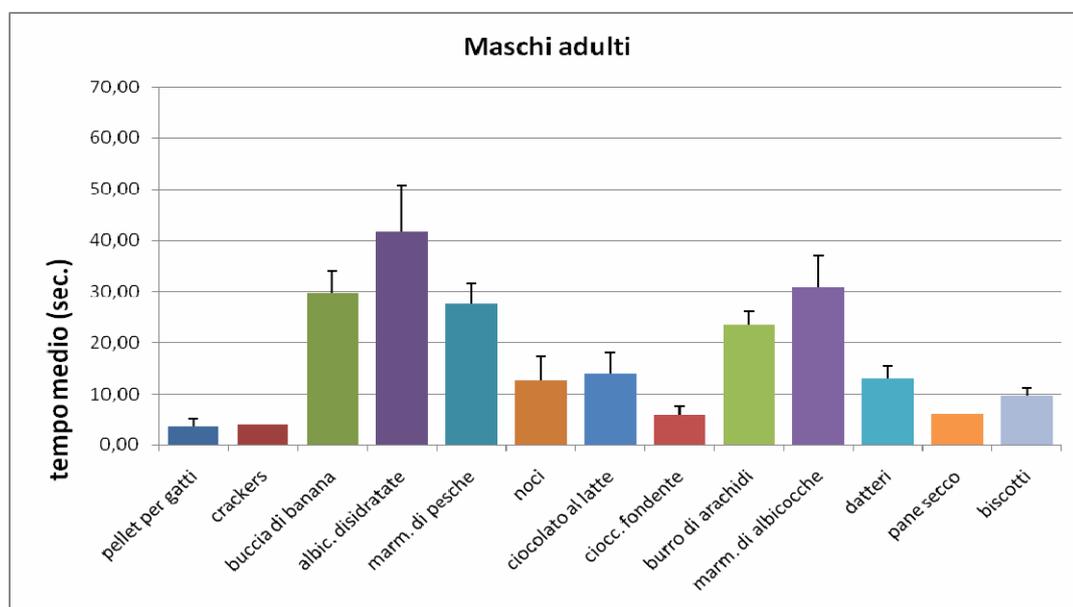


Grafico 8 - Tempo medio (secondi) trascorso su vari attrattivi alimentari da maschi di *Supella longipalpa*.

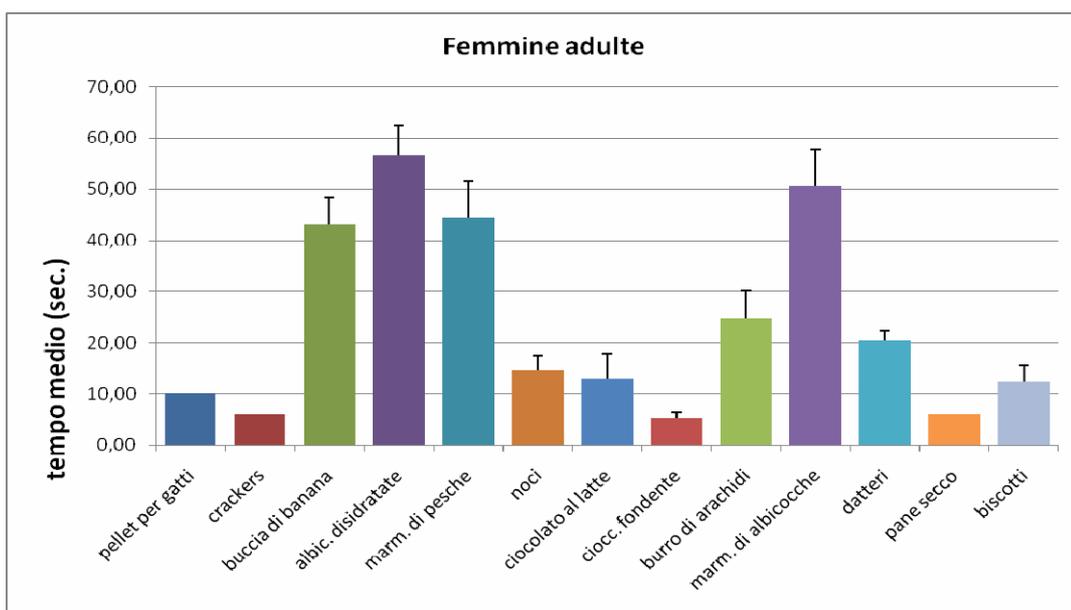


Grafico 9 - Tempo medio (secondi) trascorso su vari attrattivi alimentari da femmine di *Supella longipalpa*.

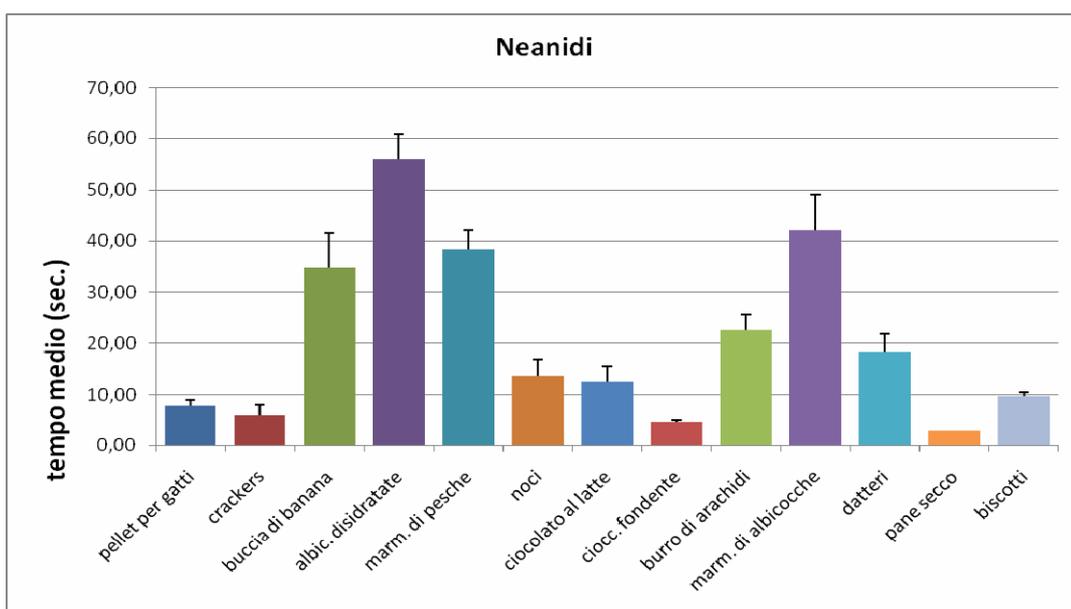


Grafico 10 - Tempo medio (secondi) trascorso su vari attrattivi alimentari da neanidi di *Supella longipalpa*.

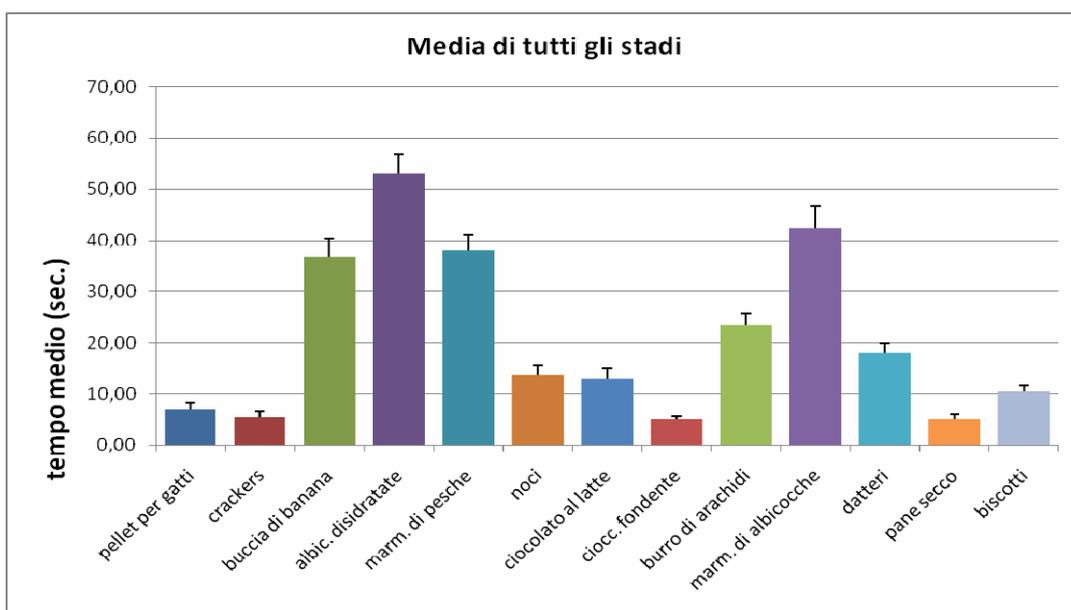


Grafico 11 - Tempo medio (secondi) trascorso su vari attrattivi alimentari in *Supella longipalpa* (media di tutti gli stadi).

Il grafico 12 mostra le percentuali di risposte positive, espresse come media di tutti gli stadi e di entrambi i sessi, in relazione al tempo medio trascorso sull'alimento.

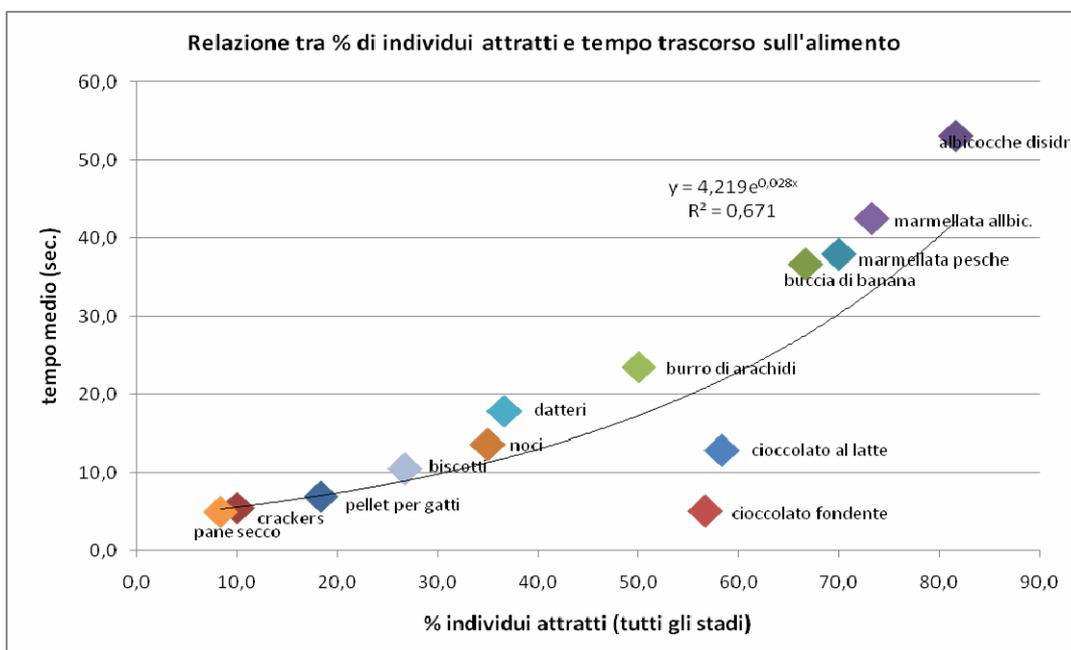


Grafico 12 - Relazione tra attrattività e appetibilità di vari attrattivi alimentari in *Supella longipalpa*.

Misurare il tempo trascorso sull'alimento ha permesso di distinguere tra attrattività e appetibilità: infatti la prima è indicata dalla percentuale di insetti attratti, mentre un indice della seconda è dato proprio dal tempo speso per consumare l'alimento, come indicato anche da Durier & Rivault (2000a).

Dai risultati qui mostrati si evince che *S. longipalpa* mostra predilezione per cibi zuccherini e con elevato contenuto in acqua. Nel grafico si nota una chiara correlazione tra la percentuale di individui attratti e il tempo medio trascorso sull'alimento: nel caso di buccia di banana, albicocche disidratate e marmellata di pesche, ad esempio, ad una buona attrattività del prodotto è corrisposto un tempo medio-lungo trascorso sull'attrattivo stesso, segno di una buona appetibilità e di gradimento dell'alimento. Questa relazione è rappresentata in grafico dalla linea di tendenza la cui equazione risulta essere  $y = 4,219 e^{0,028x}$ , con  $R^2 = 0,0671$ .

Nei casi del cioccolato (al latte e fondente hanno originato circa lo stesso numero di risposte positive) si è registrato un tempo piuttosto breve di permanenza sul prodotto: evidentemente è presente in questi attrattivi una componente volatile in grado di esercitare una buona attrattività, a cui corrisponde però una scarsa appetibilità.

## **BIBLIOGRAFIA**

BELL W.J., VUTURO S.B., ROBINSON S., HAWKINS W.S., 1977 – Attractancy of the American cockroach sex pheromone (Orthoptera: Blattidae). – *Journal of Kansas Entomological Society*, 50: 503-507.

BELL W.J., FROMM J., QUISUMBING A.R., KYDONIEUS A.F., 1984 – Attraction of the American Cockroaches (Orthoptera: Blattidae) to traps containing Periplanone B and to insecticide-Periplanone B mixtures. – *Environmental Entomology*, 13: 448-450.

- CHARLTON R.E., WEBSTER F.X., ZHANG A., SCHAL C., LIANG D., SRENG I., ROELOFS W.L., 1993 – Sex pheromone for the Brownbanded cockroach is an unusual dialkyl-substituted  $\alpha$ -pyrone. – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 90: 10202-10205.
- DURIER V., RIVAULT C., 2000a – Food bait preference in German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Proceedings of the International Conference on Urban Pests*, Praga 1999: 113-119.
- FUJITA K., MORI K., 2001 – Synthesis of (2R,4R)-supellapyrone, the sex pheromone of the Brownbanded cockroach, *Supella longipalpa*, and its three stereoisomers. – *European Journal of Organic Chemistry*, (03): 493-502.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1990a – Circadian rhythmicity and development of the behavioural response to sex pheromone in male brown-banded cockroaches, *Supella longipalpa*. – *Physiological Entomology*, 15(3): 355-361.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1990b – Effects of pheromone concentration and photoperiod on the behavioral response sequence to sex pheromone in the male brown-banded cockroach, *Supella longipalpa*. – *Journal of Insect Behavior*, 3(2): 211-223.
- LIANG D.S., ZHANG A.J., KOPANIC R.J.Jr, ROELOFS W.L., SCHAL C., 1998 – Field and laboratory evaluation of female sex pheromone for detection, monitoring and management of Brownbanded cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). - *Journal of Economic Entomology*, 91(2) 480-485.
- MOORE W.S., GRANOVSKY T.A., 1983 – Laboratory comparison of sticky traps to detect and control five species of cockroaches (Orthoptera: Blattidae and Blattallidae). - *Journal of Economic Entomology*, 76(4): 845-849.
- NALYANYA G., LIANG D.S., KOPANIC R.J.Jr, SCHAL C., 2001 – Attractiveness of insecticide bait for cockroach control (Dictyoptera: Blattellidae): laboratory and field studies. – *Journal of Economic Entomology*, 94(3): 686-693.
- SCHAL C., HAMILTON R., 1990 – Integrated suppression of synanthropic cockroaches. – *Annual Review of Entomology*, (35): 521-551.

- TAKAHASHI S., TAKEGAWA H., TAKABAYASHI J., ABDULLAH M., FATIMAH A.S., MOHAMED M., 1988 – Sex pheromone activity of synthetic Periplanone-B in male cockroaches of Genera *Periplaneta* and *Blatta*. – *Journal of Pesticide Science*, 13: 125-127.
- TOKRO P.G., BROSSUT R., SRENG L., 1993 – Mise en evedence de la pheromone sexuelle chez les femelles de *Blattella germanica* L.. – *Insect Science Application*, 14(1) : 115-126.
- WALDOW U., SASS H., 1983 – The attractivity of the female sex pheromone of *Periplaneta americana* and its components for conspecific males and males of *Periplaneta australasiae* in the field. – *Journal of Chemical Ecology*, 10(7): 997-1006.
- WILEYTO E.P., BOUSH G.M., 1983 – Attraction of the German cockroach, *Blattella germanica* (Orthoptera: Blatellidae), to some volatile food components. – *Journal of Economic Entomology*, 76: 752-756.

# CAPITOLO IV

## CAPITOLO IV

### **RISPOSTE COMPORTAMENTALI INTRA- E INTER-SPECIFICHE DELLE BLATTE SINANTROPICHE IN ITALIA, A ESTRATTI FECALI**

È noto che le blatte producono un feromone di aggregazione che si ritrova nei loro escrementi (Roth & Cohen, 1973; Sakuma & Fukami, 1985; Scherkenbeck *et al.*, 1999); essendo un importante mezzo di comunicazione, si pensa che possa essere sfruttato per modificare il loro comportamento, ad esempio addizionandolo a esche insetticide per aumentarne il potere attrattivo e ridurre la repellenza (Miller *et al.*, 1997).

Il feromone contenuto nel materiale fecale è una combinazione di composti volatili e non volatili, principalmente ammine e glicosidi steroidei (Sakuma & Fukami, 1990, 1993a, 1993b). Tali componenti agiscono in sinergia per attirare altri insetti conspecifici, e talvolta anche insetti di specie affini (Bell *et al.*, 1972; Seelinger, 1984; Rust & Appel, 1985), e fungono da “arrestante” (Kennedy, 1978) riducendo i movimenti degli individui che sono venuti a contatto con la fonte del feromone. Questo tipo di feromone è responsabile del comportamento aggregativo tipico di molte specie di blattoidei.

Con questo studio si è inteso valutare l'efficacia di semplici estratti ottenuti da escrementi delle quattro principali specie di blatte sinantropiche presenti in Italia, sia nei confronti di individui conspecifici sia di individui di specie affini, allo scopo di valutare una possibile applicazione pratica del feromone di aggregazione.

## MATERIALI E METODI

### Estratti fecali

Le metodologie impiegate per la raccolta del materiale fecale e la preparazione di estratti sono descritte nel capitolo “Materiali e Metodi generali”.

### Aggregazione in *Blattella germanica*

Per verificare l'importanza dell'aggregazione in *Blattaria*, sono stati eseguiti alcuni tests in arena. Sono stati posti ai quattro angoli di una arena in materiale plastico bianco (misure interne 100 x 100 x 12 cm) altrettanti nidi/rifugi costituiti da cartoni per uova (circa 10 x 10 cm) (figg. 1 e 2); in ogni angolo sono stati rilasciati 5 esemplari di *B. germanica* (20 in totale nell'arena) per tre repliche contemporanee in condizioni microclimatiche controllate ( $21,7 \pm 1,7$  °C e  $52 \pm 5,1$ % U.R., fotoperiodo l:d = 12:12).



Figura 1 - Disposizione dei nidi nell'arena. Figura 2 - Particolare del nido/rifugio.

Ogni 24 ore, durante la fotofase, si è osservata la distribuzione degli insetti introdotti nell'arena, sollevando i cartoni per uova e contando gli insetti presenti, fino a 10 giorni dall'inizio della prova.

Successivamente a queste prime prove, sono state condotte altre 3 repliche con le stesse modalità, ponendo però in uno dei quattro angoli, sotto il cartone per uova, un disco di carta da filtro (*Filter paper circles* - Schleicher & Schuell) bagnato con 500  $\mu$ l di estratto fecale di *B. germanica*. Anche in questo caso si è provveduto a contare, ogni 24 ore, le blattelle presenti sotto i cartoni.

### **Prove preliminari di verifica degli estratti fecali**

Per verificare se effettivamente gli estratti fecali contenessero i feromoni di aggregazione (o componenti attrattivi del *bouquet* feromonico), solitamente rilasciati dalle blatte nelle feci, sono state condotte alcune prove preliminari in olfattometro (è stato utilizzato l'olfattometro a "doppia scelta", costruito in plexiglas, con un tubo avente diametro interno di 24 mm e spessore 2 mm, descritto dettagliatamente in "Materiali e Metodi generali"), confrontando l'attrattività di estratti fecali in acqua e in metanolo con un frammento di carta da filtro lasciato per 14 giorni in un contenitore di allevamento massale; come controllo è stata utilizzata carta da filtro bagnata con acqua distillata. Le suddette prove preliminari hanno previsto l'impiego di 10 esemplari di *B. germanica* (maschi e femmine di tutti gli stadi, *random*) per ogni attrattivo saggiato.

Nelle prove effettuate ogni insetto ha avuto a disposizione 5 minuti per effettuare la sua scelta. La prova è stata considerata positiva nel caso la blatta avesse raggiunto come prima scelta l'estremità dell'olfattometro contenente l'attrattivo in esame e si fosse soffermata per almeno 1 minuto consecutivo nella parte terminale del braccio con l'attrattivo (per evitare di considerare come positive anche eventuali "scelte casuali"). Al contrario l'esito è stato considerato negativo nel caso in cui la blatta avesse raggiunto come prima scelta l'estremità senza attrattivo e avesse trascorso la maggior

parte del tempo a disposizione in quel braccio. L'insetto è stato scartato qualora avesse trascorso oltre un minuto consecutivo nel braccio principale oppure nel caso non si fosse mossa dalla gabbietta di partenza. È stato registrato anche il tempo impiegato per raggiungere l'attrattivo.

### **Attrattività dell'estratto a diverse concentrazioni**

Per valutare l'eventuale necessità di diluizione degli estratti fecali ottenuti, per eseguire i biosaggi successivi, sono state condotte prove olfattometriche con individui di *B. germanica* (maschi e femmine di tutti gli stadi) impiegando come attrattivo: estratto "tal quale", estratto a diluizione 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100. Sono stati utilizzati 10 insetti per ogni diluizione e la verifica è stata effettuata sia per l'estratto in metanolo sia per quello in acqua.

### **Attrattività intra- e inter-specifica degli estratti fecali**

I tests comportamentali sono stati condotti in olfattometro; il flusso d'aria è stato regolato su 250 ml/min per ogni braccio, per un totale di 0,5 litri/min nel braccio principale.

Sono stati impiegati esemplari adulti di entrambi i sessi e neanidi a partire dalla seconda età di *B. germanica*, *S. longipalpa*, *B. orientalis* e *P. americana*.

Sono stati effettuati tests con estratti fecali ottenuti con acqua e con metanolo (separatamente) delle quattro specie sopra elencate. È stato quindi valutato il potere attrattivo di ogni estratto nei confronti di insetti (10 maschi + 10 femmine + 20 neanidi) di ogni specie. Ogni insetto è stato impiegato per un solo test, dopodiché è stato reintrodotta in appositi contenitori di allevamento ed eventualmente riutilizzato dopo almeno 3 giorni.

Ad un'estremità dell'olfattometro, scelta casualmente, è stato posto un pezzo di carta da filtro (circa 24 cm<sup>2</sup>) imbevuto con 500 µl di estratto fecale alla diluizione 1:10, mentre all'altra estremità è stata posta carta da filtro imbevuta con la stessa quantità di acqua bidistillata come controllo. Per le prove effettuate con estratti in metanolo è stato effettuato anche un controllo con carta da filtro imbevuta di solo metanolo per verificare eventuali interazioni (n=10).

Le modalità con cui è stata giudicata positiva o negativa ogni prova sono le stesse descritte poco sopra per le prove preliminari.

### **Localizzazione dei sensilli deputati a recepire il feromone di aggregazione in *B. germanica* e *S. longipalpa***

Alcuni brevi tests sono stati condotti in olfattometro con insetti "antennectomizzati", ai quali sono state cioè recise le antenne per verificare quale parte è coinvolta nella captazione delle molecole che costituiscono il feromone di aggregazione. L'antenna è stata idealmente divisa in 3 parti uguali e a 10 individui di *B. germanica* e altrettanti di *S. longipalpa* ne è stato reciso 1/3, successivamente 2/3 e dopo ancora è stata asportata l'antenna completa. Questi insetti sono stati sottoposti ad una prova olfattometrica con estratto fecale (della medesima specie) in metanolo al 10%. Il taglio delle antenne è stato effettuato con una lametta e con l'aiuto di un microscopio stereoscopico; gli insetti sottoposti a tale procedura sono stati utilizzati per le prove dopo 24 ore circa per evitare che lo stress dovuto a questa operazione influisse sul loro comportamento.

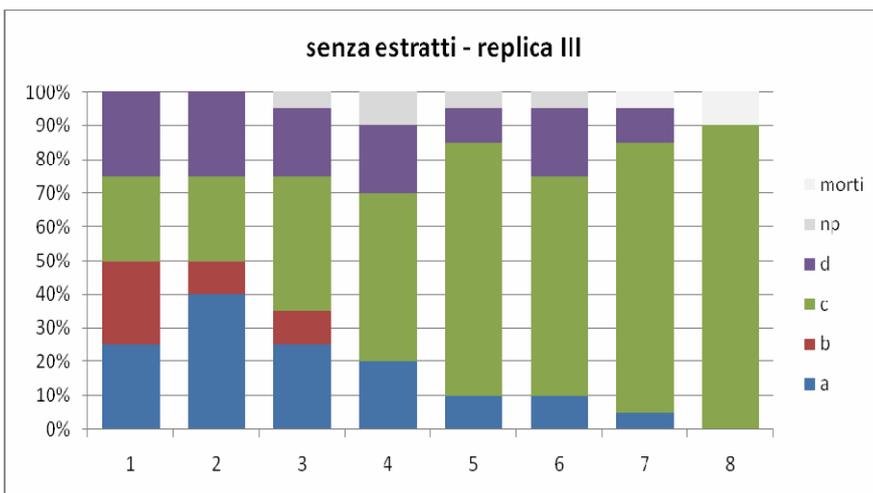
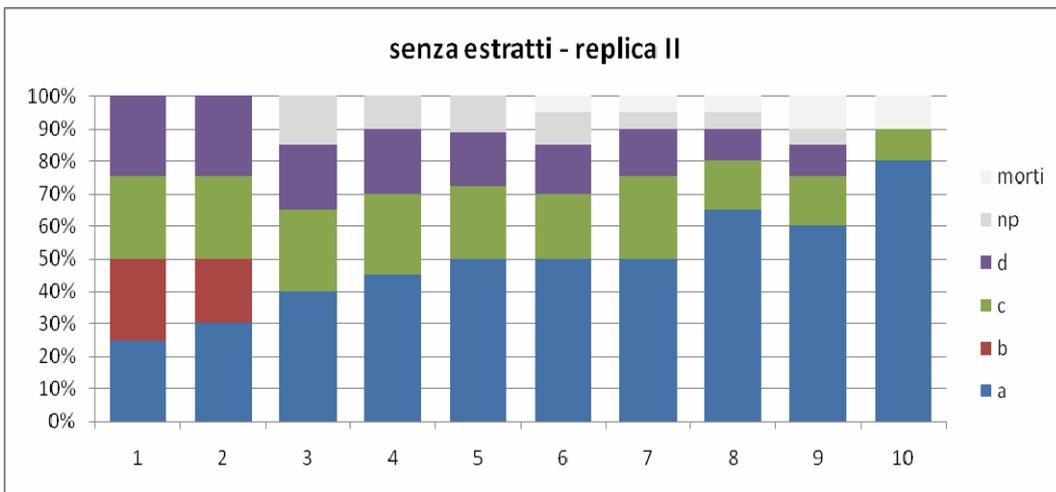
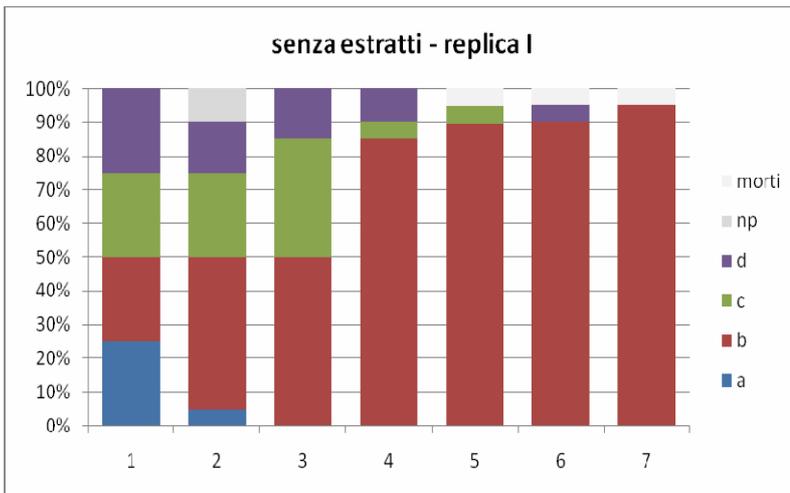
## RISULTATI E DISCUSSIONE

### **Aggregazione in *Blattella germanica***

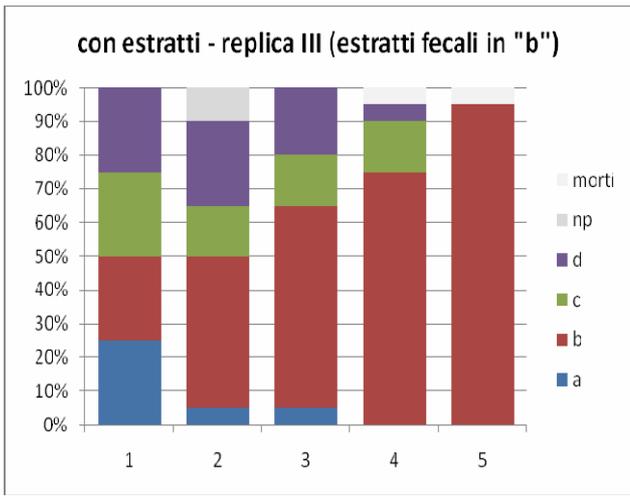
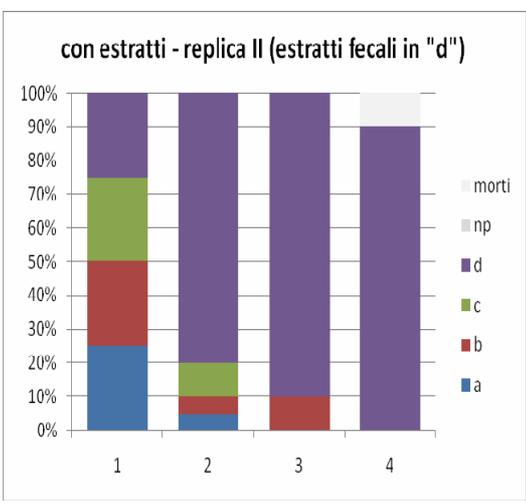
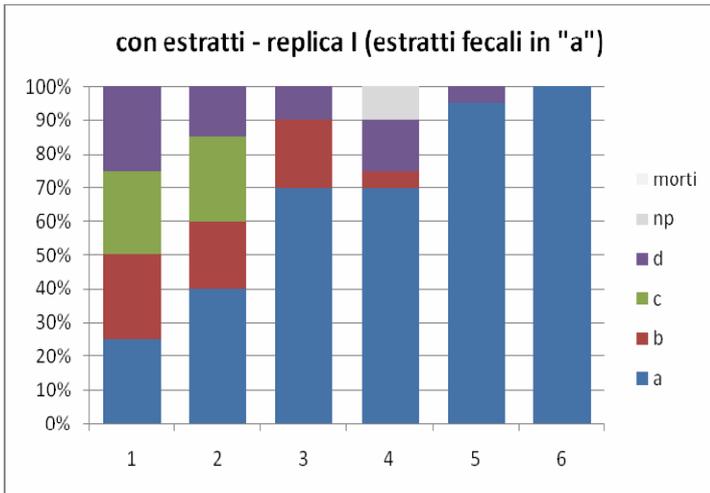
In due repliche su tre si è avuta rispettivamente in 6 e 8 giorni una totale aggregazione spontanea degli individui presenti nell'arena, in uno dei quattro nidi; nella restante replica si è comunque ottenuta un'aggregazione dell'89% degli individui al decimo giorno dall'introduzione degli insetti nell'arena.

Nelle prove in cui era stato posto sotto uno dei cartoni per uova scelto a caso, un disco di carta da filtro bagnato con estratti fecali, si è registrata in tutte le repliche l'aggregazione di tutti gli individui, proprio nel punto in cui era presente la carta da filtro, in un tempo di 4-5 giorni dall'inizio della prova.

Nei grafici che seguono, è rappresentato il numero di insetti presenti in ognuno dei 4 angoli dell'arena (a, b, c, d, ciascuno rappresentato con un colore differente) unitamente al numero di insetti morti e a quello di insetti non rifugiati in alcun nido (np). La colonna al giorno 1 è suddivisa in 4 parti uguali poiché rappresenta la situazione al momento dell'introduzione delle blattelle nell'arena (5 insetti in ogni angolo); con il trascorrere dei giorni tende a predominare un colore, segno dell'aggregazione degli insetti in un unico angolo (la somma degli insetti presenti nei quattro angoli + insetti morti + insetti "np" è pari a 20).



Grafici 1, 2, 3 - Aggregazione in *Blattella germanica* in assenza di estratti fecali.



Grafici 4, 5, 6 - Aggregazione in *Blattella germanica* in presenza di estratti fecali.

Nelle prove effettuate in cui era presente la carta da filtro bagnata con estratti fecali, il numero di colonne nei grafici è inferiore, segno che l'aggregazione è avvenuta in un tempo minore (ogni colonna corrisponde ad un giorno).

Queste semplici prove hanno evidenziato l'importanza del comportamento aggregativo in *B. germanica*. Si è potuto constatare come tale aggregazione sia spontanea e abbastanza rapida, ma possa essere incrementata e velocizzata impiegando estratti fecali.

Per questo motivo, solitamente quando si impiegano trappole a fondo adesivo per il monitoraggio o per la lotta alle blatte, lasciando nella trappola gli insetti via via catturati, questi aumentano la capacità di richiamo nei confronti di altri conspecifici.

### **Prove preliminari di verifica degli estratti fecali**

In queste prove è stato verificato che l'estratto fecale ottenuto con metanolo ha determinato in individui di *B. germanica* una percentuale di risposte positive pari a quelle della carta da filtro presumibilmente impregnata di feromone di aggregazione (tale carta era stata a contatto con numerosi insetti per 14 giorni nei contenitori di allevamento), ossia 90%; il tempo medio impiegato per raggiungere l'attrattivo è stato rispettivamente di  $70,89 \pm 9,16$  secondi (tempo medio  $\pm$  SE) e di  $67,89 \pm 7,52$  secondi. Nel caso, invece, di estratti ottenuti con acqua distillata, l'attrattività è risultata solamente del 20% con un tempo medio di  $163 \pm 61$  secondi (gli insetti che non hanno raggiunto l'attrattivo non sono stati considerati nell'analisi statistica). Il controllo, rappresentato da carta da filtro bagnata con acqua distillata non ha attratto alcun insetto nel tempo limite di 300 secondi.

### Attrattività dell'estratto a diverse concentrazioni

I risultati delle prove olfattometriche riguardanti gli estratti fecali in metanolo e in acqua a diverse concentrazioni (100%, 10%, 5%, 2% e 1%) sono mostrati nel grafico seguente:

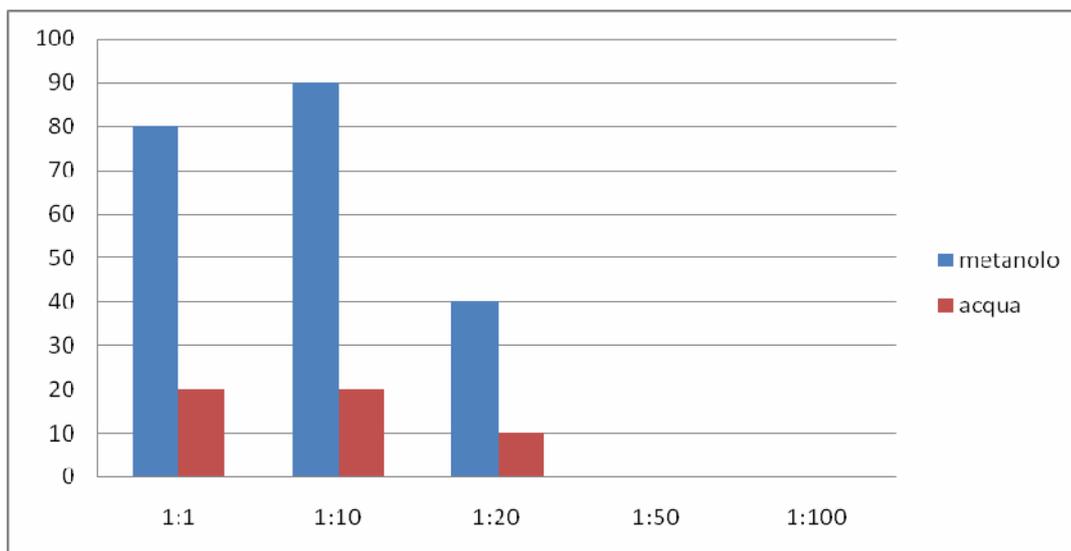


Grafico 7 - Percentuale di risposte ad estratti fecali in metanolo e acqua a diverse concentrazioni.

Si nota che l'attrattività degli estratti è simile per l'estratto "tal quale" e per l'estratto al 10%, mentre diminuisce a concentrazione 5%; a concentrazione inferiore al 5% entrambi gli estratti non risultano più attrattivi. Come era stato evidenziato anche dalle prove preliminari, l'estratto ottenuto con metanolo è maggiormente efficace di quello in soluzione acquosa.

### Attrattività intra e interspecifica degli estratti fecali

Gli estratti fecali ottenuti con metanolo hanno sempre mostrato un buon potere attrattivo intraspecifico, in particolare nei confronti di stadi giovanili. E' stato poi dimostrato come esista un seppur minore potere attrattivo interspecifico con gli estratti fecali di *S. longipalpa* nei confronti di

*B. germanica* e viceversa e nel caso di *B. orientalis* e *P. americana* e viceversa. I risultati dettagliati sono mostrati nei grafici seguenti:

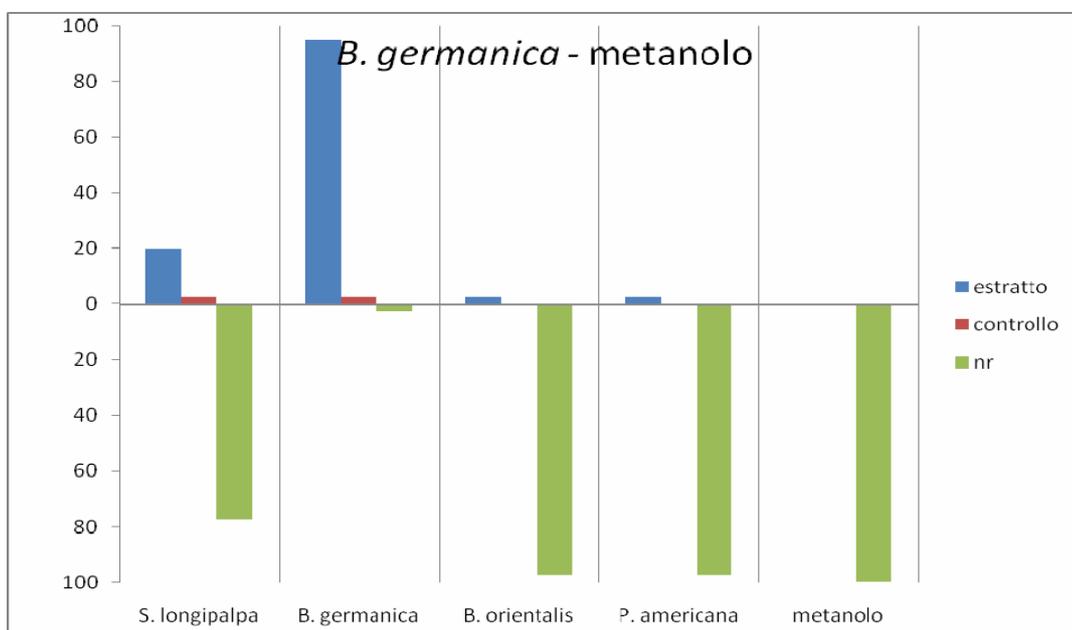


Grafico 8 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Blattella germanica* ottenuti con metanolo (nei confronti di *B. germanica*:  $\chi^2=35,103$ ,  $P=0$ ; nei confronti di *Supella longipalpa*:  $\chi^2=5,444$ ,  $P=0,02$ ).

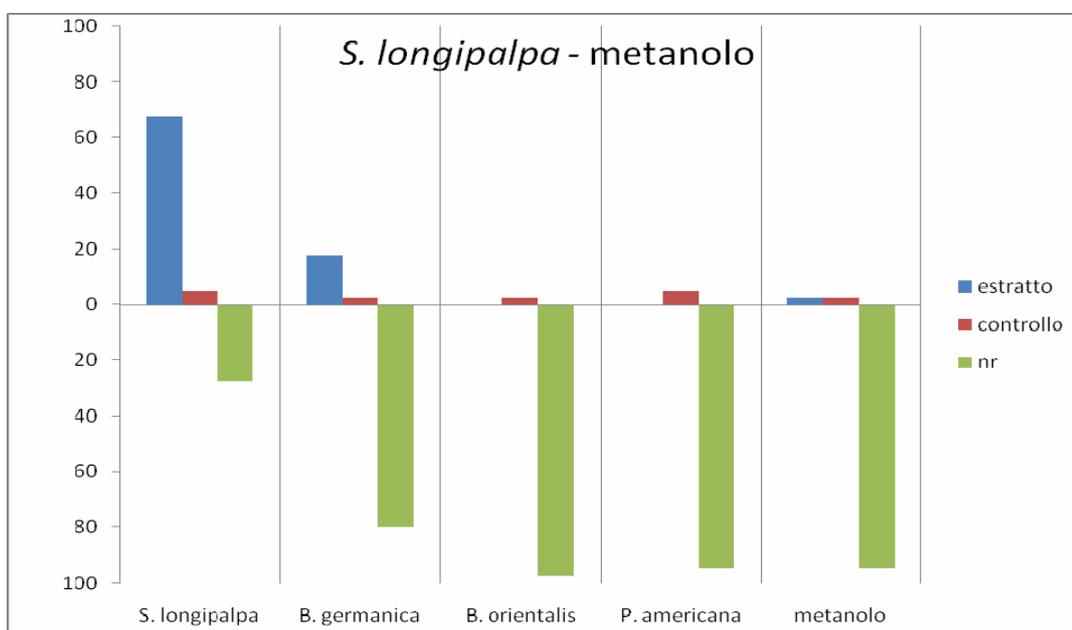


Grafico 9 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Supella longipalpa* ottenuti con metanolo (nei confronti di *S. longipalpa*:  $\chi^2=20,571$ ,  $P=0$ ; nei confronti di *Blattella germanica*:  $\chi^2=4,5$ ,  $P=0,034$ ).

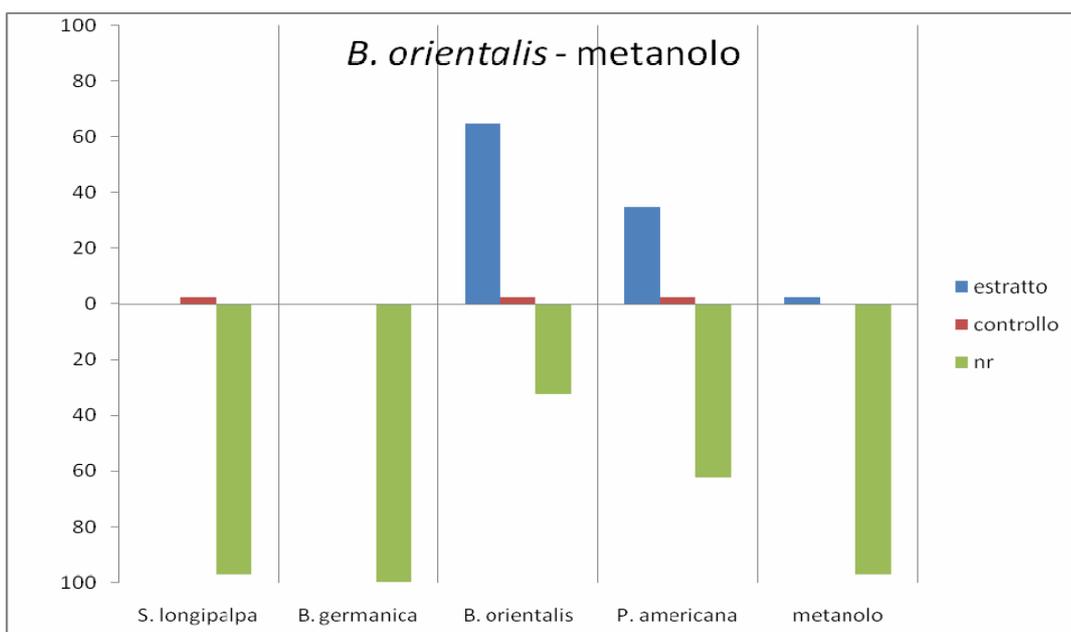


Grafico 10 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Blatta orientalis* ottenuti con metanolo (nei confronti di *B. orientalis*:  $\chi^2=23,248$ ,  $P=0$ ; nei confronti di *Periplaneta americana*:  $\chi^2=11,267$ ,  $P=0,01$ ).

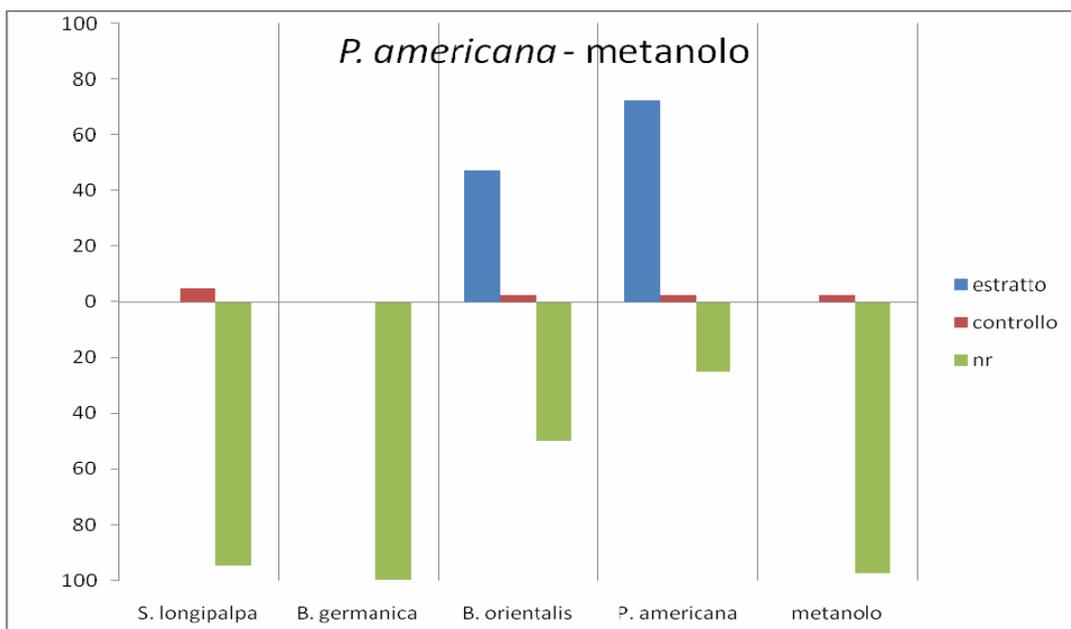


Grafico 11 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Periplaneta americana* ottenuti con metanolo (nei confronti di *P. americana*:  $\chi^2=26,133$ ,  $P=0$ ; nei confronti di *Blatta orientalis*:  $\chi^2=16,2$ ,  $P=0$ ).

Per gli estratti in metanolo, escludendo dall'analisi statistica, come spiegato in "Materiali e Metodi generali", gli insetti che non hanno dato alcuna risposta (nr), in tutti i casi di attrazione intraspecifica vi è stata significatività delle risposte ( $P < 0,05$ ); lo stesso dicasi, come già accennato, per gli estratti in metanolo di *S. longipalpa* nei confronti di *B. germanica* e viceversa e per quelli di *B. orientalis* nei confronti di *P. americana* e viceversa.

(Considerando nell'analisi statistica per calcolare  $\chi^2$  e  $P$  tutti i 40 insetti impiegati in ogni prova, ritenendo come "non-attratti" quelli che non hanno dato alcuna risposta e quindi aggregandoli a quelli che sono stati attratti dal controllo, avremmo comunque avuto  $P < 0,05$  per l'attrattività intraspecifica di *S. longipalpa*, *B. germanica* e *P. americana*, mentre  $P = 0,058$  per *B. orientalis*).

Dai risultati sopra mostrati si può anche osservare come il metanolo abbia una influenza del tutto trascurabile, avendo portato ad un massimo di 2,5% di risposte positive (ossia 1 insetto sui 40 impiegati per la prova), percentuale molto simile a quella del controllo.

Nei biosaggi in olfattometro in cui sono state impiegate miscele ottenute con acqua dalle feci, il potere attrattivo si è rivelato sempre piuttosto scarso e pressoché nullo a livello interspecifico. I risultati sono illustrati nei grafici 12, 13, 14 e 15.

In questo caso dato l'elevato numero di insetti che non hanno dato risposta, non vi è alcuna significatività statistica, avendo sempre ottenuto  $P > 0,05$ .

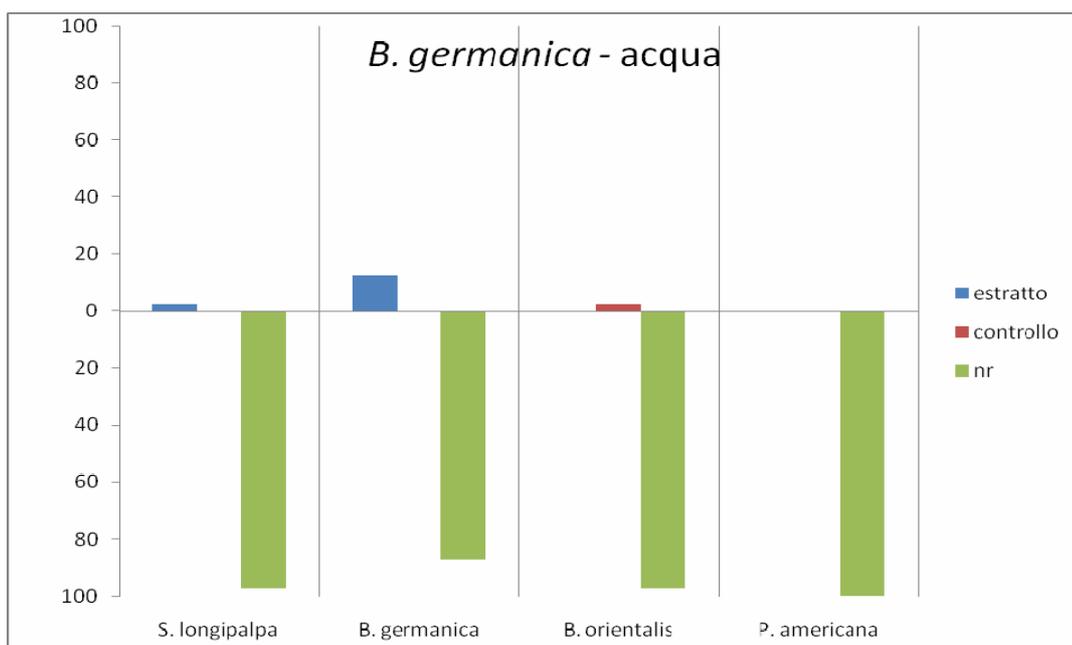


Grafico 12 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Blattella germanica* ottenuti con acqua.

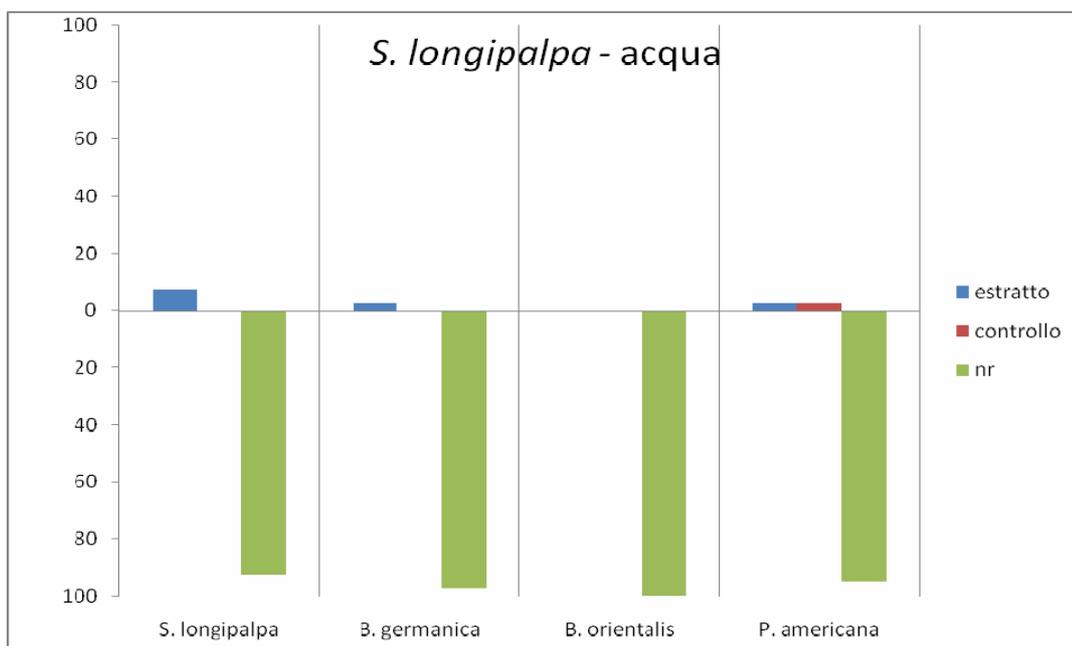


Grafico 13 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Supella longipalpa* ottenuti con acqua.

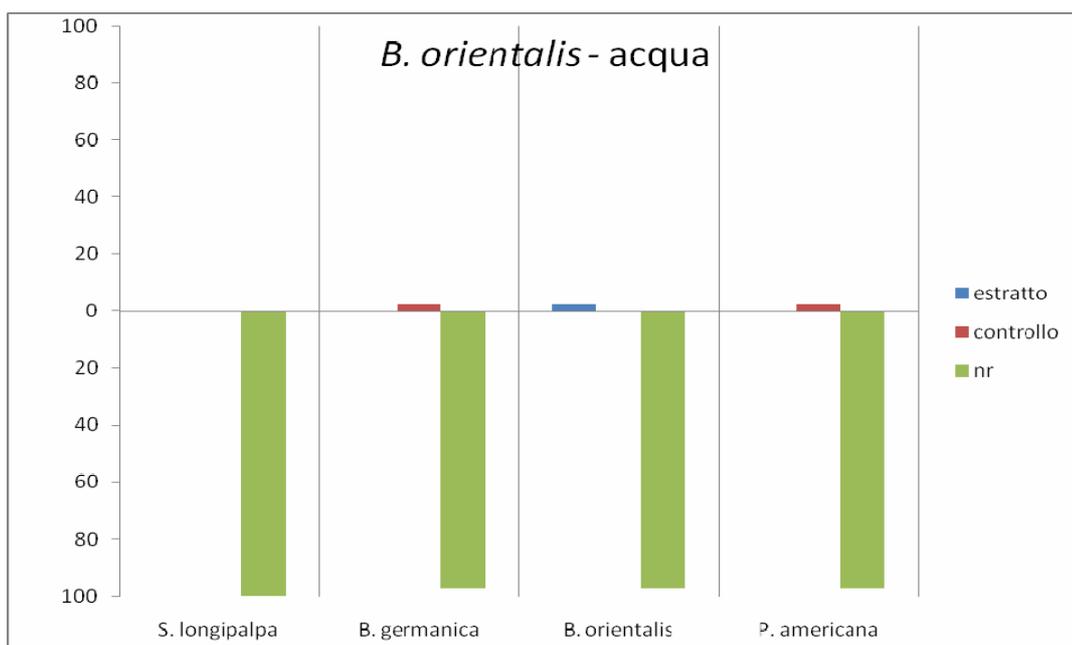


Grafico 14 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Blatta orientalis* ottenuti con acqua.

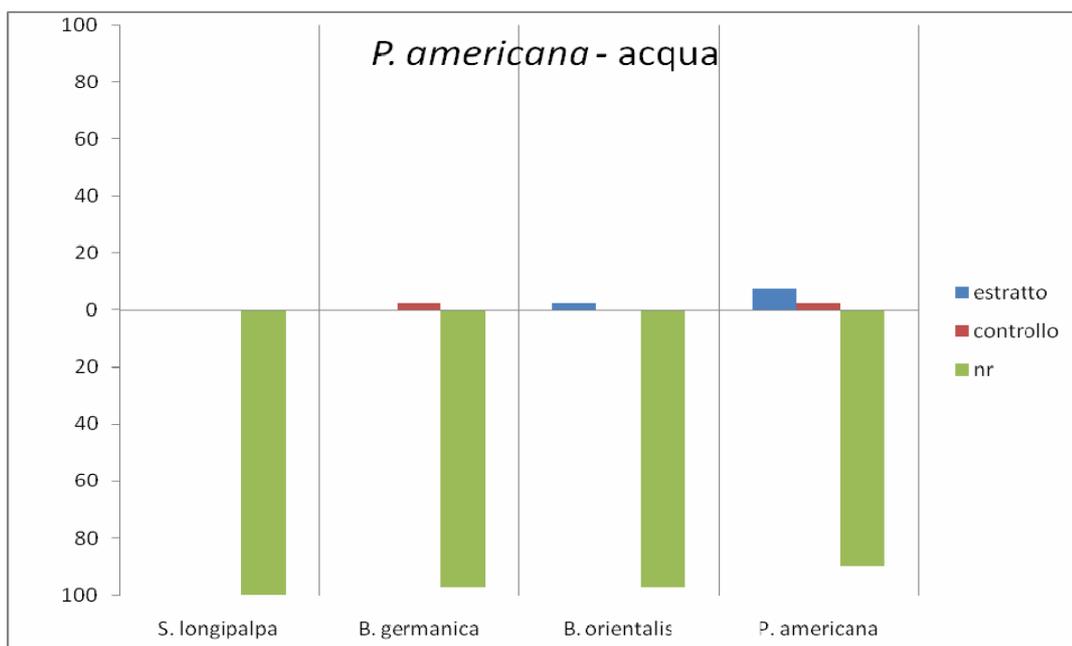


Grafico 15 - Percentuali di risposta a estratti fecali di *Periplaneta americana* ottenuti con acqua.

### Localizzazione dei sensilli deputati a recepire il feromone di aggregazione in *B. germanica* e *S. longipalpa*

Gli insetti privati del primo terzo delle antenne, hanno risposto in modo decisamente inferiore agli insetti con antenne complete (le percentuali di risposta sono indicate nella tabella 1), sia nel caso di *B. germanica* che di *S. longipalpa*; nessun insetto privato dei 2/3 delle antenne ha risposto in modo positivo agli estratti fecali.

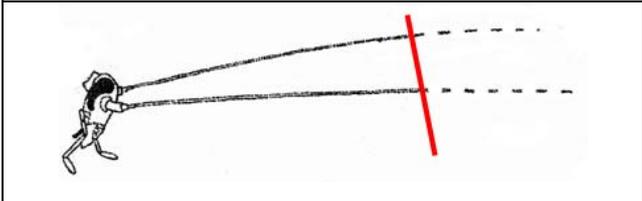
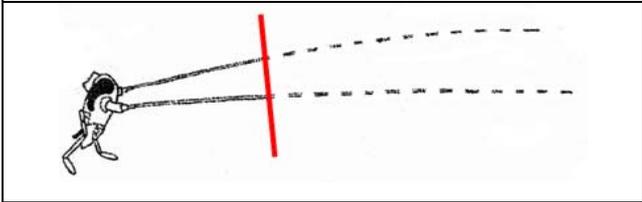
	<i>B. germanica</i>	<i>S. longipalpa</i>
	90%	70%
	30%	20%
	-	-

Tabella 1 - Percentuali di risposta ad estratti fecali da parte di Blattellidi privati di diverse porzioni di antenna.

Queste osservazioni suggeriscono che i chemiorecettori deputati alla captazione delle molecole che costituiscono il feromone di aggregazione (o più precisamente di quei componenti presenti negli estratti fecali) siano localizzati solo sulle antenne, in particolare nei 2/3 distali. Tuttavia l'elevato stress a cui sono stati sottoposti gli insetti e il danneggiamento dell'antenna possono aver influenzato l'esito dei biosaggi, pertanto questi risultati preliminari necessitano di ulteriori conferme.

## BIBLIOGRAFIA

- BELL W.J., PARSON C., MARTINKO A., 1972 – Cockroach aggregation pheromones: analysis of aggregation tendency and species specificity (Orthoptera: Blattidae). – *Journal of Kansas Entomological Society*, 45: 414-421.
- KENNEDY J.S., 1978 – The concepts of olfactory ‘arrestment’ and ‘olfaction’. – *Physiological Entomology*, 3: 91-98.
- MILLER D.M., KOEHLER P.G., PATTERSON R.S., 1997 – Use of German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) fecal extract to enhance toxic bait performance in the presence of alternative food sources. – *Journal of Economic Entomology*, 90(2): 483-487.
- ROTH L.M., COHEN S., 1973 – Aggregation in Blattaria. – *Annals of the Entomological Society of America*, 66(6): 1315-1323.
- RUST M.K., APPEL A.G., 1985 – Intra- and interspecific aggregation in some nymphal blattellid cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, 78(1): 107-110.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1985 – The linear track olfactometer: an assay device for taxes of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) toward their aggregation pheromone. – *Applied Entomology and Zoology*, 20(4): 387-402.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1990 – The aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): isolation and identification of the attractant components of the pheromone. – *Applied Entomology and Zoology*, 25(3): 355-368.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1993a – Aggregation arrestant pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): isolation and structure elucidation of blattellastenoside-A e –B. – *Journal of Chemical Ecology*, 19(11): 2521-2541.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1993b – Novel steroid glycosides as aggregation pheromone of the German cockroach. – *Tetrahedron Letters*, 34(38): 6059-6062.

- SCHERKENBECK J., NENTWIG G., JUSTUS K., LENZ J., GONDOL D., WENDLER G., DAMBACH M., NISCHK F., GRAEF C., 1999 – Aggregation agents in German cockroach *Blattella germanica*: examination of efficacy. – *Journal of Chemical Ecology*, 25(5): 1105-1119.
- SEELINGER G., 1984 – Interspecific attractivity of female sex pheromone components of *Periplaneta Americana*. – *Journal of Chemical Ecology*, 11(2): 137-148.

# CAPITOLO V

## CAPITOLO V

### **FORMULATI GEL PER LA LOTTA ALLE BLATTE: VALUTAZIONE DI ALCUNI PRODOTTI PRESENTI IN COMMERCIO E PREPARAZIONE DI UN NUOVO GEL**

I prodotti insetticidi formulati gel presentano alcuni indubbi vantaggi rispetto ai trattamenti convenzionali: innanzitutto risultano essere più sicuri in quanto l'insetticida non viene distribuito nell'ambiente ma solamente dispensato sotto forma di piccole gocce in punti specifici come ad esempio crepe, fessure, o altri punti in cui sono probabilmente annidate le blatte, riducendo al minimo le possibilità di contatto con uomo e animali domestici. Questo fa sì che possano essere impiegati con sicurezza anche in ambienti domestici abitati, anche in presenza di bambini; inoltre a differenza di trattamenti spray, i formulati gel si possono utilizzare in locali dove si manipola cibo, come cucine, mense, ristoranti nonché in locali di lavorazione di industrie alimentari senza la necessità di interrompere la produzione. Il gel può anche essere applicato in punti dove risulta impensabile utilizzare composti liquidi, come ad esempio apparecchiature elettroniche (computers), scatole di derivazione elettrica, quadri elettrici, elettrodomestici, che spesso per il calore che sviluppano divengono luogo di rifugio per gli insetti.

Tuttavia i gel attualmente commercializzati e utilizzati presentano ampi margini di miglioramento; sebbene siano nel complesso abbastanza efficaci soprattutto nei confronti di alcune specie, hanno un costo elevato, sono efficaci se posti in punti molto vicini (circa 10 cm) ai rifugi delle blatte

(Appel, 1992; Durier & Rivault, 2002; Ajjan *et al.*, 1997) e non risultano essere particolarmente attrattivi/appetibili, per cui la loro efficienza è fortemente influenzata dalla disponibilità di fonti di cibo/acqua alternative (Appel & Tanley, 2000; Nalyanya *et al.*, 2001) nonché da alcuni aspetti comportamentali della specie bersaglio o dello stadio di sviluppo (Appel & Tanley, 2000; Durier & Rivault, 2000a e 2000b; Kaakeh & Bennet, 1999).

In aggiunta si riscontrano alcuni problemi legati alla consistenza e alla durabilità; molti gel sono soggetti ad una rapida disidratazione ed essiccazione (Appel & Benson, 1995) che portano ad una riduzione dell'appetibilità e all'aumento della concentrazione di insetticida presente, con possibile incremento della repellenza. Alcuni gel, poi, si presentano di consistenza piuttosto liquida che crea problemi nell'applicazione e determina una più rapida disidratazione. Altri invece cambiano consistenza dopo poche ore dalla deposizione della goccia (24-48 ore) divenendo simili ad una colla vinilica e perdendo completamente appetibilità nei confronti delle blatte.

Il presente studio ha cercato di evidenziare i difetti dei formulati gel correntemente utilizzati ai fini della messa a punto di un nuovo prodotto, con caratteristiche chimico-fisiche maggiormente soddisfacenti e in grado di attrarre efficacemente gli insetti bersaglio.

## **MATERIALI E METODI**

### **Formulati gel**

Sono stati saggiati i seguenti formulati gel reperibili in commercio: Solfac Gel scarafaggi (Bayer; Imidacloprid 2,15%), Goliath Gel (BASF; Fipronil 0,05%), MaxForce Roach Bait Gel (Bayer; Hydramethylnon 2.15%) e Avert esca Gel scarafaggi (Copyr; Abamectina 0,05%). Dei suddetti

prodotti è nota solamente la tipologia e la quantità di principio attivo ma nessuna informazione è fornita circa i coformulanti, ossia gli ingredienti che costituiscono la base del gel ed eventuali attrattivi presenti.

### **Valutazione della resistenza alla disidratazione per formulati gel commerciali**

Per misurare la disidratazione cui è soggetto un formulato gel, si è proceduto nel modo seguente: una goccia di prodotto è stata posta su un vetrino (precedentemente pesato) ed è stata pesata con una bilancia di precisione (Mettler AE 240). Ogni goccia è stata lasciata in ambiente con umidità e temperatura controllati ( $21,4 \pm 1,5$  °C e  $56 \pm 3,5$ % U.R.) e pesata ad intervalli di 2 giorni. Avendo constatato che la maggior parte della disidratazione avviene nei primissimi giorni dopo l'applicazione, ulteriori prove sono state effettuate valutando la perdita di peso ogni 24 ore. Per ogni prodotto sono state effettuate tre repliche.

### **Attrattività di esche commerciali**

È stata effettuata una valutazione del potere attrattivo dei formulati commerciali sopra elencati nei confronti di esemplari maschi e femmine di tutti gli stadi di sviluppo di *B. germanica* e *S. longipalpa*, utilizzando un olfattometro a due vie (descritto nella sezione "Materiali e Metodi generali"). Le prove sono state effettuate, oltre che per i quattro formulati gel, anche per due attrattivi alimentari (come confronto): burro di arachidi e marmellata di pesche.

Gli insetti sono stati introdotti nell'olfattometro uno alla volta, per un totale di 10 insetti (per ciascuna specie) per ogni formulato o attrattivo alimentare. Ogni insetto ha avuto a disposizione un massimo di 5 minuti e, in

caso di risposta positiva, è stato registrato il tempo impiegato per raggiungere l'attrattivo.

### **Valutazione della repellenza determinata dall'insetticida presente nei formulati gel commerciali**

Non disponendo delle sole basi gel, prive di insetticida, dei formulati commerciali testati, è stato impossibile valutare separatamente l'attrattività e la possibile repellenza dei preparati.

Per valutare il grado di repellenza determinato dal principio attivo sono stati affrontati alcuni tests con il metodo delle “*Ebeling choice boxes*” come descritto da Ebeling *et al.* (1966 e 1967) e da Busvine (1971). Questo metodo prevede l'impiego di una scatola divisa in due parti uguali, delle quali una viene tenuta in condizioni di buio e l'altra di luce. Il prodotto di cui si vuole testare la repellenza viene posto nella metà buia della scatola e durante la fotofase si conta il numero di insetti nella parte buia e nella parte illuminata. Poiché le blatte sono lucifughe, la presenza di insetti nella zona illuminata indica una certa repellenza del prodotto saggiato.

Le “*Ebeling choice boxes*” utilizzate sono state costruite con cartone e la parte superiore è stata coperta con un vetro (oscurato nella metà corrispondente alla zona di buio) per evitare la fuga degli insetti; le dimensioni di tali scatole erano 20 x 30 x 20 cm e le due metà erano separate da un setto, sempre in cartone, discostato di 5 mm nella parte bassa per permettere agli insetti di spostarsi da una parte all'altra. Una provetta di vetro contenente acqua e chiusa con cotone idrofilo è stata posta in mezzo alla scatola di Ebeling, in corrispondenza del setto divisorio, affinché non costituisse un elemento determinante per la scelta degli insetti. Sono state eseguite valutazioni della repellenza di 2 prodotti commerciali (Solfac Gel scarafaggi (Bayer; Imidacloprid 2,15%) e MaxForce Roach Bait Gel (Bayer;

Hydramethylnon 2.15%)) dispensati in gocce di circa 1 grammo su vetrini; come controllo la prova è stata eseguita anche senza formulato (solamente con un vetrino pulito posto nella zona buia). A scopo di confronto, ulteriori tests sono stati condotti con una fonte di alimentazione e in un altro caso trattando la zona buia (solo il fondo, le pareti non sono state trattate) con un piretroide formulato liquido (BASF - Fendona 60 SC) a dose di etichetta.

20 adulti di *B. germanica* sono stati introdotti in ogni scatola, liberi di muoversi tra la parte trattata (o contenente il formulato gel) e la parte luminosa. Le prove sono state effettuate in un locale con umidità e temperatura controllati ( $20,5 \pm 1,5$  °C e  $47 \pm 6,5\%$  U.R.), con fotoperiodo l:d = 12:12 utilizzando come illuminazione 6 lampade fluorescenti poste a circa 150 cm sopra le scatole di Ebeling ( $\text{lux} \sim 2,80 \cdot 10^3$ ). Durante la fotofase, sono stati effettuati due conteggi giornalieri (per 6 giorni consecutivi) del numero di insetti presenti nella metà buia e in quella illuminata, e degli insetti morti; per il conteggio, l'insetto è stato "contato" nella zona illuminata se vi sostava per almeno 1 minuto (l'intera durata del conteggio).

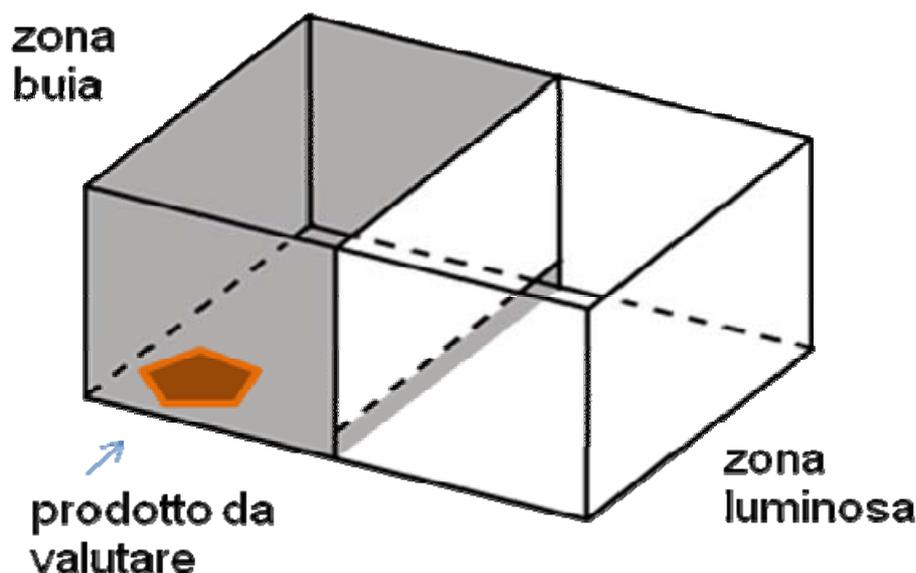


Figura 1 - Ebeling choice box impiegata nelle prove descritte.

La repellenza è stata definita come la percentuale media di blatte vive presenti nella zona illuminata durante la fotofase.

Secondo il modello utilizzato anche da Appel & Benson (1995) è stato inoltre calcolato un indice di performance (PI) che è volto a stimare le potenzialità del prodotto in questione:

$$PI = \left( 1 - \frac{\text{n}^\circ \text{ insetti vivi} + \text{n}^\circ \text{ insetti vivi nella parte illuminata}}{\text{n}^\circ \text{ insetti morti} + \text{n}^\circ \text{ totale insetti}} \right) * 100$$

Un PI = 100 indica una completa mortalità degli insetti e PI = -100 indica la completa repellenza; il controllo (vetrino vuoto) e la sostanza alimentare, in assenza di mortalità naturale, dovrebbero avere PI = 0.

### **Verifica del grado di appetibilità**

Sono stati eseguiti biosaggi per valutare il consumo di esche gel in presenza di una fonte alternativa di cibo. Si ipotizza infatti che la scarsa attrattività presentata dalla esche commerciali, risulti ulteriormente ridotta se nell'ambiente sono disponibili altre sostanze alimentari appetite dalle blatte.

La sperimentazione è stata eseguita impiegando arene in materiale plastico (cloruro di polivinile espanso) di colore bianco, avente dimensioni interne di 100 x 100 x 12 cm. In ciascuna arena sono stati posti, in due angoli opposti, due nidi/rifugi costituiti da cartone ondulato; gli insetti (*B. germanica*, adulti e neanidi, entrambi i sessi) sono stati immessi nelle arene in numero di 20 individui/arena, e sono stati lasciati per un periodo di adattamento di 24 ore prima dell'inizio della prova.

All'interno delle arene sono state quindi posizionate una goccia di gel e una di marmellata di pesca (come fonte alternativa di cibo) deposte su due vetrini. La verifica del consumo del gel e del cibo alternativo è stata effettuata dopo 24 ore (infatti è nelle prime ore dopo la deposizione che

l'esca gel risulta maggiormente appetita, avendo ancora un elevato contenuto in acqua). Poiché la quantificazione del consumo è stata effettuata pesando la goccia di gel, sono state predisposte delle gocce di gel anche all'esterno delle arene per tenere conto del calo di peso dovuto alla disidratazione, cui i formulati gel, come già ricordato, sono soggetti.

Il biosaggio è stato effettuato in un locale con i seguenti parametri microclimatici: temperatura  $21,5 \pm 1,1$  °C, umidità relativa  $53 \pm 4,8$  % e fotoperiodo l:d = 12:12.

### **Preparazione di un nuovo gel**

La seconda parte dello studio ha riguardato la preparazione di una base gel con l'intenzione di ottenere caratteristiche di appetibilità e durabilità migliori di quelle dei gel esistenti.

Per questo sono stati preparati alcuni gel utilizzando i seguenti ingredienti principali, in proporzioni diverse (questi ingredienti non sono necessariamente stati tutti impiegati per ogni gel):

- proteine del grano isolate
- amido di mais modificato
- gomma di Guar
- gomma di carruba
- carbossimetilcellulosa
- alginati
- carragenine
- gelatine
- *Agar agar*
- pectina
- gomma di xantano
- emulsionanti

Sono state realizzate una dozzina di preparazioni, indicate con le sigle: AM01, AM01, P01, P02, P03, F60, F61, F62, F63, F64, F65 e G44; nelle preparazioni indicate con “AM” l’ingrediente principale era l’amido di mais modificato, con “P” erano pectine, con “F” erano gomme e carragenine, con “G” erano gelatine. Sono stati quindi scelti i tre migliori gel in base alla più adatta consistenza ottenuta e al grado di gradimento da parte di individui di *B. germanica* e *S. longipalpa* (valutato mediante prove in olfattometro).

Le tre basi gel scelte, indicate con le sigle F61, F64 e F65 sono state sottoposte a prove di resistenza al disseccamento ponendo gocce di gel su un materiale inerte (vetro) e lasciandole per 6 giorni in un ambiente con  $T = 21,5 \pm 1,5$  °C e U.R. =  $28 \pm 4$  %. La verifica della perdita di peso è stata effettuata ogni 24 ore e sono state effettuate tre repliche.

Studi descritti nel capitolo IV hanno evidenziato il buon potere attrattivo intraspecifico degli estratti fecali della blatte; per questo motivo, il gel che ha presentato le migliori caratteristiche fisiche, ossia ha dimostrato di mantenere nel tempo un adeguato grado di umidità, è stato impiegato nelle successive prove di incorporamento con estratti fecali. Poiché è stato valutato che la concentrazione ottimale di estratto fecale (ossia quella che ha mostrato il miglior potere attrattivo) è quella ottenuta a diluizione 1:10, l’operazione di aggiunta dell’estratto al gel è stata effettuata omogeneizzando un grammo di estratto fecale (estratto da feci con metanolo) e 9 grammi di gel.

Per valutare il potere attrattivo del gel selezionato e addizionato di estratto fecale e confrontarlo con quello di formulati gel commerciali (Solfac Gel scarafaggi, Goliath Gel, MaxForce Roach Bait Gel e Avert esca Gel scarafaggi), sono state impiegate le arene descritte in precedenza; all’interno di ogni arena sono stati collocati due nidi/rifugi costituiti da cartone ondulato, e gli insetti sono stati lasciati per un periodo di adattamento di 24

ore prima dell'inizio della prova. Sono state effettuate 3 repliche contemporanee per ogni prodotto (parametri microclimatici: temperatura  $21,5 \pm 1$  °C , umidità relativa  $29 \pm 3,5$  % e fotoperiodo l:d = 12:12).

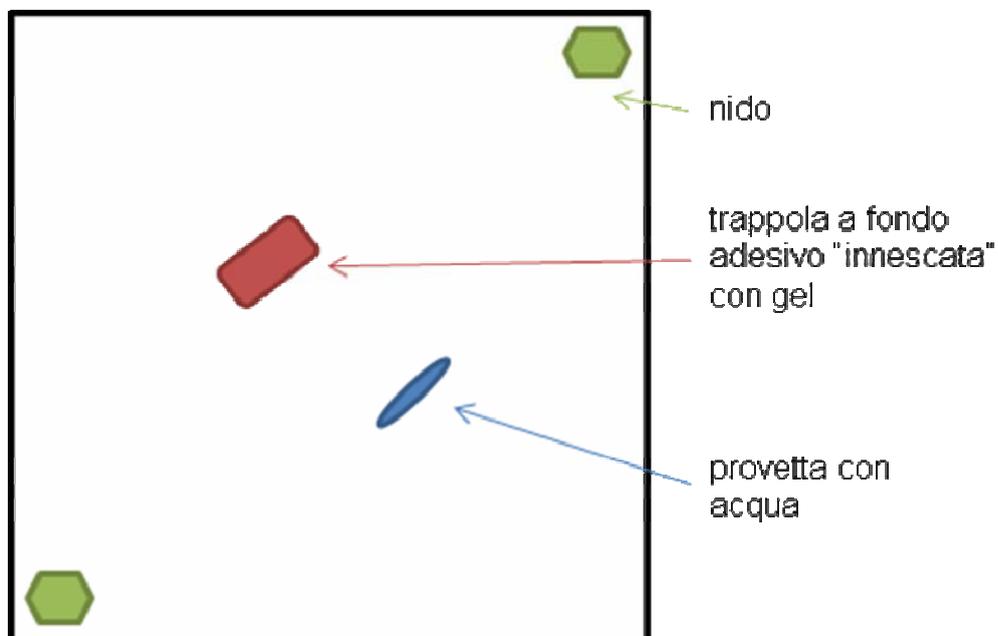


Figura 2 - Arena impiegata per le prove di attrattività del gel addizionato con estratti fecali e di 4 formulati gel commerciali.



Figura 3 - Trappola di cartone a fondo adesivo impiegata per le prove di attrattività in arena.



Figura 4 - Gocciola di gel utilizzata per "innescare" la trappola a fondo adesivo.

Queste prove sono state effettuate con *B. germanica* (20 individui/arena) e *S. longipalpa* (10 individui/arena) separatamente, impiegando gel addizionato con il rispettivo estratto fecale.

All'interno di ogni arena è stata posta una trappola in cartone con fondo adesivo al cui interno è stata dispensata una goccia di gel: in questo caso si è inteso valutare esclusivamente il potere attrattivo del formulato e non, ove presente, il principio attivo contenuto.

La verifica delle catture delle trappole è stata effettuata dopo 1, 2, 3, 4 e 5 giorni dall'inizio del test, e gli insetti eventualmente presenti sul fondo adesivo, sono stati lasciati all'interno delle trappole stesse.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **Valutazione della resistenza alla disidratazione per formulati gel commerciali**

Sono di seguito brevemente illustrati i risultati delle prove effettuate per valutare la perdita di peso dovuta a disidratazione di alcuni formulati gel commerciali per la lotta alle blatte. I valori riportati in grafico si riferiscono alla perdita di peso percentuale (media delle 3 repliche effettuate).

Il grafico 1 illustra il dettaglio della perdita di peso nelle prime 48 ore dalla deposizione della goccia di gel, mentre il grafico 2 si riferisce alla perdita di peso in 8 giorni.

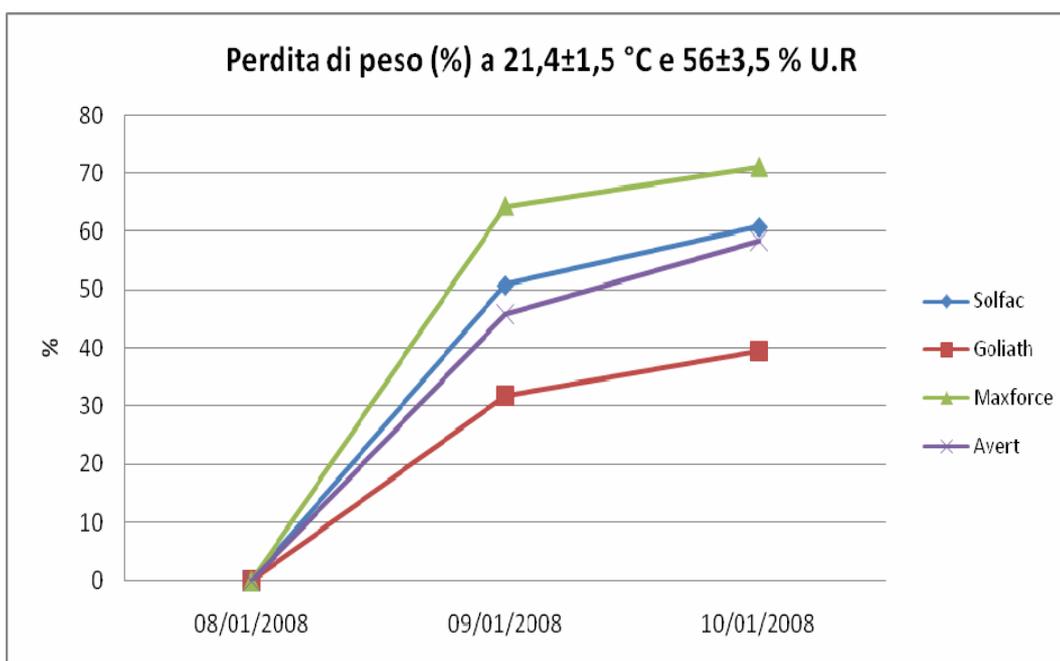


Grafico 1 - Perdita percentuale di peso di formulati gel commerciali nelle prime 48 ore dalla deposizione della goccia.

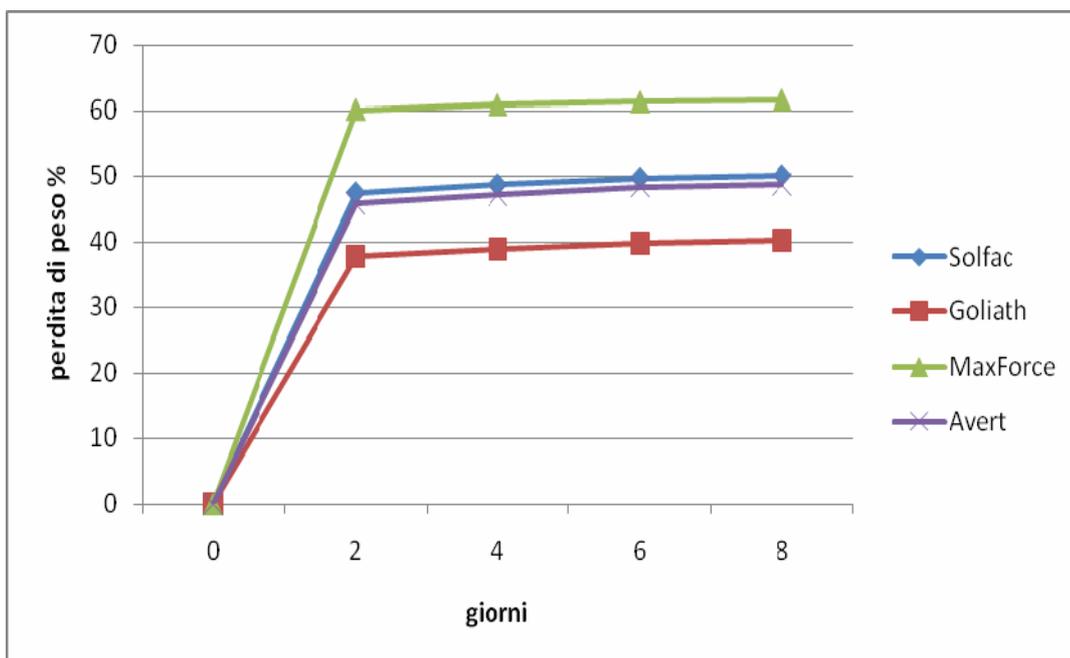


Grafico 2 - Perdita percentuale di peso di formulati gel commerciali negli 8 giorni successivi alla deposizione della goccia.

Come si nota dai grafici precedenti, nei primissimi giorni dopo la deposizione della goccia di gel si verifica una rapida perdita di peso che corrisponde all'evaporazione dell'acqua contenuta. Questa trasformazione determina un cambiamento di consistenza del gel e una conseguente diminuzione dell'attrattività nei confronti delle blatte, che come evidenziato nel capitolo III mostrano predilezione per sostanze alimentari ricche di acqua.

### **Attrattività di esche commerciali**

Le tabelle 1 e 2 mostrano i risultati dei biosaggi di attrattività di quattro formulati gel commerciali, confrontati con fonti alternative di cibo (burro di arachidi e marmellata di pesche), eseguiti in olfattometro a due vie con *B. germanica* e *S. longipalpa*.

Attrattivo	% di risposte positive	Tempo medio impiegato (sec.) (max. 300 sec.)
<i>Burro di arachidi</i>	75	189
<i>Marmellata di pesche</i>	95	86
Solfac Gel scarafaggi	40	93
Goliath Gel	50	219
MaxForce Roach Bait Gel	15	110
Avert esca Gel scarafaggi	40	127

Tabella 1 - Potere attrattivo di diversi prodotti nei confronti di *Blattella germanica*.

Attrattivo	% di risposte positive	Tempo medio impiegato (sec.) (max. 300 sec.)
<i>Burro di arachidi</i>	70	160
<i>Marmellata di pesche</i>	80	60
Solfac Gel scarafaggi	20	112
Goliath Gel	30	189
MaxForce Roach Bait Gel	10	144
Avert esca Gel scarafaggi	20	105

Tabella 2. Potere attrattivo di diversi prodotti nei confronti di *Supella longipalpa*.

Le tabelle evidenziano che la percentuale di risposte positive è significativamente minore, in entrambe le specie impiegate nei biosaggi, nei quattro formulati gel rispetto ai due attrattivi alimentari utilizzati come confronto. È da sottolineare che a un così basso numero di risposte positive in una situazione forzata come quella dell'olfattometro, in cui ogni insetto è stimolato da un'unica fonte attrattiva, probabilmente corrisponde nella realtà (dove può esserci presenza di fonti alternative di sostanze alimentari) un livello ancor minore di attrattività. Si deve però considerare che l'insetticida presente nei formulati gel commerciali (e non nelle sostanze alimentari utilizzate come controllo) potrebbe determinare negli insetti una certa repellenza.

#### **Valutazione della repellenza determinata dall'insetticida presente nei formulati gel commerciali**

La repellenza media, espressa come media delle percentuali di insetti vivi nella zona luminosa delle “*Ebeling choice boxes*”  $\pm$  deviazione standard, è variata da un minimo di  $1,25 \pm 1,37\%$  nel controllo, fino ad un massimo di  $42,91 \pm 15,03\%$  nel piretroide liquido. I formulati gel commerciali Solfac Gel scarafaggi e MaxForce Roach Bait Gel hanno mostrato una repellenza media di  $3,33 \pm 1,29\%$  e  $2,08 \pm 1,02\%$  rispettivamente. Da questo dato e dal grafico 3 che mostra la repellenza (media dei 2 valori registrati ogni giorno) nei 6 giorni del test, si vede come la repellenza dei formulati commerciali, nonostante contengano principio attivo insetticida, sia molto bassa e si avvicini a quella del controllo; per questo motivo si è ritenuto poco rilevante l'errore dovuto ad effetti di repellenza, nella stima del grado di attrattività e appetibilità di tali formulati.

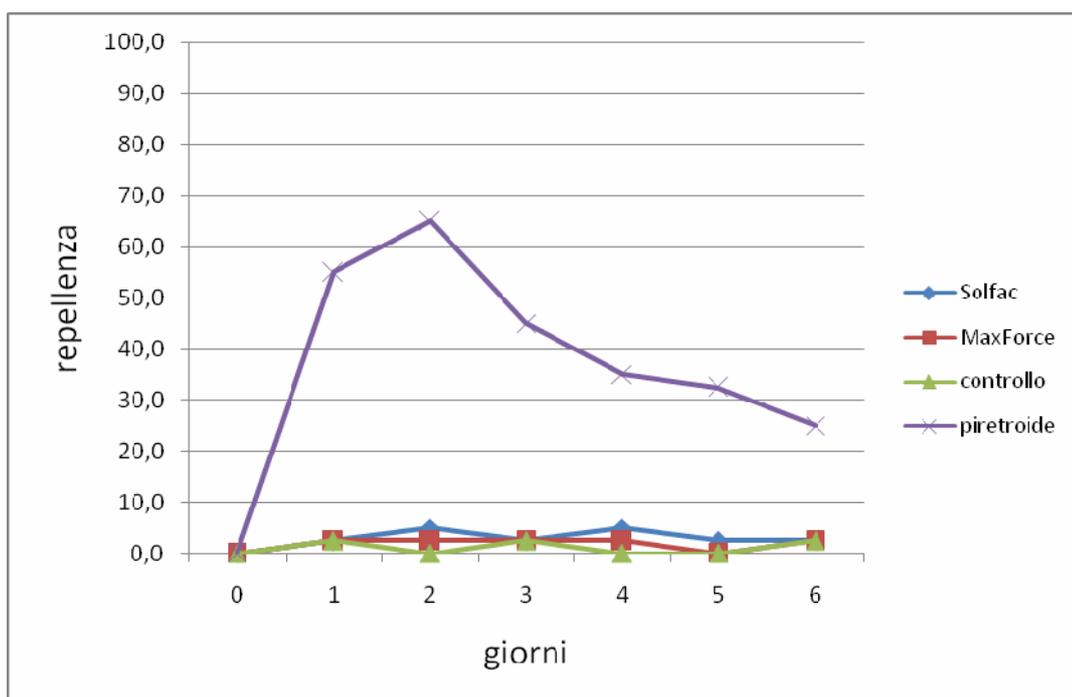


Grafico 3 - Repellenza di due formulati gel commerciali (valutata con il metodo delle “Ebeling choice boxes”) confrontati con un piretroide.

Nel grafico precedente si osserva una diminuzione del valore della repellenza riferita al piretroide con il trascorrere dei giorni dovuta all’efficacia del piretroide stesso: infatti tale valore è calcolato, come descritto in “Materiali e Metodi”, sul numero di blatte vive nella zona illuminata durante la fotofase, che è diminuito per effetto dell’abbattenza del prodotto.

Per quanto riguarda il *performance index* (PI) si può vedere nel grafico 4 che, come atteso, è prossimo a 0 per il controllo e per l’attrattivo alimentare, con un lieve incremento al 5° e 6° giorno per effetto della mortalità naturale (max. 10%). Il *performance index* assume valori marcatamente negativi (indice di repellenza) solamente nel caso del piretroide nelle prime 48 ore dal trattamento dopodichè vi è un aumento della mortalità che porta il valore PI fino ad un massimo di 67,6; per i due

formulati gel commerciali l'indice è perlopiù positivo, e indica una modesta efficacia dei prodotti.

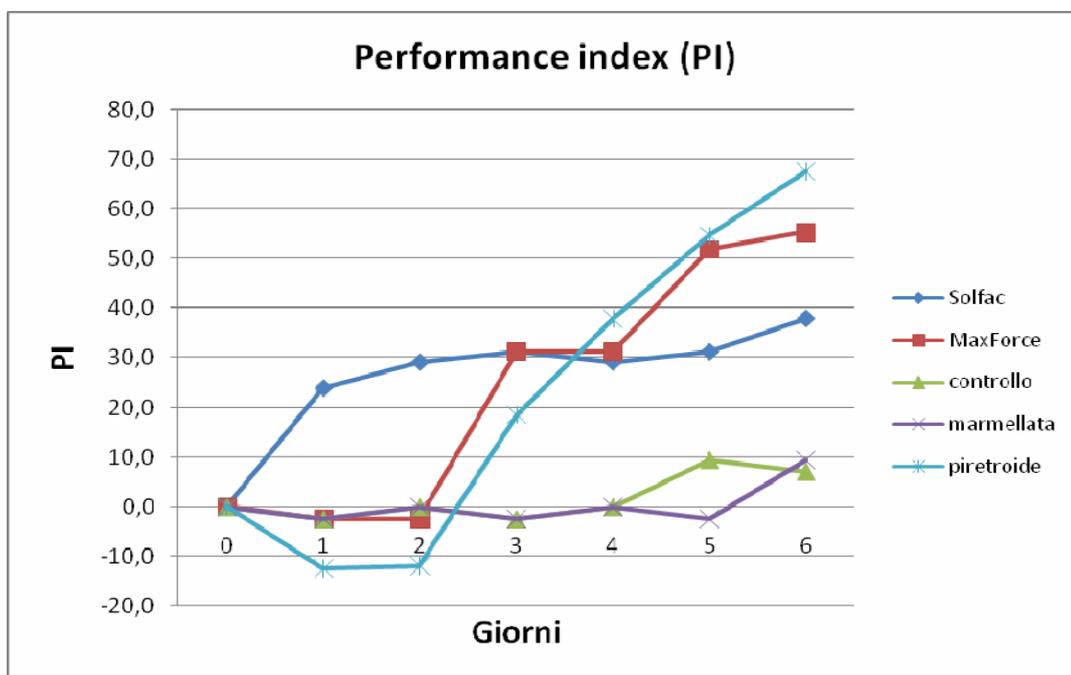


Grafico 4 - *Performance index* di due formulati gel commerciali, confrontati con un piretroide e con un attrattivo alimentare (marmellata di pesche).

### Verifica del grado di appetibilità

Il grafico che segue (grafico 5) mostra come sia stato ampiamente preferito il cibo alternativo anche nei test eseguiti nelle arene, rispetto ai formulati gel, segno che questi sono poco appetiti dagli insetti. I valori riportati in grafico sono espressi come consumo effettivo di esca (la valutazione della quantità di gel consumata è stata effettuata tenendo conto della perdita di peso dovuta alla disidratazione) mentre per la fonte alimentare alternativa è indicata la media del consumo sulle quattro repliche.

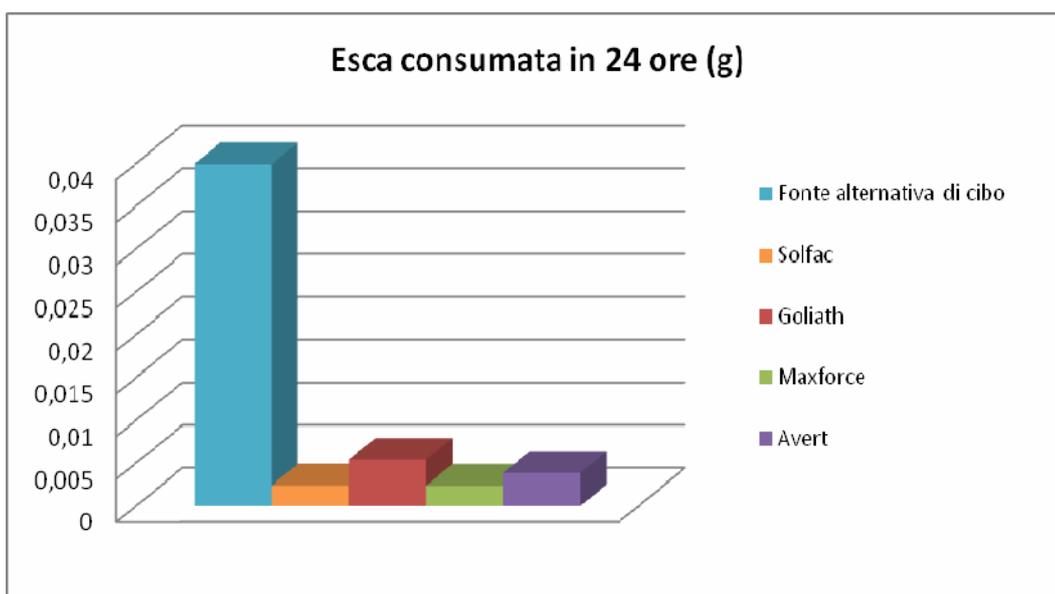


Grafico 5 - Consumo di esca e di fonte alternativa di cibo (grammi) da parte di *Blattella germanica*.

Nel corso della stessa prova è stata anche verificata la mortalità degli scarafaggi ai quali era stata messa a disposizione l'esca e i risultati hanno permesso di verificare che la percentuale di individui morti rapidamente (entro 24-48 ore dal trattamento) sia significativa solo nel caso del Goliath Gel (grafico 6).

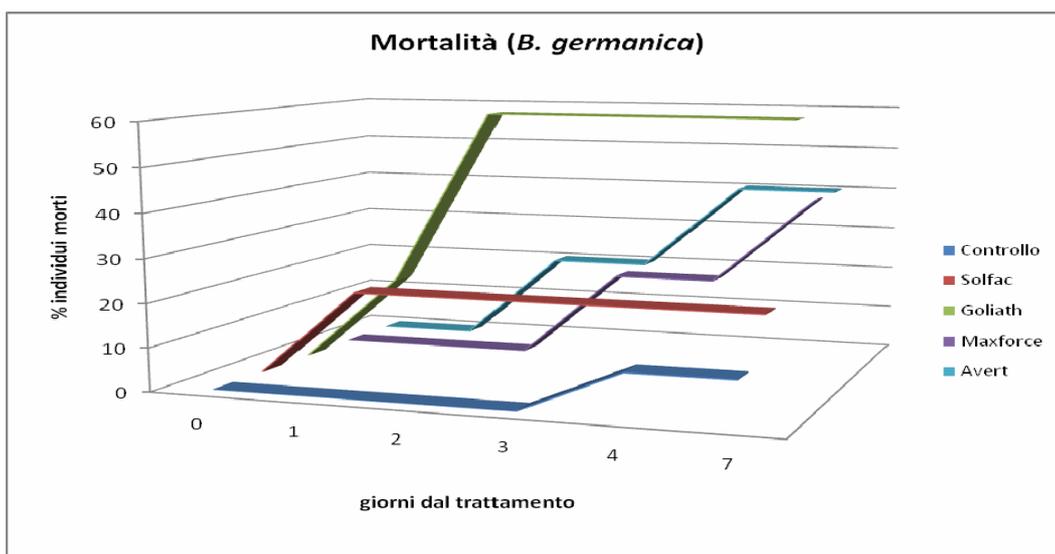


Grafico 6 - Mortalità determinata in *Blattella germanica* dal consumo di formulati gel.

### Preparazione di un nuovo gel

Tra le 12 basi preparate, quelle che hanno mostrato i migliori risultati nelle prove olfattometriche sono state quelle indicate come F61 (75% di risposte positive), F63 (65%) e F64 (65%); come attrattivo di controllo è stata impiegata in olfattometro marmellata di pesche che ha portato all'85% di risposte positive (tab. 3).

	% di risposte positive	Tempo medio impiegato (sec.) (max. 300 sec.)
AM01	10	212
AM02	5	190
P01	25	250
P02	20	168
P03	35	109
F60	35	144
F61	<b>75</b>	115
F62	50	187
F63	<b>65</b>	99
F64	<b>65</b>	120
F65	40	234
G44	40	177
controllo (marmellata di pesche)	85	93
controllo (acqua distillata)	5	219

Tabella 3 - Percentuale di risposte positive e tempo medi impiegato per raggiungere l'attrattivo in prove in olfattometro con *Blattella germanica*.

Il grafico 7 mostra la perdita di peso, espressa in percentuale sul peso iniziale, delle tre basi gel scelte.

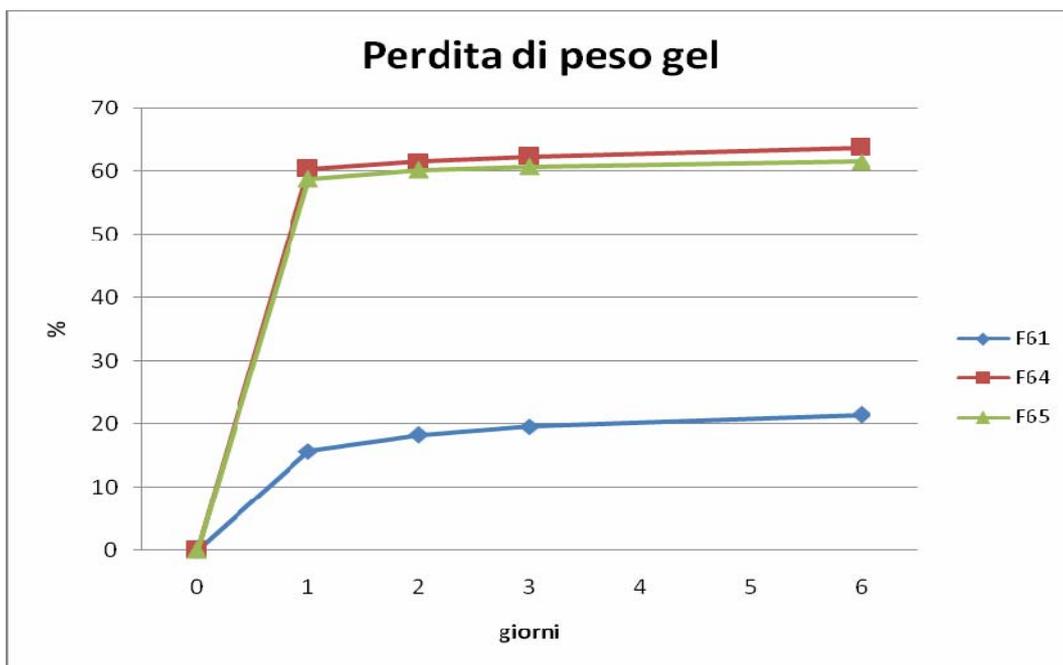


Grafico 7 – Perdita di peso (percentuale sul peso iniziale) di tre basi gel preparate.

Come si vede dal grafico, il gel che subisce il minore disseccamento è quello identificato con la sigla “F61”. Questo gel è stato scelto per le prove successive nelle quali è stato miscelato con estratto fecale.

Dai risultati conseguiti nelle prove di attrattività del gel posto all’interno di trappole con fondo adesivo (grafici 8 e 9) si può evidenziare che il gel addizionato con estratto fecale è sempre risultato maggiormente attrattivo dei formulati gel commerciali saggiati. Per *B. germanica*, in un tempo di 5 giorni, è stato l’unico prodotto in grado di attrarre nella trappola di cartone, e conseguentemente di eliminare, il 100% degli individui immessi nelle arene. Nel caso di *S. longipalpa* l’attrattività del gel contenente gli estratti fecali è più che doppia rispetto a quella registrata per i formulati commerciali e ha portato alla cattura del 96,7 % degli individui presenti nell’arena in 5 giorni.

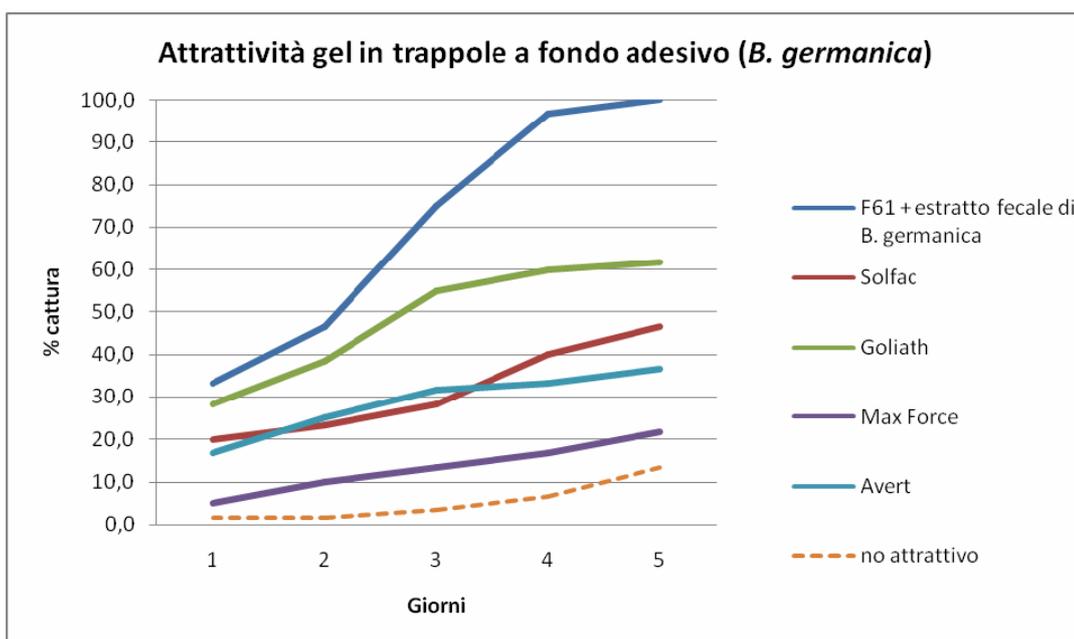


Grafico 8 – Attrattività del nuovo gel addizionato con estratti fecali di *Blattella germanica* (nei confronti di *B. germanica*).

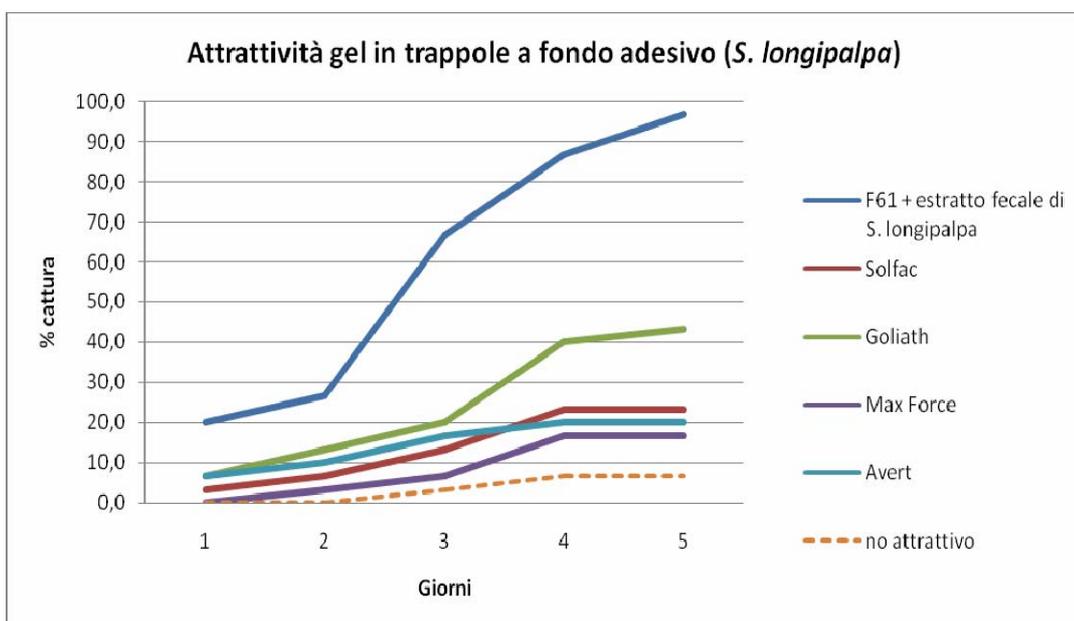


Grafico 9 - Attrattività del nuovo gel addizionato con estratti fecali di *Supella longipalpa* (nei confronti di *S. longipalpa*).

Si può pertanto concludere che gli estratti fecali, che già nelle prove olfattometriche avevano mostrato un buon potere attrattivo, sono in grado di

incrementare efficacemente l'attrattività di un formulato gel, soprattutto se unite ad un gel avente buona consistenza e durabilità.

## **BIBLIOGRAFIA**

AJJAN I., ZHANG DA YU, ROBINSON W.H., 1997 – Certified fresh gel baits: laboratory evaluations show gel baits remain attractive and effective on German cockroaches for months. – *Pest Control Technology*, 25(6): 47, 50-52, 56.

APPEL A.G., 1992 – Performance of gel and paste bait products for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control: laboratory and field studies. – *Journal of Economic Entomology*, 85(4): 1176-1183.

APPEL A.G., BENSON E.P., 1995 – Performance of Abamectin bait formulations against German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Economic Entomology*, 88(4): 924-931.

APPEL A.G., TANLEY M.J., 2000 – Laboratory and field performance of an Imidacloprid gel bait against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Economic Entomology*, 93(1):112-118.

BUSVINE J.R., 1971 – A critical review of the techniques for testing insecticides. – Commonwealth Agricultural Bureau, London.

DURIER V., RIVAULT C., 2000a – Food bait preference in German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Proceedings of the International Conference on Urban Pests*, Praga 1999: 113-119.

DURIER V., RIVAULT C., 2000b – Comparisons of toxic baits for controlling the cockroach, *Blattella germanica*: attractiveness and feeding stimulation. – *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 410-418.

DURIER V., RIVAULT C., 2002 – Influence of a novel object in the home range of the cockroach, *Blattella germanica*. – *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 121-125.

- EBELING W., WAGNER R.E., REIERSON D.A., 1966 – Influence of repellency on the efficacy of blatticides. I. Learned modification of behavior of the German cockroach. – *Journal of Economic Entomology*, 59(6): 1374-1388.
- EBELING W., REIERSON D.A., WAGNER R.E., 1967 – Influence of repellency on the efficacy of blatticides. II. Laboratory experiments with German cockroach. – *Journal of Economic Entomology*, 60(5): 1375-1390.
- KAAKEH W., BENNET G.W., 1999 – Developmental stage- and gender-dependent differential susceptibility of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) to various commercial baits. – *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 16(1): 9-24.
- NALYANYA G., LIANG D.S., KOPANIC R.J.Jr, SCHAL C., 2001 – Attractiveness of insecticide bait for cockroach control (Dictyoptera: Blattellidae): laboratory and field studies. – *Journal of Economic Entomology*, 94(3): 686-693.

RISULTATI GENERALI  
E  
DISCUSSIONE GLOBALE

## RISULTATI GENERALI E DISCUSSIONE GLOBALE

### **Note biologiche e morfologiche su *Supella longipalpa* (Fabricius)**

Gli studi effettuati su *Supella longipalpa* (F.) (Blattaria: Blattellidae) hanno evidenziato che una piccola percentuale di femmine (10-15 %) già al terzo e quarto giorno dalla muta immaginale determina nei maschi il comportamento tipico esibito quando viene percepito feromone sessuale. Ciò significa che le femmine dispongono di una certa quantità di feromone sessuale anche prima dell'inizio del comportamento di richiamo sessuale, che si manifesta a partire dal quinto e sesto giorno di vita adulta, fino al raggiungimento di un picco all'ottavo giorno.

Le femmine di *S. longipalpa* in atto di richiamo sessuale inarcano il dorso fino a discostare le brevi ali e a esporre i propri tergiti addominali, allungando le zampe e mostrando ripetutamente le aperture genitali. I tergiti addominali sono stati oggetto di osservazioni approfondite che hanno rivelato al microscopio biologico prima, e a quello elettronico poi, la presenza di numerosi pori di dimensioni molto piccole (diametro di circa 300-400 nm) soprattutto sui margini laterali. I tergiti addominali nei quali è più elevata la frequenza dei suddetti pori cuticolari, il quarto e il quinto, sono anche quelli che attraggono maggiormente individui maschi in prove olfattometriche e maggiormente stimolano il “corteggiamento”; per questo motivo si ritiene che questi pori, cui sembrano essere collegate piccole ghiandole tramite dotti lunghi e sottili, siano gli sbocchi di ghiandole deputate alla produzione del feromone sessuale. Strutture analoghe, seppure

con numerosità minore, sono state osservate anche sul corpo di individui maschi di *S. longipalpa*.

L'80% delle femmine che hanno mostrato il comportamento di richiamo sessuale, ha proseguito fino all'accoppiamento mentre nessuna femmina che non fosse in fase di richiamo si è accoppiata, evidenziando una chiara correlazione tra il “*calling behavior*” e la disponibilità ad accoppiarsi. L'inizio del comportamento di richiamo sessuale delle femmine di *S. longipalpa* sembra essere in stretta relazione con il ritmo circadiano, ma a differenza di quanto osservato da altri autori in precedenza, nelle nostre condizioni sperimentali, è coinciso con le ultime 2-3 ore della fotofase e si è protratto fino alla metà circa della scotofase, con un picco massimo alla terza ora di buio (Hales & Breed (1983) osservarono che le femmine non esercitavano alcun richiamo durante la fotofase).

Una volta che maschio e femmina di *S. longipalpa* sono venuti a contatto l'accoppiamento avviene in modo simile a quanto accade per altri blattellidi: anche il maschio inarca il dorso e rende visibile il settimo tergite su cui sbocca una vistosa ghiandola che produce una secrezione di cui la femmina si ciba, dopodiché il maschio indietreggia rapidamente e stabilisce il contatto genitale. L'accoppiamento è piuttosto rapido, dura un minuto o poco più; a differenza di quanto si osserva in *Blattella germanica*, dove maschio e femmina proseguono l'accoppiamento con i corpi complanari ma con il capo rivolto in direzione opposta, spesso in *S. longipalpa* viene mantenuta per tutto l'accoppiamento la posizione iniziale, con il maschio immediatamente sotto la femmina, nella stessa direzione.

Quando l'ooteca è sviluppata e ben visibile all'esterno dell'apertura genitale, le femmine di *S. longipalpa* iniziano una attività di ricerca del sito idoneo per la deposizione, operazione che si protrae generalmente per circa 30 minuti. In questa fase esplorativa i palpi mascellari vengono mossi

freneticamente insistendo maggiormente su superfici scabrose e in punti nascosti o depressi del substrato. Una volta individuato il luogo idoneo la femmina inizia a “scavare” con le zampe protoraciche quindi ruota di 180 gradi e deposita l’ooteca fissandola con una goccia di fluido genitale da lei stessa prodotto. In alcuni casi le ooteche vengono deposte isolate, ma più spesso si rinvengono in piccoli gruppi e si può osservare che ooteche già deposte richiamano l’attenzione delle femmine in cerca di un sito idoneo. Si ipotizza che il fluido coloso utilizzato per fissare l’ooteca al substrato possa fungere da richiamo per altre femmine.

#### **Utilizzo di feromoni o di attrattivi alimentari per incrementare l’efficacia dei sistemi di monitoraggio e lotta alle blatte**

Già da parecchi anni è noto che l’impiego di feromoni può incrementare l’efficacia dei sistemi di lotta e monitoraggio che prevedono che sia l’insetto a ricercare attivamente un’esca. Tuttavia l’attenzione si è concentrata solo su alcune specie.

I biosaggi effettuati hanno evidenziato che parti del corpo di femmine di *S. longipalpa* hanno un potere attrattivo molto buono nei confronti di maschi adulti, attraendo efficacemente oltre l’80% di essi. Quando un maschio “recettivo” di *S. longipalpa* percepisce il feromone sessuale si attiva, muovendo ripetutamente le antenne, dopodiché in breve tempo si dirige verso la fonte del richiamo. Una volta giunto in prossimità della fonte mostra lo stesso comportamento che si può osservare quando è vicino ad una femmina adulta in fase di richiamo sessuale, ossia fa vibrare velocemente le ali e inarca il corpo, offrendo alla femmina (o in questo caso alla fonte di feromone) il secreto della ghiandola posta sul suo dorso. Il feromone sessuale, potrebbe quindi rappresentare, una volta sintetizzato, un interessante strumento per rendere maggiormente efficienti, ad esempio, le

trappole a fondo invischiato che vengono impiegate per il monitoraggio. È necessario però ricordare che questa fonte attrattiva, seppur molto affidabile, agirebbe solamente nei confronti di individui adulti di sesso maschile, restando comunque un valido strumento di monitoraggio della presenza di questo scarafaggio.

Un'attrattività più completa, rivolta cioè a individui di entrambi i sessi e ogni stadio di sviluppo, viene manifestata da un altro semiochimico molto importante per i *Blattaria*: il feromone di aggregazione.

Attraverso alcuni biosaggi in arena è stato infatti dimostrato che questi insetti tendono ad aggregarsi spontaneamente in un unico rifugio; se però un'area è trattata con estratti fecali si aggregano completamente proprio in quell'area e in un tempo inferiore.

Gli estratti che sono stati preparati partendo da materiale fecale raccolto nei contenitori di allevamento massale, hanno rivelato un buon potere attrattivo, soprattutto se ottenuti con metanolo; gli estratti in fase acquosa hanno dato infatti risultati piuttosto scadenti. Tramite le prove olfattometriche che hanno valutato le risposte di individui di quattro specie a estratti della propria e delle altre specie, hanno fatto comprendere che tali estratti sono efficaci nell'attrarre insetti di ogni sesso ed età almeno nel 65% dei casi (fino a oltre il 95% in *B. germanica*) a livello intraspecifico, e presentano anche un modesto potere attrattivo nei confronti di specie affini (ad esempio l'estratto fecale di *Periplaneta americana* attrae efficacemente il 47,5% degli individui di *Blatta orientalis* e quello di *S. longipalpa* attrae il 17,5% degli individui di *B. germanica*).

Nelle prove condotte è stato anche osservato che insetti privati di una porzione di antenna pari ai 2/3 distali, non rispondono più a stimoli generati da estratti fecali. Ciò fa supporre che i siti recettori coinvolti nella percezione

del feromone di aggregazione siano localizzati sulle antenne e in particolare nei 2/3 distali appunto.

La base delle esche insetticide è solitamente costituita da sostanze alimentari; per questo motivo si è ritenuto importante valutare le preferenze alimentari in particolare di *S. longipalpa*, specie che è stata poco oggetto di questo tipo di studi in passato. Si è osservato che le femmine adulte hanno spesso risposto agli attrattivi alimentari in percentuale maggiore rispetto a maschi adulti e a neanidi. Impiegando oltre una dozzina di sostanze alimentari con caratteristiche differenti in contenuto zuccherino e tenore di umidità, i risultati hanno evidenziato per *S. longipalpa* una spiccata preferenza per alimenti dolci e con elevato contenuto in acqua. Registrando il tempo trascorso da ogni singolo insetto su ogni attrattivo impiegato, è apparsa una relazione tra la percentuale di individui attratti e il tempo medio trascorso sull'alimento, segno che la scelta dell'insetto nei biosaggi in olfattometro corrisponde ad una reale preferenza per quel tipo di alimento.

### **Formulati gel per la lotta alle blatte: contributo al miglioramento**

Come si è detto poco sopra, una delle caratteristiche che rendono una sostanza particolarmente attrattiva per le blatte è l'elevato grado di umidità. I formulati gel soddisferebbero bene questa esigenza, ma purtroppo sono soggetti ad una rapidissima essiccazione. Si è valutato che perdono dal 30 al 65% del loro contenuto in acqua solamente nelle prime 24 ore (a  $21,4 \pm 1,5$  °C e  $56 \pm 3,5$  % U.R.) dalla deposizione della goccia. Questa disidratazione comporta una grave perdita di attrattività nei confronti degli scarafaggi.

Dopo aver verificato che il principio attivo presente nelle esche commerciali comporta una bassissima repellenza, risulta che queste siano significativamente meno attrattive per *B. germanica* rispetto a sostanze alimentari utilizzate come confronto. È stato misurato anche il grado di

appetibilità di alcune esche commerciali valutando direttamente la quantità consumata dagli insetti e anche in questo caso si è osservata una netta preferenza verso fonti di cibo alternative, segno che tali esche non sono realmente appetibili.

Si è dunque proceduto alla preparazione di nuove basi gel e si è arrivati alla formulazione di una base che perde nelle prime 24 ore solamente il 15% circa del proprio contenuto in acqua e si stabilizza nell'arco di una settimana su una perdita totale pari al 21%, molto meno di quanto è stato riscontrato per esche commerciali. Riscontri da prove olfattometriche hanno mostrato che questo nuovo preparato è gradito dalle blatte e mantiene una buona attrattività per molti giorni.

La base gel così preparata è stata unita a estratti fecali e mediante prove in arene, il nuovo prodotto gel approntato ha dimostrato di avere un potere attrattivo decisamente superiore a quello di formulati gel disponibili in commercio, sia nel caso di *B. germanica* sia di *S. longipalpa*. Con quest'ultima specie, le catture registrate in trappole a fondo adesivo nelle quali era stata messa come esca attrattiva una goccia del nuovo gel, sono state più che doppie rispetto al più efficace formulato commerciale. In *B. germanica*, il nuovo gel addizionato di estratti fecali ha portato alla cattura del 100% degli insetti liberati nelle arene in 5 giorni; nello stesso intervallo di tempo, le catture di *S. longipalpa* sono risultate pari al 96,7%.

Risulta pertanto evidente che l'aggiunta di estratti fecali (o di feromone di aggregazione) ad una valida base gel, possa costituire una fonte attrattiva in grado di rendere efficaci formulati gel insetticidi o esche poste all'interno di trappole adesive, sia per il monitoraggio che per la lotta nel controllo delle infestazioni di questi fastidiosi insetti.

# BIBLIOGRAFIA GENERALE

## BIBLIOGRAFIA GENERALE

- ABED D., BROSSUT R., FARINE J-P., 1993 – Evidence for sex pheromones produced by males and females in *Blatta orientalis* (Dictyoptera, Blattidae). – *Journal of Chemical Ecology*, 19(12): 2831-2853.
- ADAMS M.A., NAKANISHI K., STILL W.C., ARNOLD E.V., CLARDY J., PERSOONS C.J., 1979 – Sex pheromone of the American cockroach: absolute configuration of Periplanone-B. – *Journal of American Chemical Society*, 101:2495-2498.
- AJJAN I., ZHANG DA YU, ROBINSON W.H., 1997 – Certified fresh gel baits: laboratory evaluations show gel baits remain attractive and effective on German cockroaches for months. – *Pest Control Technology*, 25(6): 47, 50-52, 56.
- ALBERTAZZI G., 1996 – Esche insetticide e trappole a feromoni per il controllo della *Blattella germanica*. – *Disinfestazione*, Luglio-Agosto 1996: 37-38.
- APPEL A.G., 1992 – Performance of gel and paste bait products for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control: laboratory and field studies. – *Journal of Economic Entomology*, 85(4): 1176-1183.
- APPEL A.G., 1998 – Daily pattern of trap-catch of German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) in kitchens. – *Journal of Economic Entomology*, 91(5): 1136-1141.
- APPEL A.G., BENSON E.P., 1995 – Performance of Abamenctin bait formulations against German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Economic Entomology*, 88(4): 924-931.
- APPEL A.G., TANLEY M.J., 2000 – Laboratory and field performance of an Imidacloprid gel bait against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Economic Entomology*, 93(1):112-118.

- ARZONE A., 1979 – Nuova blatta delle derrate alimentari in Italia. – *Atti del II Simposio su “La difesa antiparassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti”*, Piacenza 28-30.IX.1977, Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Piacenza: 367-371.
- BELL W.J., PARSON C., MARTINKO A., 1972 – Cockroach aggregation pheromones: analysis of aggregation tendency and species specificity (Orthoptera: Blattidae). – *Journal of Kansas Entomological Society*, 45: 414-421.
- BELL W.J., VUTURO S.B., ROBINSON S., HAWKINS W.S., 1977 – Attractancy of the American cockroach sex pheromone (Orthoptera: Blattidae). – *Journal of Kansas Entomological Society*, 50: 503-507.
- BELL W.J., FROMM J., QUISUMBING A.R., KYDONIEUS A.F., 1984 – Attraction of the American Cockroaches (Orthoptera: Blattidae) to traps containing Perplanone B and to insecticide-Periplanone B mixtures. – *Environmental Entomology*, 13: 448-450.
- BENSON E.P., HUBER I., 1989 – Oviposition behavior and site preference of the brownbanded cockroach, *Supella longipalpa* (F.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Entomological Science*, 24(1): 84-91.
- BRANSCOME D.D., KOEHLER P.G., OI F.M., 2005 – Influence of carbon dioxide gas on German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) knockdown, recovery, movement and feeding. – *Physiological Entomology*, 30: 144-150.
- BROOKS M.A., 1957 – Growth-retarding effect of carbon-dioxide anaesthesia on the German cockroach. – *Journal of Insect Physiology*, 1: 76-84.
- BROOKS M.A., 1965 – The effects of repeated anaesthesia on the biology of *Blattella germanica* (Linnaeus). – *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 8: 39-48.
- BUSVINE J.R., 1971 – A critical review of the techniques for testing insecticides. – Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- CHAPMAN R.F., 1998 – The Insects, Structure and Function. – Cambridge University Press, Cambridge.

- CHARLTON R.E., WEBSTER F.X., ZHANG A., SCHAL C., LIANG D., SRENG I., ROELOFS W.L., 1993 – Sex pheromone for the Brownbanded cockroach is an unusual dialkyl-substituted  $\alpha$ -pyrone. – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 90: 10202-10205.
- COHEN R.W., HEYDON S.L., WALDBAUER G.P., FRIEDMAN S., 1987 – Nutrient self-selection by the omnivorous cockroach *Supella longipalpa*. – *Journal of Insect Physiology*, 33(2): 77-82.
- CORNWELL P.B., 1968 – The cockroach. – Ed. Hutchinson & Co LTD, London.
- DOMENICHINI G., CROVETTI A., 1989 – Entomologia urbana e sanità ambientale. – Ed. UTET, Torino.
- DURIER V., RIVAULT C., 2000a – Food bait preference in German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Proceedings of the International Conference on Urban Pests*, Praga 1999: 113-119.
- DURIER V., RIVAULT C., 2000b – Comparisons of toxic baits for controlling the cockroach, *Blattella germanica*: attractiveness and feeding stimulation. – *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 410-418.
- DURIER V., RIVAULT C., 2002 – Influence of a novel object in the home range of the cockroach, *Blattella germanica*. – *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 121-125.
- EBELING W., WAGNER R.E., REIERSON D.A., 1966 – Influence of repellency on the efficacy of blatticides. I. Learned modification of behavior of the German cockroach. – *Journal of Economic Entomology*, 59(6): 1374-1388.
- EBELING W., REIERSON D.A., WAGNER R.E., 1967 – Influence of repellency on the efficacy of blatticides. II. Laboratory experiments with German cockroach. – *Journal of Economic Entomology*, 60(5): 1375-1390.
- EGGLESTON P.A., ARRUDA L.K., 2001 – Ecology and elimination of cockroaches and allergens in the home. – *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(3 Supplement): s422-s429.

- ELIYAHU D., MORI K., TAKIKAWA H., LEAL W.S., SCHAL C., 2004 – Behavioural activity of stereoisomers and a new component of the contact sex pheromone of female German cockroach, *Blattella germanica*. – *Journal of Chemical Ecology*, 30(9): 1839-1848.
- FARR D.V., 1980 – Electric barrier for confining insects in rearing containers. – *New Zealand Entomologist*, 7(2): 192-193.
- FUJITA K., MORI K., 2001 – Synthesis of (2R,4R)-supellapyrone, the sex pheromone of the Brownbanded cockroach, *Supella longipalpa*, and its three stereoisomers. – *European Journal of Organic Chemistry*, (03): 493-502.
- GEMENO C., SCHAL C., 2004 – Sex Pheromones of Cockroaches. – *Advances in Insect Chemical Ecology* (R.T. Carde and J. Millar, Eds.), Chapter 6, pp. 179-247, Cambridge University Press, New York.
- GOLDSTEIN J. I., NEWBURY D. E., ECHLIN P., JOY D. C., FIORI C., LIFSHIN E., 1981 – Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. – Plenum Press, New York.
- HALES R.A., BREED M.D., 1983 – Female calling and reproductive behavior in the Brownbanded cockroach, *Supella longipalpa* (F.) (Orthoptera: Blattellidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, 76(2): 239-241.
- HINTERWIRTH A., ZEINER R., TICHY H., 2004 – Olfactory receptor cells on the cockroach antennae: responses to the direction and rate of change in food odour concentration. – *European Journal of Neuroscience*, 19: 3389-3392.
- HOWELL H.N., MOORE W.S., GRANOVSKY T.A., 1982 – An improved electric barrier for confining insects in containers. – *The Southwestern Entomologist*, 7(4): 260-262.
- KAAKEH W., BENNETT G.W., 1997a – Evaluation of commercial sticky traps used for German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Agriculture Entomology*, 14(3): 349-353.
- KAAKEH W., BENNETT G.W., 1997b – Evaluation of trapping and vacuuming compared with low-impact insecticide tactics for managing German

- Cockroaches in residence. – *Journal of Economic Entomology*, 90(4): 976-982.
- KAAKEH W., BENNET G.W., 1999 – Developmental stage- and gender-dependent differential susceptibility of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) to various commercial baits. – *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 16(1): 9-24.
- KENNEDY J.S., 1978 – The concepts of olfactory ‘arrestment’ and ‘olfaction’. – *Physiological Entomology*, 3: 91-98.
- KOEHLER P.G., AGEE H.R., LEPPLA N.C., PATTERSON R.S., 1987 – Spectral sensitivity and behavioural response to light quality in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, 80(6): 820-822.
- KOEHLER P.G., ATKINSON T.H., PATTERSON R.S., 1991 – Toxicity of Abamectin to Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae). – *Journal of Economic Entomology*, 84(6): 1758-1762.
- KOEHLER P.G., PATTERSON R.S., MARTIN W.R., 1992 – Susceptibility of Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae) to infection by *Steinernema carpocapsae*. – *Journal of Economic Entomology*, 85(4) 1184-1187.
- KOEHLER P.G., STRONG C.A., PATTERSON R.S., 1994 – Rearing improvements for the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Medical Entomology*, 31(5): 704-710.
- KRIVOSHEINA G.G., SHATOV K.S., 1995a – Function of the cockroach (*Blattidae*) sternal gland. – *Pheromones*, 5(1-2): 3-12.
- KRIVOSHEINA G.G., SHATOV K.S., 1995b – Specificity of cockroach trail pheromones. – *Pheromones*, 5(1-2): 13-22.
- LEE D.K., 2002 – Evaluation on the lethal, choice and secondary effects of four insecticidal baits against the German cockroach (Blattaria: Blattellidae). – *Korean Journal of Entomology*, 32(2): 107-112.

- LE PATOUREL G., 2000 – Secondary transmission of fipronil toxicity between Oriental cockroaches *Blatta orientalis* L. in arenas. – *Pest Management Science*, 56: 732-736.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1990a – Circadian rhythmicity and development of the behavioural response to sex pheromone in male brown-banded cockroaches, *Supella longipalpa*. – *Physiological Entomology*, 15(3): 355-361.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1990b – Effects of pheromone concentration and photoperiod on the behavioral response sequence to sex pheromone in the male brown-banded cockroach, *Supella longipalpa*. – *Journal of Insect Behavior*, 3(2): 211-223.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1993a – Calling behavior of the female German cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Insect Behavior*, 6(5): 603-614.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1993b – Ultrastructure and maturation of a sex pheromone gland in the female German cockroach, *Blattella germanica*. – *Tissue and Cell*, 25(5): 763-776.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1993c – Volatile sex pheromone in the female German cockroach. – *Experientia*, 49: 324-328.
- LIANG D.S., SCHAL C., 1994 – Neural and hormonal regulation of calling behavior in *Blattella germanica* females. – *Journal of Insect Physiology*, 40(3): 251-258.
- LIANG D.S., ZHANG A.J., KOPANIC R.J.Jr, ROELOFS W.L., SCHAL C., 1998 – Field and laboratory evaluation of female sex pheromone for detection, monitoring and management of Brownbanded cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). - *Journal of Economic Entomology*, 91(2) 480-485.
- LOCATELLI D.P., 1984 – Valutazione dell'efficacia di alcuni principi attivi ad attività blatticida. – *Atti del III Simposio su "La difesa antiparassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti"*, Piacenza 22-24.IX.1982, Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Piacenza: 243-248.

- MALLIS A., 1990 – Handbook of pest control. – Ed. Franzak & Foster Co., Cleveland, Ohio.
- MELTON R.H., 1995 – Differential adaptation to water deprivation in first-instar nymphs of the German cockroach (*Blattella germanica*) and the brown-banded cockroach (*Supella longipalpa*). – *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 77(1): 61-68.
- MILLER D.M., KOEHLER P.G., PATTERSON R.S., 1997 – Use of German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) fecal extract to enhance toxic bait performance in the presence of alternative food sources. – *Journal of Economic Entomology*, 90(2): 483-487.
- MILLER D.M., KOEHLER P.G., NATION L., 2000 – Use of fecal extract trails to enhance trap catch in German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) monitoring stations. – *Journal of Economic Entomology*, 93(3): 865-870.
- MILLER D.M., MEEK F., 2004 – Cost and efficacy comparison of integrated pest management strategies with monthly spray insecticide applications for German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control in public housing. – *Journal of Economic Entomology*, 97(2): 559-569.
- MOORE W.S., GRANOVSKY T.A., 1983 – Laboratory comparison of sticky traps to detect and control five species of cockroaches (Orthoptera: Blattidae and Blattellidae). – *Journal of Economic Entomology*, 76(4): 845-849.
- NALYANYA G., SCHAL C., 2001 – Evaluation of attractant for monitoring population of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Economic Entomology*, 94(1): 208-214.
- NALYANYA G., LIANG D.S., KOPANIC R.J.Jr, SCHAL C., 2001 – Attractiveness of insecticide bait for cockroach control (Dictyoptera: Blattellidae): laboratory and field studies. – *Journal of Economic Entomology*, 94(3): 686-693.
- NISHIDA R., KUWAHARA Y., FUKAMI H., ISHII S., 1976a – Female sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: Blattellidae), responsible for male wing-raising. II. 29-

- hydroxy-3,11-dimethyl-2-nonacosanone. – *Journal of Chemical Ecology*, 2: 449-499.
- NISHIDA R., SATO T., KUWAHARA Y., FUKAMI H., ISHII S., 1976b – Female sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: Blattellidae), responsible for male wing-raising. IV The absolute configuration of the pheromone, 3,11-dimethyl-2-nonacosanone. – *Journal of Chemical Ecology*, 5(2): 289-297.
- NISHINO C., MANABE S., KUWABARA K., KIMURA R., TAKAYANAGI H., 1982 – Isolation of sex pheromone of the american cockroach by monitoring with electroantennogram responses. – *Insect Biochemistry*, 13(1): 65-70.
- NOJIMA S., SAKUMA M., NISHIDA R., KUWAHARA, 1999 – A glandular gift in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera : Blattellidae) : The courtship feeding of a female on secretions from male tergal glands. – *Journal of Insect Behavior*, 12(5): 627-640.
- NOJIMA S., KUGIMIYA S., NISHIDA R., SAKUMA M., KUWAHARA Y., 2002 – Oligosaccharide composition and pheromonal activity of male tergal gland secretions of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). – *Journal of Chemical Ecology*, 28(7): 1483-1494.
- NOJIMA S., SCHAL C., WEBSTER F.X., SANTANGELO R.G., ROELOFS W.L., 2005 – Identification of the sex pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica*. – *Science*, vol. 307: 1104-1106.
- PERSOONS G.J., VERWIEL P.E.J., RITTER F.J., NOOYEN W.J., 1981 – Studies on sex pheromone of American cockroach, with emphasis on structure elucidation of Periplanone-A. – *Journal of Chemical Ecology*, 8(2): 439-451.
- PHILLIPS A.D.G., WYATT T.D., 1992 – Beyond origami: using behavioural observations as a strategy to improve trap design. – *Entomologia experimentalis applicata*, 62: 67-74.
- PILON N., 2004 – Due nuove specie di infestanti in Italia: *Periplaneta australasiae* e *Tapinoma melanocephalum*. – *Igiene Alimenti - Disinfestazione & Igiene Ambientale*, Gennaio/Febbraio 2004: 18-19.

- POSPISCHIL R., SCHNEIDER U., BÖCKER T., JUNKERSDORF J., NENTWIG G., SMITH G., SONNECK R., 1999 – Efficacy of Imidacloprid for cockroach control in a gel bait formulation. – *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 52(9): 376-390.
- PRAKASH S., MENDKI M.J., RAO K.M., SINGH K., SINGH R.N., 1995 – Sensilla on the maxillary and labial palps of the cockroach *Supella longipalpa* Fabricius (Dictyoptera: Blattellidae). – *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, 24(1): 13-34.
- RAMASWAMY S.B., GUPTA P., 1981 – Sensilla of the antennae and the labial and maxillary palps of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): their classification and distribution. – *Journal of Morphology*, 168: 269-279.
- RIVAULT C., CLOAREC A., LE GUYADER A., 1994 – Cockroaches as vectors of pathogenic bacteria in urban environments. – *Ecologie*, 25(2): 103-109.
- ROBINSON W.H., 1996 – Urban entomology. – Ed. Chapman & Hall, London.
- ROTH L.M., COHEN S., 1973 – Aggregation in Blattaria. - *Annals of the Entomological Society of America*, 66(6): 1315-1323.
- RUST M.K., APPEL A.G., 1985 – Intra- and interspecific aggregation in some nymphal blattellid cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, 78(1): 107-110.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1985 – The linear track olfactometer: an assay device for taxes of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) toward their aggregation pheromone. – *Applied Entomology and Zoology*, 20(4): 387-402.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1990 – The aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): isolation and identification of the attractant components of the pheromone. – *Applied Entomology and Zoology*, 25(3): 355-368.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1991 – Aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae):

- choice-chamber assay for arrestant component(s). – *Applied Entomology and Zoology*, 26(2): 223-235.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1993a – Aggregation arrestant pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): isolation and structure elucidation of blattellastenoside-A e –B. – *Journal of Chemical Ecology*, 19(11): 2521-2541.
- SAKUMA M., FUKAMI H., 1993b – Novel steroid glycosides as aggregation pheromone of the German cockroach. – *Tetrahedron Letters*, 34(38): 6059-6062.
- SAKUMA M., FUKAMI H., KUWAHARA Y., 1997a– Aggregation pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): controlled release of attractant amines by salt formation. – *Applied Entomology and Zoology*, 32(1): 143-152.
- SAKUMA M., FUKAMI H., KUWAHARA Y., 1997b– Attractiveness of alkylamines and aminoalcohols related to the aggregation attractant pheromone of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Applied Entomology and Zoology*, 32(1): 197-205.
- SCHAL C., HAMILTON R., 1990 – Integrated suppression of synanthropic cockroaches. – *Annual Review of Entomology*, (35): 521-551.
- SCHAL C., LIANG D., HAZARIKA L.K., CHARLTON R.E., ROELOFS W.L., 1992 – Site of pheromone production in female *Supella longipalpa* (Dictyoptera: Blattellidae): behavioral, electrophysiological, and morphological evidence. – *Annals of the Entomological Society of America*: 85(5): 605-611.
- SCHERKENBECK J., NENTWIG G., JUSTUS K., LENZ J., GONDOL D., WENDLER G., DAMBACH M., NISCHK F., GRAEF C., 1999 – Aggregation agents in German cockroach *Blattella germanica*: examination of efficacy. – *Journal of Chemical Ecology*, 25(5): 1105-1119.
- SEELINGER G., 1984 – Interspecific attractivity of female sex pheromone components of *Periplaneta Americana*. – *Journal of Chemical Ecology*, 11(2): 137-148.

- SLATER A.J., HURLBERT J., LEWIS V.R., 1980 – Biological control of Brownbanded cockroach. – *California Agriculture*, 34(8/9): 16-18.
- SMITH A.F., SCHAL C., 1991 – Circadian calling behaviour of the adult female brown-banded cockroach, *Supella longipalpa* (F.) (Dictyoptera: Blattellidae). – *Journal of Insect Behavior*, 4: 1-14.
- SRINIVASAN R., JAMBULINGAM P., SUBRAMANIAM S., KALYANASUNDARAM M., 2005 – Laboratory evaluation of fipronil against *Periplaneta americana* & *Blattella germanica*. – *Indian Journal of Medical Research*, 122: 57-66.
- SÜSS L., LOCATELLI D.P., 2001 – I parassiti delle derrate. – Ed. Calderini Ed agricole, Bologna.
- TAKAHASHI S., TAKEGAWA H., TAKABAYASHI J., ABDULLAH M., FATIMAH A.S., MOHAMED M., 1988 – Sex pheromone activity of synthetic Periplanone-B in male cockroaches of Genera *Periplaneta* and *Blatta*. – *Journal of Pesticide Science*, 13: 125-127.
- TOKRO P.G., BROSSUT R., SRENG L., 1993 – Mise en evedence de la pheromone sexuelle chez les femelles de *Blattella germanica* L.. – *Insect Science Application*, 14(1) : 115-126.
- VAN DRIESCHE R.G., HULBERT C., 1984 – Host acceptance and discrimination by *Comperia merceti* (Compere) (Hymenoptera: Encyrtidae) and evidence for an optimal density range for resource utilization. – *Journal of Chemical Ecology*, 10(9):1399-1409.
- WALDOW U., SASS H., 1983 – The attractivity of the female sex pheromone of *Periplaneta americana* and its components for conspecific males and males of *Periplaneta australasiae* in the field. – *Journal of Chemical Ecology*, 10(7): 997-1006.
- WARTHEN JR. J.D., UEBEL E.C., LUSBY W.R., ADLER V.E., 1983 – Investigation of a sex pheromone for the oriental cockroach, *Blatta orientalis*. – *Journal of Insect Physiology*, 29(8): 605-609.
- WILEYTO E.P., BOUSH G.M., 1983 – Attraction of the German cockroach, *Blattella germanica* (Orthoptera: Blatellidae), to some volatile food components. – *Journal of Economic Entomology*, 76: 752-756.

WRIGHT C.G., 1977 – Sex pheromone release by virgin females of the brown-banded cockroach, *Supella longipalpa* (F.). – *Journal of Georgia Entomological Society*, 12: 281-283.

ZHAI J., ROBINSON W.H., 1990 – The walking behavior of German cockroaches. – *Pest Control Technologies*, July 1990: 44-46.