

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

FACOLTA' DI AGRARIA

Dottorato di Ricerca in Entomologia Agraria

XXI CICLO

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali

Settore Scientifico-disciplinare MIUR: AGR11

**EFFICACIA DEL PARASSITOIDE *EXORISTA LARVARUM* (L.)
(DIPTERA TACHINIDAE) PRODOTTO IN CATTIVITÀ:
MIGLIORAMENTO DELLE TECNICHE DI ALLEVAMENTO,
ACCETTABILITÀ DI INSETTI BERSAGLIO E RUOLO SVOLTO
DALLA PIANTA SUL PROCESSO DI PARASSITIZZAZIONE**

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

Dott. ssa LAURA DEPALO

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. PIERO BARONIO

Tutori:

Chiar. mo Prof. PIERO BARONIO

Dott. ssa MARIA LUISA DINDO

Prof. ssa MATILDE EIZAGUIRRE

Esame finale anno 2009

INDICE	pag. 1
CAPITOLO 1	
1.1 Cenni di biologia di <i>Exorista larvarum</i>	pag. 3
1.2 Allevamento in vivo e in vitro di <i>Exorista larvarum</i>	pag. 7
1.2.1 Allevamento in vivo	pag. 7
1.2.2 Allevamento in vitro	pag. 8
1.3 Scopi della ricerca	pag. 12
CAPITOLO 2	
2.1 Allevamento in vitro di <i>Exorista larvarum</i> (L.): effetto della conservazione a breve termine a varie temperature sulla vitalità delle uova	pag. 14
2.2 Conservazione degli insetti a basse temperature	pag. 15
2.3 Materiali e Metodi	pag. 17
2.4 Risultati	pag. 19
2.5 Discussione dei risultati e conclusioni	pag. 27
CAPITOLO 3	
3.1 Accettabilità di Lepidotteri Nottuidi da parte del parassitoide <i>Exorista larvarum</i> (L.)	pag. 30
3.2 Accettabilità di <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval)	pag. 33
3.3 Materiali e Metodi	pag. 35
3.3.1 Allevamento di <i>S. littoralis</i>	pag. 35
3.3.2 Impostazione delle prove	pag. 36
3.3.3 Rilievo dei dati e analisi statistica	pag. 37
3.4 Risultati	pag. 39
3.5 Accettabilità di <i>Pseudaletia unipuncta</i> (Haworth)	pag. 40
3.6 Materiali e Metodi	pag. 41
3.6.1 Allevamento di <i>P. unipuncta</i>	pag. 41
3.6.2 Impostazione delle prove	pag. 43
3.6.3 Rilievo dei dati e analisi statistica	pag. 43
3.7 Risultati	pag. 44
3.8 Discussione dei risultati e conclusioni	pag. 47

CAPITOLO 4

- 4.1 Ruolo svolto dalla pianta nel processo di parassitizzazione di Lepidotteri Nottuidi da parte del parassitoide *Exorista larvarum* (L.) pag. 51
- 4.2 Materiali e metodi *E. larvarum* – *S. littoralis* pag. 54
 - 4.2.1 Risultati pag. 55
- 4.3 Materiali e metodi *E. larvarum* – *P. unipuncta* pag. 57
 - 4.3.1 Risultati pag. 60
- 4.4 Discussione dei risultati e conclusioni pag. 61

CAPITOLO 5

- 5.1 Comportamento difensivo di differenti larve di lepidottero in seguito all'attacco da parte del tachinide *E. larvarum* pag. 63
- 5.2 Materiali e metodi pag. 64
- 5.3 Risultati pag. 65
- 5.4 Conclusioni pag. 66

CAPITOLO 6

- 6.1 Considerazioni conclusive sulle prospettive di impiego dei tachinidi in lotta biologica, con particolare riferimento a *E. larvarum* pag. 69

BIBLIOGRAFIA

pag. 72

Efficacia del parassitoide *Exorista larvarum* (L.) (Diptera Tachinidae) prodotto in cattività: miglioramento delle tecniche di allevamento, accettabilità di insetti bersaglio e ruolo svolto dalla pianta sul processo di parassitizzazione

CAPITOLO 1

1.1 Cenni di biologia di *Exorista larvarum*

E. larvarum è un parassitoide larvale appartenente alla sottofamiglia Exoristinae, considerata la più primitiva nella famiglia dei Tachinidae (Richter, 1991). La specie è ad ampia geonemia, essendo presente in Europa, Asia e Nord Africa; agli inizi del secolo scorso è stata introdotta negli Stati Uniti dall'Europa (Herting, 1960). Gli ospiti appartengono per lo più all'ordine dei lepidotteri, nell'ambito del quale già diversi anni fa numerose specie (più di 45) erano state segnalate come vittime del tachinide (Hafez, 1953a; Herting, 1960). Tra queste, alcune sono di ampio interesse agrario e forestale: *Lymantria dispar* (L.), *Hyphantria cunea* (Drury), *Dendrolimus pini* L. (Csoka *et al.*, 1989) e più marginalmente, *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller) (Montoya, 1970). Nei boschi di quercia da sughero in Sardegna, *E. larvarum* rappresenta un importante agente di contenimento di diversi lepidotteri defogliatori quali la stessa *L. dispar*, *Malacosoma neustria* (L.) (Delrio *et al.*, 1983) e *Tortrix viridana* L. (Delrio *et al.*, 1988). Nonostante Herting (1960) consideri *E. larvarum* come la seconda più importante specie antagonista di *L. dispar* in Europa, finora il suo utilizzo in programmi di lotta biologica è stato limitato a sporadici interventi inoculativi effettuati nel nord degli Stati Uniti (Grimble, 1976; Sabrosky e Reardon, 1976); su ciò hanno probabilmente inciso anche gli elevati costi di produzione. Come verrà illustrato più avanti, *E. larvarum* però, è anche l'unico tachinide che, allevato *in vitro*, ha dato dei risultati positivi (resa in adulti e peso dei pupari paragonabili a quelli ottenuti *in vivo* – Mellini e Campadelli, 1995, 1996b; Dindo *et al.*, 1999b) tali da poter ipotizzare, in un futuro prossimo, una sua produzione massale finalizzata all'utilizzo in programmi di lotta biologica.

La biologia di *E. larvarum* è stata studiata da Hafez (1953c) sul nottuide *Prodenia litura* (F.), in Egitto. Essa è caratterizzata da elevata polifagia e da un rapporto poco complesso con l'ospite, che viene ucciso in tempi piuttosto rapidi (Mellini e Campadelli, 1996a). E' inoltre considerata dalla maggior parte degli Autori un parassitoide gregario, anche se osservazioni effettuate da Mellini e Campadelli (1996a) nell'ospite di sostituzione *G. mellonella* hanno evidenziato che *E. larvarum*, a seconda delle circostanze, manifesta un comportamento intermedio tra quello tipico delle forme strettamente gregarie e quello delle forme solitarie: infatti, in un ospite può svilupparsi anche un solo parassitoide.

Le femmine depongono uova macrotipiche (aventi mediamente 0,6 mm di lunghezza) sul corpo delle vittime. Nell'atto della parassitizzazione, si collocano di lato alle larve ospiti e vi depositano le uova estroflettendo l'ovopositore di sostituzione. In questo modo la parte ventrale dell'uovo viene a combaciare perfettamente con la convessità del corpo dell'ospite, garantendo una sicura fissazione. Le uova sono distribuite prevalentemente nelle zone laterali e dorsali delle vittime con una preferenza verso il torace e i primi uriti. In alcuni casi, sul medesimo ospite si possono verificare delle deposizioni ravvicinate, in quanto nella vagina possono trovarsi contemporaneamente 4-5 uova; di solito però tra l'emissione di un uovo e l'altro trascorre un discreto lasso di tempo (Mellini *et al.*, 1993). Secondo Hafez (1953c), le femmine depongono mediamente 7 uova giornaliere in un arco di circa 20-25 giorni. Frequentemente può manifestarsi, precedentemente alla schiusa, la perdita di uova deposte sulle vittime, per un distacco causato dallo strofinio delle larve tra loro o contro le superfici, o per muta delle larve ospiti (Mellini *et al.*, 1993; Mellini e Campadelli, 1996a). La parassitizzazione ha dunque maggior probabilità di successo quando vengono attaccate larve ospiti in stadio avanzato (Hafez, 1953c). Le uova, al momento dell'emissione, di solito non sono embrionate per cui, a 26-27°C, occorrono circa 3 giorni affinché avvenga la schiusa. Tuttavia, in assenza di ospiti, le femmine possono trattenere le uova più a lungo all'interno del loro corpo, finendo col deporle a sviluppo embrionale più o meno avanzato: in tali casi le larve possono uscire anche solo dopo un giorno (Mellini *et al.*, 1993). All'atto della schiusa, la larvetta del parassitoide abbandona l'uovo attraverso una linea predeterminata di rottura

che circonda il polo cefalico e perfora il tegumento dell'ospite, preventivamente ammorbidito mediante saliva, con l'ausilio di un uncino boccale appuntito. La penetrazione solitamente avviene nei pressi del polo cefalico dell'uovo, ma può verificarsi anche ad alcuni millimetri di distanza nel caso in cui la larveta neogusciata si muova sul tegumento della vittima (Hafez, 1953c).

Come tutti i tachinidi, *E. larvarum* presenta tre stadi larvali endofagi. Le larve di I età inducono, appena penetrate nell'ospite, la formazione di un imbuto respiratorio tegumentale primario restando ancorate con l'ultimo urite alla ferita praticata. L'avvenuta parassitizzazione è confermata, nei giorni successivi, dalla presenza di una macchia scura sul tegumento dell'ospite, in corrispondenza del foro di penetrazione e dell'imbuto (Fig.1).

Le larvette, il cui sviluppo non è condizionato dalla fisiologia dell'ospite (Mellini *et al.*, 1993) (né la condizionano) portano rapidamente a morte la vittima. Di solito lo sviluppo larvale del parassitoide si completa nella larva ospite, solo assai raramente nella pupa. L'impupamento del parassitoide avviene generalmente all'esterno dei resti dell'ospite. Il tempo che intercorre tra la formazione del pupario e lo sfarfallamento dell'adulto è di circa dieci giorni ma può variare in relazione alle condizioni climatiche.

Osservazioni condotte durante la gestione dell'allevamento presso i laboratori del DiSTA hanno evidenziato che, a 27° C, lo sviluppo da uovo ad adulto avviene in circa 16 giorni (3 gg per la schiusa dell'uovo; 6 giorni per lo sviluppo larvale fino all'impupamento e 8 gg dalla formazione del pupario allo sfarfallamento dell'adulto).

Gli adulti si accoppiano subito dopo lo sfarfallamento (Fig.2) e le femmine, trascorso un periodo di pre-ovideposizione variabile in natura da 3 giorni in estate a 6 giorni in autunno, si avviano all'ovideposizione (Hafez, 1953c). In laboratorio, a 26°C, il periodo di pre-ovideposizione dura circa 2-3 giorni (Mellini *et al.*, 1993).



Figura 1. Uova schiuse di *E.larvarum*. E' visibile un foro di penetrazione di una larva

Figura 2. Adulti di *E.larvarum* in accoppiamento

Figure 1. Hatched eggs of *Exorista larvarum*. It is possible to detect an entrance hole of a parasitoid larva

Figure 2. *Exorista larvarum* adults while mating

Come tutti i tachinidi, *E. larvarum* si nutre, allo stato adulto, di liquidi zuccherini (nettare, melata). La longevità degli adulti dipende da più fattori: i più importanti risultano essere il cibo, la temperatura e il sesso. In generale le femmine sono più longeve dei maschi e in media, in condizioni di laboratorio, la longevità dei maschi è di 18 giorni, mentre quella delle femmine è di 21-22 giorni. La sex-ratio è di 1:1 (Hafez, 1953c; Dindo *et al.*, 2002, 2004).

La specie è caratterizzata da un evidente dimorfismo sessuale: i maschi presentano i pretarsi biforcuti, mentre nelle femmine tale biforcazione è molto meno evidente (Hafez, 1953b).

1.2 Allevamento *in vivo* e *in vitro* di *Exorista larvarum*

1.2.1 Allevamento *in vivo*

Presso i laboratori di Entomologia del DiSTA, questo parassitoide viene allevato a spese dell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella*. L'allevamento è stato avviato nel 1992 ad opera di Amadou K. Coulibaly, partendo da un centinaio di individui sfarfallati da larve e crisalidi di *Hyphantria cunea* Drury (Lep. Arctiidae) raccolte in provincia di Forlì-Cesena, e rinnovato ad opera di Luca Sighinolfi nel 2004, a partire da pupari ottenuti da larve di *H. cunea* raccolte in provincia di Modena.

L'allevamento massale viene effettuato in cella climatizzata con temperatura di 25-26°C, umidità relativa del 70-80% e fotoperiodo 16:8. Gli adulti del tachinide sono tenuti all'interno di gabbie trasparenti in plexiglass (dimensioni di 40x30x30 cm) in numero di 50-70 individui per gabbia; la pareti presentano aperture laterali protette da rete metallica a maglia fine per consentire una migliore areazione. Sul lato frontale è presente un'apertura a saracinesca per le operazioni di nutrizione e parassitizzazione. L'alimentazione degli adulti è costituita da zucchero in zollette e da una soluzione di acqua e miele (20%) somministrata mediante batuffoli di cotone posti sul fondo di capsule Petri di plastica; il fabbisogno idrico invece è assicurato da abbeveratoi con una capienza di 150-200 ml con un coperchio a incastro sul quale è presente un foro da cui fuoriesce l'estremità di un tampone di cotone. Per mantenere il tampone umido, si riempie l'abbeveratoio con acqua distillata. Le operazioni di nutrizione e controllo degli abbeveratoi vengono effettuate 3 volte la settimana a giorni alterni.

L'accoppiamento avviene poco dopo lo sfarfallamento e dopo circa 3 giorni inizia la deposizione delle uova macrotipiche. Mediamente una volta la settimana si compie la parassitizzazione, introducendo larve mature di *G. mellonella* in numero proporzionale a quello delle femmine del dittero (circa 3 per femmina) (Hafez, 1953c; Bratti e Coulibaly, 1995; Dindo *et al.*, 1999b); è importante che le larve ospiti non siano prossime alla muta, poichè se questa avviene prima di tre giorni dalla deposizione delle uova, esse potrebbero venire rigettate con l'esuvia (Mellini *et al.*, 1993). Trascorsi 40-60 minuti,

tempo necessario affinché vengano deposte mediamente 3-4 uova sul tegumento dell'ospite (numero ottimale ai fini della produzione di adulti del tachinide, secondo Mellini e Campadelli, 1996a) si procede all'estrazione della larve dalla gabbia. Le larve parassitizzate vengono poi poste in una scatola di plexiglass (24x13x8 cm) con apertura protetta da retina metallica; questa viene sistemata nella cella di allevamento degli adulti del dittero. Dopo 6-7 giorni dalla parassitizzazione si formano i primi pupari che vengono collocati in una nuova gabbia, contenente le zollette di zucchero e l'abbeveratoio, in attesa dello sfarfallamento, che avviene in circa 6 giorni.

1.2.2 Allevamento *in vitro*

L'allevamento *in vitro* degli insetti entomofagi, cioè direttamente su una dieta artificiale e dunque in assenza dell'insetto ospite o preda, è una tecnica interessante dal punto di vista sia scientifico che applicato. Da un lato, infatti, essa può consentire di approfondire lo studio della biologia, fisiologia ed esigenze nutrizionali degli entomofagi; dall'altro, grazie all'eliminazione di un livello trofico (l'ospite o la preda), questa procedura di produzione potrebbe consentire di rendere meno complesso e costoso l'allevamento di parassitoidi e predatori, sempre che venga messa a punto una dieta efficace e di semplice preparazione. Tuttavia, sul piano applicato, la procedura *in vitro* per la produzione di insetti entomofagi non è ancora, al momento, andata oltre la fase sperimentale. All'allevamento *in vitro* degli insetti entomofagi sono dedicate ampie rassegne bibliografiche, alle quali si rimanda per un approfondimento degli aspetti generali (Grenier *et al.*, 1994; Consoli e Parra, 1999; Thompson e Hagen, 1999; Grenier e De Clercq, 2003)

Allo stato attuale *E. larvarum* è l'unico tachinide per cui i risultati riguardanti l'allevamento *in vitro* sono già tali da rendere possibile l'impiego di tale tecnica per la produzione massale.

E. larvarum è un parassitoide particolarmente idoneo all'allevamento *in vitro* per diversi motivi: a) presenta un'elevata polifagia e un rapporto semplice con l'ospite (Mellini e Campadelli, 1996a); b) le larve inducono la formazione di imbuti respiratori tegumentali

primari; possono usufruire così di ossigeno in abbondanza fin dall'inizio del loro sviluppo e crescere a un ritmo rapido (Mellini *et al.*, 1996); c) possono sopravvivere e accrescersi anche in diete inquinate da muffe, se la contaminazione non è molto precoce, scendendo a nutrirsi negli strati di pabulum non alterati (Mellini *et al.*, 1993; Dindo *et al.*, 2003).

E. larvarum è stata allevata per prima volta *in vitro* su una dieta composta di siero bovino (75%), integrata con: estratto di crisalide dell'ospite di sostituzione *G. mellonella* in misura del 20%, estratto di lievito di birra, trealosio e tuorlo di uovo; come supporto fisico della dieta, che era liquida, è stato usato agar (Mellini *et al.*, 1993). La resa in adulti è stata di poco inferiore a quella che si ottiene normalmente *in vivo* su *G. mellonella* (= 40-45% delle uova poste in coltura) (Mellini e Campadelli, 1996b).

Nei successivi lavori le prove sono state finalizzate a semplificare la preparazione della dieta e a eliminare il materiale derivato dall'ospite dalla dieta stessa. Una dieta efficace, priva di materiale derivato dall'ospite è stata messa a punto da Mellini e Campadelli (1995). Tale dieta (tuttora impiegata presso il DiSTA) è costituita da latte scremato, estratto di lievito di birra, tuorlo di uovo e piccoli quantitativi di saccarosio. Sono state ottenute rese in adulti fertili pari a circa il 43-44 % delle uova poste in coltura e il peso medio dei pupari è risultato simile a quello ottenuto *in vivo*. *E. larvarum* ha dimostrato di non essere molto esigente a livello nutrizionale (anche grazie alla sua polifagia). Viceversa è sensibile alle caratteristiche fisiche del substrato. Quest'ultimo non deve avere una superficie coperta da veli liquidi, nè deve essere troppo soffice (Mellini e Campadelli, 1996b). Così, le diete devono essere gelificate con agar per impedire l'affondamento delle larvette, o supportate da cotone idrofilo (Dindo *et al.*, 2003).

Per ridurre le probabilità di contaminazione della dieta, il substrato viene di norma addizionato con soluzione di gentamicina e le uova vengono disinfettate con alcool etilico al 60%. Vengono poi sciacquate con acqua distillata sterile prima di essere poste in coltura (Mellini e Campadelli, 1999). Gli adulti ottenuti *in vitro* (sulla dieta indicata e su altre qui non descritte, messe a punto da Bratti *et al.*, 1995 e da Dindo *et al.*, 1999, si sono sempre normalmente accoppiati e le femmine hanno ovideposto su *G. mellonella* dando

origine a una successiva generazione nell'ospite. In alcuni casi (Dindo *et al.*, 1999a) sono state ottenute 3 generazioni *in vitro* posando sul pabulum uova deposte da femmine a loro volta allevate sulla stessa dieta.

Il controllo di qualità degli insetti entomofagi prodotti massalmente, a scopo commerciale, ma anche sperimentale, è di importanza fondamentale anche quando la procedura viene attuata secondo il modello standard cioè a spese di un ospite o di una preda (Van Lenteren, 2003). A maggior ragione è fondamentale valutare la qualità degli insetti entomofagi prodotti su diete artificiali, poiché questi devono essere competitivi rispetto a quelli allevati *in vivo*, sia per quanto riguarda i parametri biologici (fecondità, longevità, capacità di individuazione della preda/ospite e tasso di predazione/parassitizzazione valutate in laboratorio), sia (soprattutto) per quanto riguarda le prestazioni in campo (Grenier e De Clercq, 2003).

Per quanto riguarda, nello specifico, la qualità di tachinidi allevati *in vitro*, è stato ottenuto il completo sviluppo *in vitro* di *E. larvarum* su dieta artificiale priva di materiale proveniente dall'ospite con una resa in adulti simile a quella ottenuta sull'ospite di sostituzione *G. mellonella* (Mellini e Campadelli, 1995; Dindo *et al.* 1999a). Dindo *et al.* (2006) hanno inoltre dimostrato che femmine di *E. larvarum* allevate *in vivo* su *G. mellonella* e *in vitro* su due diete artificiali (a base di latte e a base di omogeneizzato carne, avevano la stessa longevità; a parità di peso, tuttavia, le femmine di *E. larvarum* ottenute *in vitro* hanno deposto un minor numero di uova rispetto a quelle allevate a spese dell'ospite di sostituzione. Ciò suggerisce che la composizione delle diete artificiali impiegate non è ottimale e va migliorata.

L'allevamento *in vitro* dei parassitoidi che ovidepongono sul o nel corpo dell'ospite viene di norma effettuato a partire da uova (o larvette, nelle specie vivipare) prelevate dalla vittima previamente superparassitizzata. Questa tecnica comporta, ovviamente, la disponibilità dell'insetto ospite e non consente, quindi, di eliminare completamente tale insetto dalla linea produttiva dell'entomofago, nemmeno per una generazione (Thompson e Hagen, 1999). Anche nel caso di *E. larvarum* le uova macrotipiche da porre in coltura *in vitro* vengono di solito prelevate dal tegumento dell'ospite.

Va però notato che, in natura, molte specie di tachinidi, che depongono uova macrotipiche sull'ospite, in mancanza di vittime, rilasciano le uova nell'ambiente (Mellini, 1990). Tali uova vanno normalmente perdute, poiché le larve che ne fuoriescono non trovano un adeguato substrato dove potersi sviluppare. Nel caso di *E. larvarum*, se le femmine restano prive di ospiti per alcuni giorni, trattengono le uova nella grossa vagina piriforme e sono indotte a deporre anche in assenza della vittima manifestando una preferenza per gli oggetti sporgenti, compresi i corpi morti delle stesse *E. larvarum* (Mellini e Campadelli, 1996a). In cattività è stato poi osservato che le femmine rilasciano uova nell'ambiente anche se vengono regolarmente esposte loro delle larve ospiti; si è pertanto pensato di porre queste uova su dieta artificiale, al fine di svincolare l'allevamento del parassitoide dalla continua disponibilità dell'ospite e di recuperare le uova rilasciate nell'ambiente che altrimenti andrebbero perse (Dindo *et al.*, 2007). Tali uova hanno dimostrato, in prima generazione, di avere la stessa capacità di schiusa *in vitro* rispetto alle uova prelevate dal tegumento dell'ospite; inoltre, sulla dieta artificiale a base di latte scremato (quella messa a punto da Mellini e Campadelli, 1995a), i parassitoidi ottenuti da tali uova si sono sviluppati fino allo stadio adulto con rese paragonabili a quelle ottenute da uova prelevate dal tegumento dell'ospite (Dindo *et al.*, 2007). E' stato pertanto dimostrato che, almeno per una generazione, l'allevamento di *E. larvarum* può essere svincolato dalla disponibilità dell'ospite. Peraltro, un lavoro recente (Marchetti *et al.*, 2008) ha evidenziato che la qualità degli adulti ottenuti *in vitro* peggiora drasticamente già in seconda generazione (soprattutto in termini di fecondità delle femmine e fertilità delle uova). Ciò si verifica in particolare nel caso di femmine ottenute da uova deposte fuori dall'ospite: le femmine di seconda generazione allevate su dieta artificiale a partire da uova deposte nell'ambiente sono sopravvissute solo 1-2 giorni e non sono state in grado di ovideporre. Comunque, l'uso di uova deposte nell'ambiente, di prima generazione, ai fini della produzione *in vitro* del parassitoide, può essere una valida metodica in periodi di scarsità di ospiti e/o di parassitoidi.

1.3 Scopi della ricerca

Come evidenziato nella parte introduttiva, *E. larvarum* è un parassitoide che può essere prodotto massalmente con relativa facilità, sia *in vivo* che *in vitro*. Questa caratteristica lo rende interessante ai fini di un suo possibile utilizzo in lotta biologica e integrata (Dindo, 2007).

Si giustificano quindi ricerche mirate a rendere le tecniche di allevamento del tachinide via via più snelle ed efficienti, nonché ad approfondire aspetti della sua biologia e delle interazioni con gli ospiti. In tali ambiti si inquadrano gli studi svolti nella presente tesi, i cui scopi sono stati i seguenti.

- 1) Al fine di migliorare l'allevamento di *E. larvarum*, rendendolo ancora più flessibile, si è voluta valutare la possibilità di conservare, nel breve periodo, le uova macrotipiche del parassitoide, per poi recuperarle ponendole su dieta artificiale.
- 2) Si sono inoltre volute proseguire le indagini, iniziate in lavori precedenti (Dindo *et al.*, 1999b; 2002; Simoes *et al.*, 2004), circa l'accettabilità e idoneità di specie bersaglio di interesse economico nei confronti di *E. larvarum* allevata *in vivo* su *G. mellonella*; sono stati presi in considerazione due lepidotteri nottuidi, uno di interesse italiano, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) e uno di interesse spagnolo *Pseudaletia unipuncta* (Haworth).
- 3) Infine, si è iniziato a indagare il ruolo svolto dalla pianta ospite sul processo di parassitizzazione delle specie bersaglio *S. littoralis* e *P. unipuncta* da parte di *E. larvarum*.

Come verrà specificato anche più avanti, le prove riguardanti *P. unipuncta* sono state svolte presso il Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal dell'Università di Lleida (Spagna).

S. littoralis è stata selezionata come caso-studio nella presente tesi, perché si sta rendendo via via responsabile di danni alle più svariate colture erbacee nelle regioni centro-meridionali della penisola italiana e in Sicilia. L'elevata polifagia rende la specie particolarmente difficile da combattere poiché, pur sconfitta in una coltura, essa sopravvive nei campi vicini su altre colture (Sannino *et al.*, 2006). La specie è inserita nella lista A2 dell'EPPO. *P. unipuncta* è stata a sua volta selezionata come caso-studio per

le ricerche svolte in Spagna, perché, negli ultimi anni, si è resa responsabile di danni al mais e a prati di parchi pubblici nell'area di Lleida (Lopez *et al.*, 2000) . La possibilità di impiego di *E. larvarum* come agente di lotta biologica sarebbe dunque di interesse per entrambi i fitofagi. Maggiori dettagli sulla biologia di *S. littoralis* e *P. unipuncta* sono illustrati nel Capitolo 3.

CAPITOLO 2

2.1 Allevamento *in vitro* di *Exorista larvarum* (L.) : effetto della conservazione a breve termine a varie temperature sulla vitalità delle uova

Nella parte introduttiva è stato illustrato come *E. larvarum* possa essere allevata *in vitro* su dieta artificiale priva di materiale proveniente dall'ospite (Mellini e Campadelli 1995; Dindo *et al.* 1999a, 2003). E' stato anche evidenziato come le uova deposte nell'ambiente siano recuperabili per la produzione del parassitoide ponendole sulla dieta artificiale; in tal modo è possibile, almeno per una generazione, svincolare l'allevamento del tachinide dalla costante disponibilità dell'ospite (Dindo *et al.*, 2007). Tale possibilità non può consentire l'eliminazione dell'insetto ospite a lungo termine, perché ciò andrebbe a scapito della qualità dei parassitoidi ottenuti (Marchetti *et al.*, 2008), ma è comunque utile ai fini della flessibilità dell'allevamento, in quanto permette il mantenimento della colonia in momenti in cui l'ospite scarseggia.

La possibilità di conservare le uova potrebbe rendere l'allevamento del tachinide ancora più flessibile: consentirebbe infatti di costituire una riserva utile a far fronte a periodi di carenza di parassitoidi e/o ospiti e di disporre di un sovrannumero di parassitoidi in virtù di una eventuale necessità sperimentale. Si è perciò pensato di esporre le uova di *E. larvarum* a varie temperature (inferiori alla temperatura standard di 26°C) per alcuni giorni e controllarne la capacità di schiusa. Lo scopo finale sarebbe quello di utilizzare le uova conservate per l'allevamento *in vitro* del tachinide.

La temperatura, oltre a influenzare i vari processi vitali degli insetti, compresi gli entomofagi, è un fattore determinante per la conservabilità di stadi quiescenti, quali uova e pupe (Campadelli, 1986) o, in qualche caso, anche degli adulti (De Clercq e Degheele, 1993; Burgio e Nicoli, 1994). Esiste al riguardo una letteratura abbastanza vasta, di cui qui viene citato qualche esempio.

2.2 Conservazione degli insetti a basse temperature

Si incontra un notevole differenza tra le specie di insetti e di acari nella capacità di sopravvivere a periodi di stoccaggio a basse temperature. Per questo motivo è impossibile fare una generalizzazione tassonomica rispetto alla tolleranza alle basse temperature, in base all'ordine, la famiglia o il genere. Diversi studi riportano una diminuzione dello sfarfallamento, del tasso riproduttivo e della durata della vita, in seguito ad un periodo di conservazione a basse temperature. Tuttavia, la dimensione degli effetti causati dallo stoccaggio a basse temperature è generalmente proporzionata alla durata del periodo stesso di stoccaggio. In studi in cui sono state saggiate una serie di temperature, è stata di solito individuata una temperatura di stoccaggio ottimale alla quale l'insetto subiva solo un leggero danno, in relazione a un certo periodo di tempo: normalmente tale temperatura veniva poi scelta come temperatura di riferimento per studi ulteriori. Per esempio, per il parassitoide imenottero *Telenomus remus* Nixon in uova di *Spodoptera litura* (Fabricius) 7 giorni di stoccaggio a 10°C si sono rivelati come ottimali, non essendo diminuito lo sfarfallamento degli adulti dell'entomofago, una volta ripristinate le condizioni di allevamento standard. Invece, uno stoccaggio a 5 o 15°C per 16 giorni ha portato ad una riduzione significativa dello sfarfallamento degli adulti (Gautam 1986).

In alcune situazioni sono stati conservati, a breve termine e basse temperature, predatori o parassitoidi adulti o in vari stadi di sviluppo. Per esempio, l'uovo e l'adulto di un predatore pentatomide, *Podisus* spp., possono essere stoccati a 9°C per 6 e 30 giorni rispettivamente, senza effetti negativi sulla sopravvivenza, la longevità o la capacità riproduttiva (De Clercq & Degheele 1993). Gli embrioni di un giorno sono considerati estremamente sensibili al freddo; per quanto riguarda invece la sensibilità al freddo degli adulti, c'è una notevole differenza tra le specie, *P. maculiventris* può essere conservato per più di 2 mesi senza effetti negativi, mentre il limite per *P. sagitta* è di un mese. Shi *et al.* (1993) hanno anche osservato una differenza nella conservazione a basse temperature, in

alcuni ceppi geografici di *Trichogramma dendrolimi*: quelli provenienti dal nord della Cina tolleravano meglio il freddo dei ceppi isolati nel sud della regione.

La produzione massale, la spedizione e il rilascio di insetti sterili, all'interno di un programma di lotta integrata o di tecnica dell'insetto sterile presentano spesso enormi problemi logistici. Nel 1991, all'interno di un programma di eradicazione di *Cochliomyia hominivorax* in Libia, utilizzando insetti prodotti in maniera massale in Messico, fu necessario che lo sfarfallamento degli adulti sterili fosse sincronizzato e furono per questo utilizzate con successo temperature di 10, 20 e 26° C, affinché 4 gruppi di 10 milioni di insetti, ciascuno fossero rilasciati ogni settimana per un periodo di 6 mesi (Lindquist *et al.*, 1992). Pupari di 5 giorni di *Chrysomya bezziana* sono stati stoccati a 8-10°C durante la notte, per ottenere due ovideposizioni ogni settimana per il mantenimento della colonia di insetti (Spradbery, 1990). È stato poi verificato che interrompere lo stato quiescente di *Musca domestica*, *Phaenicia sericata* e *Lucilia cuprina* ponendo i pupari a 25-28°C per periodi intermittenti, aumenta la capacità di questi insetti di sopravvivere ad uno stoccaggio a 10°C (Leopold *et al.*, 1998).

Più specificamente per quanto riguarda i parassitoidi, di recente Ayvaz *et al.* (2008) hanno verificato che pupe di *Trichogramma evanescens* (Westwood) possono essere conservate a +4°C fino a 3 settimane, senza che l'entomofago subisca un significativo calo qualitativo. Per quanto riguarda i tachinidi, Campadelli (1982) ha constatato che le uova microtipiche di *Pseudogonia rufifrons* Wiedemann (che vengono rilasciate dalle femmine sul pabulum dell'ospite) rimanevano vitali alla temperatura di +4°C per circa 60 giorni. Questo consentiva di mantenere una scorta di uova valide, pronte a essere utilizzate in ogni evenienza. Finora, invece, non era mai stato effettuato uno studio di questo tipo con uova di parassitoide a ovideposizione diretta (cioè che depongono sul o nel corpo dell'ospite, cfr. Mellini, 1976). Tale studio si giustifica nel caso di *E. larvarum* grazie alla possibilità di recuperare le sue uova ponendole su dieta artificiale.

2.3 Materiali e Metodi

Le uova utilizzate nella prova sono state prelevate dal corpo di larve di *G. mellonella*, previamente superparassitizzate. Si è proceduto esponendo 8-10 larve mature del lepidottero a 30-35 femmine di *E. larvarum* all'interno della gabbia. Trascorso un periodo di tempo sufficiente (circa 30 minuti) le larve, cariche di uova del tachinide, sono state rimosse dalla gabbia e poste in soluzione d'alcol al 70%, con il fine di disinfettare le uova; in seguito, tutte le larve sono state risciacquate in acqua distillata e fissate con spilli entomologici ad un fondo di paraffina. Con una spatola di metallo, precedentemente sterilizzata in alcol, sono state staccate e prelevate le uova, che sono quindi state poste una ad una in capsule Petri (2,5 cm Ø), contenenti 2,5 ml di gel agar. La procedura di distacco delle uova qui descritta è analoga a quella utilizzata di solito nell'allevamento *in vitro* standard del tachinide.

Sono stati così preparati 4 campioni di 20 Petri ciascuno (con 1 uovo/Petri) e ognuno è stato incubato ad una temperatura sperimentale differente: 5, 10, 15 e 20°C. Le temperature sono state scelte sulla base dei dati riportati da Hafez (1953c), secondo cui *E. larvarum*, pur a ritmi molto rallentati, riusciva a completare il suo sviluppo nell'ospite *P. litura* anche a 13,4 °C. Sono quindi state selezionate due temperature sotto e due temperature sopra tale valore. Si è anche tenuto conto del fatto che, in particolare nel caso degli entomofagi, lo stoccaggio a bassa temperatura viene di solito effettuato (indipendentemente dallo stadio interessato) tra +4°C e +15°C (van Lenteren e Tommasini, 2003)

Un campione di controllo di 160 uova è stato mantenuto alla temperatura di allevamento standard di 26°C per l'intera durata della prova.

Tutti i campioni sono stati mantenuti nelle condizioni di umidità relativa (60-70%) e di fotoperiodo (0:24) abitualmente utilizzate nelle condizioni di allevamento *in vitro* standard di *E. larvarum*.

Ogni giorno, fino al 5° giorno, 4 Petri di ogni campione venivano prelevate dagli incubatori con temperature sperimentali e poste alla temperatura di controllo.

Ogni 24 ore veniva controllata la schiusa delle uova del campione di controllo e di tutte le uova che dalle temperature sperimentali erano state spostate alla temperatura di 26°C. Per ogni temperatura sperimentale (5°C, 10°C, 15°C, 20°C) a ogni intervallo temporale di conservazione (1, 2, 3, 4, 5 giorni) sono state saggiate 16 uova.

	5°C	10°C	15°C	20°C
1	16	16	16	16
2	16	16	16	16
3	16	16	16	16
4	16	16	16	16
5	16	16	16	16

I risultati sono stati valutati come segue:

a) per ogni temperatura di conservazione, sono stati calcolati il numero totale di uova schiuse dopo che le uova stesse erano state riportate alla temperatura standard di 26°C e la relativa percentuale di schiusa, indipendentemente dalla durata dello stoccaggio; la percentuale di schiusa è stata calcolata sul numero totale di uova stoccate (= 80 per ogni singola temperatura di conservazione); analogo calcolo è stato effettuato per le uova testimoni (n=160), mantenute costantemente a 26°C.

b) per ogni temperatura di conservazione e per il testimone, sono stati calcolati il numero totale di uova schiuse e la relativa percentuale di schiusa dopo 1, 2, 3, 4, 5 giorni di stoccaggio. Tali dati sono stati comparati tra loro e con i dati relativi alle uova testimoni.

I dati sono stati analizzati utilizzando tabelle di contingenza 5x2. Quando è stata riscontrata una differenza significativa, i dati sono stati ulteriormente analizzati con singole tabelle di contingenza 2x2. Nel caso di piccoli campioni (<50) è stata applicata la correzione di Yates.

2.4 Risultati

a) Indipendentemente dalla durata dello stoccaggio, la capacità di schiusa delle uova è stata significativamente influenzata dalla temperatura di conservazione (Tabella 2.1). Le uova conservate a 10°C e, ancor più, a 5°C, hanno avuto una capacità di schiusa significativamente (e notevolmente) inferiore rispetto alle uova conservate a 15°C e a 20°C, nonché rispetto alle uova testimoni; la capacità di schiusa delle uova conservate a 15°C e a 20°C è stata pari, in entrambi i casi, al 78% circa e non è stata significativamente diversa rispetto al testimone (Tabella 2.2)

Temperatura	Uova schiuse	Uova non schiuse	χ^2
5° C	23	57	88,296 P<0,05
10° C	38	42	
15° C	63	17	
20° C	63	17	
26°C (testimone)	129	31	

Tabella 2.1 - Tabella di contingenza 5x2 per verificare l'indipendenza della temperatura di conservazione e del numero di uova schiuse del parassitoide *Exorista larvarum*. I dati relativi ai vari periodi di stoccaggio (da 1 a 5 giorni) sono stati considerati globalmente [valore critico di $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Table 2.1 - The 5 by 2 contingency table for testing the independence of storage temperature and number of hatched eggs of the parasitoid *Exorista larvarum*. The data referred to all the storage periods (from 1 to 5 days) are pooled [critical value of $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Temperatura (°C)	5	10	15	20	26(testimoni)
5		P<0,05* $\chi^2 = 5,9$	P<0,05* $\chi^2 = 40,2$	P<0,05* $\chi^2=40,2$	P<0,05* $\chi^2 = 61,8$
10			P<0,05* $\chi^2 = 16,8$	P<0,05* $\chi^2 = 6,8$	P<0,05* $\chi^2 = 27,7$
15				P>0,05 $\chi^2 = 0$	P>0,05 $\chi^2 = 0,12$
20					P>0,05 $\chi^2 = 0,12$
% uova schiuse	28,8a	47,5b	78,8c	78,8c	80,6c

Tabella 2.2 - Percentuali di schiusa delle uova di *Exorista larvarum* conservate alle varie temperature e delle uova testimoni (lasciate sempre alla temperatura standard di 26°C). I dati relativi ai vari periodi di stoccaggio (da 1 a 5 giorni) sono stati considerati globalmente. Valore di P e di χ^2 nelle rispettive tabelle di contingenza 2x2. Nell'ambito della stessa riga, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono, tra loro, significativamente diversi.

Table 2.2 - *Exorista larvarum* eggs stored at different temperatures and control eggs (maintained at the standard temperature of 26°C): percentages of hatching. The data referred to all the storage periods (from 1 to 5 days) were pooled. P and χ^2 values in the relevant 2 by 2 contingency tables are presented. Within the same row, the values followed by the same letter are not significantly different.

b) La temperatura non ha avuto significativi effetti sulla vitalità (e la conseguente capacità di schiusa) delle uova dopo 1 o 2 giorni di conservazione, anche se, dopo 2 giorni, le percentuali di uova schiuse relative ai 5°C e ai 10°C sono state più basse rispetto alle percentuali relative ai 15°C e ai 20°C e alle uova testimoni (Tabelle 2.3 e 2.4). Dopo 3, 4 e 5 giorni di conservazione, la temperatura di stoccaggio ha invece avuto effetti significativi (Tabelle 2.5, 2.7 e 2.9). Più in dettaglio, relativamente ai 3 giorni di stoccaggio, le uova poste a 5°C hanno avuto una capacità di schiusa significativamente inferiore rispetto alle uova poste alle altre temperature e alle uova testimoni (Tabella 2.6).

La percentuale di schiusa delle uova stoccate a 5°C per 4 giorni è stata, un po' inaspettatamente, più elevata rispetto alla schiusa delle uova stoccate alla stessa temperatura per 3 giorni; tale percentuale (25%) non è stata significativamente diversa rispetto a quella relativa alle uova stoccate a 10°C; entrambe le percentuali sono state significativamente inferiori rispetto a quelle relative alle uova stoccate a 15°C, a 20°C e alle uova testimoni (Tabella 2.8). Dopo 5 giorni di stoccaggio, le uova conservate a 5°C e 10°C hanno manifestato una capacità di schiusa bassa, significativamente inferiore rispetto alle uova stoccate a 15°C, a 20°C e alle uova testimoni (Tabella 2.10). È da segnalare che non c'è stata differenza significativa tra le percentuali di schiusa delle uova conservate a 15°C e 20°C e delle uova testimoni.

Temperatura	Uova schiuse	Uova non schiuse	% uova schiuse	χ^2
5° C	12	4	75	8,96 P>0,05
10° C	11	5	68,8	
15° C	13	3	81,3	
20° C	13	3	81,3	
26° C (testimone)	129	31	80,6	

Tabella 2.3 - Tabella di contingenza 5x2 per verificare l'indipendenza della temperatura di conservazione e del numero di uova schiuse del parassitoide *Exorista larvarum* dopo 1 giorno di stoccaggio [valore critico di $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Table 2.3 - The 5 by 2 contingency table for testing the independence of storage temperature and number of hatched eggs of the parasitoid *Exorista larvarum* after 1 day of storage [critical value of $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Temperatura	Uova schiuse	Uova non schiuse	% uova schiuse	χ^2
5° C	5	11	31,2	8,95 P>0,05
10° C	8	8	50	
15° C	11	5	68,8	
20° C	11	5	68,8	
26° C (testimone)	129	31	80,6	

Tabella 2.4 - Tabella di contingenza 5x2 per verificare l'indipendenza della temperatura di conservazione e del numero di uova schiuse del parassitoide *Exorista larvarum* dopo 2 giorni di stoccaggio [valore critico di $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Table 2.4 - The 5 by 2 contingency table for testing the independence of storage temperature and number of hatched eggs of the parasitoid *Exorista larvarum* after 2 days of storage [critical value of $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Temperatura	Uova schiuse	Uova non schiuse	χ^2
5° C	1	15	58,24 P<0,05
10° C	9	7	
15° C	13	3	
20° C	14	2	
26° C (testimone)	129	31	

Tabella 2.5 - Tabella di contingenza 5x2 per verificare l'indipendenza della temperatura di conservazione e del numero di uova schiuse del parassitoide *Exorista larvarum* dopo 3 giorni di stoccaggio [valore critico di $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Table 2.5 - The 5 by 2 contingency table for testing the independence of storage temperature and number of hatched eggs of the parasitoid *Exorista larvarum* after 3 days of storage [critical value of $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Temperatura (°C)	5	10	15	20	26 (testimoni)
5		P<0,05* $\chi^2 = 7,13$	P<0,05* $\chi^2 = 15,37$	P<0,05* $\chi^2 = 18,07$	P<0,05* $\chi^2 = 37,91$
10			P>0,05 $\chi^2 = 1,31$	P>0,05 $\chi^2 = 2,47$	P>0,05 $\chi^2 = 3,77$
15				P>0,05 $\chi^2 = 0,001$	P>0,05 $\chi^2 = 0,07$
20					P>0,05 $\chi^2 = 0,11$
% uova schiuse	6,2a	56,2b	81,3b	87,5b	80,6b

Tabella 2.6 - Percentuali di schiusa delle uova di *Exorista larvarum* conservate alle varie temperature per 3 giorni e delle uova testimoni (lasciate sempre alla temperatura standard di 26°C). Valore di P e di χ^2 nelle rispettive tabelle di contingenza 2x2. E' stata applicata la correzione di Yates. Nell'ambito della stessa riga, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono, tra loro, significativamente diversi.

Table 2.6 - *Exorista larvarum* eggs stored at different temperatures for 3 days and control eggs (maintained at the standard temperature of 26°C): percentages of hatching. P and Yates corrected χ^2 values in the relevant 2 by 2 contingency tables. Within the same row, the values followed by the same letter are not significantly different.

Temperatura	Uova schiuse	Uova non schiuse	χ^2
5° C	4	12	33,6 P<0,05
10° C	7	9	
15° C	13	3	
20° C	13	3	
26° C (testimone)	129	31	

Tabella 2.7 - Tabella di contingenza 5x2 per verificare l'indipendenza della temperatura di conservazione e del numero di uova schiuse del parassitoide *Exorista larvarum* dopo 4 giorni di stoccaggio [valore critico di $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Table 2.7 - The 5 by 2 contingency table for testing the independence of storage temperature and number of hatched eggs of the parasitoid *Exorista larvarum* after 4 days of storage [critical value of $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Temperatura (°C)	5	10	15	20	26 (testimoni)
5		P>0,05 $\chi^2 = 0,55$	P<0,05* $\chi^2 = 8,03$	P<0,05* $\chi^2 = 8,03$	P<0,05* $\chi^2 = 21,46$
10			P<0,05* $\chi^2 = 4,8$	P<0,05* $\chi^2 = 4,8$	P<0,05* $\chi^2 = 9,26$
15				P>0,05 $\chi^2 = 0$	P>0,05 $\chi^2 = 0,07$
20					P>0,05 $\chi^2 = 0,07$
% uova schiuse	25a	43,8a	81,3b	81,3b	80,6b

Tabella 2.8 - Percentuali di schiusa delle uova di *Exorista larvarum* conservate alle varie temperature per 4 giorni e delle uova testimoni (lasciate sempre alla temperatura standard di 26°C). Valore di P e di χ^2 nelle rispettive tabelle di contingenza 2x2. E' stata applicata la correzione di Yates. Nell'ambito della stessa riga, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono, tra loro, significativamente diversi.

Table 2.8 - *Exorista larvarum* eggs stored at different temperatures for 4 days and control eggs (maintained at the standard temperature of 26°C): percentages of hatching. P and Yates corrected χ^2 values in the relevant 2 by 2 contingency tables. Within the same row, the values followed by the same letter are not significantly different.

Temperatura	Uova schiuse	Uova non schiuse	% Uova schiuse	χ^2
5° C	1	15	6,25 a	61,4 P<0,05
10° C	3	13	18,75 a	
15° C	13	3	81,25 b	
20° C	12	4	75 b	
26 C (controllo)	129	31	80,625 b	

Tabella 2.9 - Tabella di contingenza 5x2 per verificare l'indipendenza della temperatura di conservazione e del numero di uova schiuse del parassitoide *Exorista larvarum* dopo 5 giorni di stoccaggio [valore critico di $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Table 2.9 - The 5 by 2 contingency table for testing the independence of storage temperature and number of hatched eggs of the parasitoid *Exorista larvarum* after 5 days of storage [critical value of $\chi^2(0,05; 4) = 9.49$].

Temperatura(°C)	5	10	15	20	26 (testimoni)
5		P>0,05 $\chi^2=0,29$	P<0,05* $\chi^2=15,37$	P<0,05* $\chi^2=12,96$	P<0,05* $\chi^2=37,91$
10			P<0,05* $\chi^2=10,13$	P<0,05* $\chi^2=8,03$	P<0,05* $\chi^2=26,5$
15				P>0,05 $\chi^2=0,001$	P>0,05 $\chi^2=0,07$
20					P>0,05 $\chi^2=0,04$
% uova schiuse	6,3a	18,8a	81,3b	75 b	80,6b

Tabella 2.10 – Percentuali di schiusa delle uova di *Exorista larvarum* conservate alle varie temperature per 5 giorni e delle uova testimoni (lasciate sempre alla temperatura standard di 26°C). Valore di P e di χ^2 nelle rispettive tabelle di contingenza 2x2. E' stata applicata la correzione di Yates. Nell'ambito della stessa riga, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono, tra loro, significativamente diversi.

Table 2.10 - *Exorista larvarum* eggs stored at different temperatures for 5 days and control eggs (maintained at the standard temperature of 26°C): percentages of hatching.

P and Yates corrected χ^2 values in the relevant 2 by 2 contingency tables. Within the same row, the values followed by the same letter are not significantly different.

Il Grafico 2.1 riassume l'andamento delle percentuali di uova schiuse dopo 1, 2, 3, 4, 5 giorni di stoccaggio alle varie temperature. Si può notare come fino al primo giorno di conservazione, le quattro temperature mostrino un andamento simile, mantenendo una percentuale di schiusa intorno al 70%.

A partire dal secondo giorno in poi le percentuali di schiusa delle uova conservate a 5 e 10° C crollano drasticamente, fino al 10 – 20%, mentre le uova conservate a 15 e 20° C mantengono una percentuale di schiusa elevata, intorno al 70%.

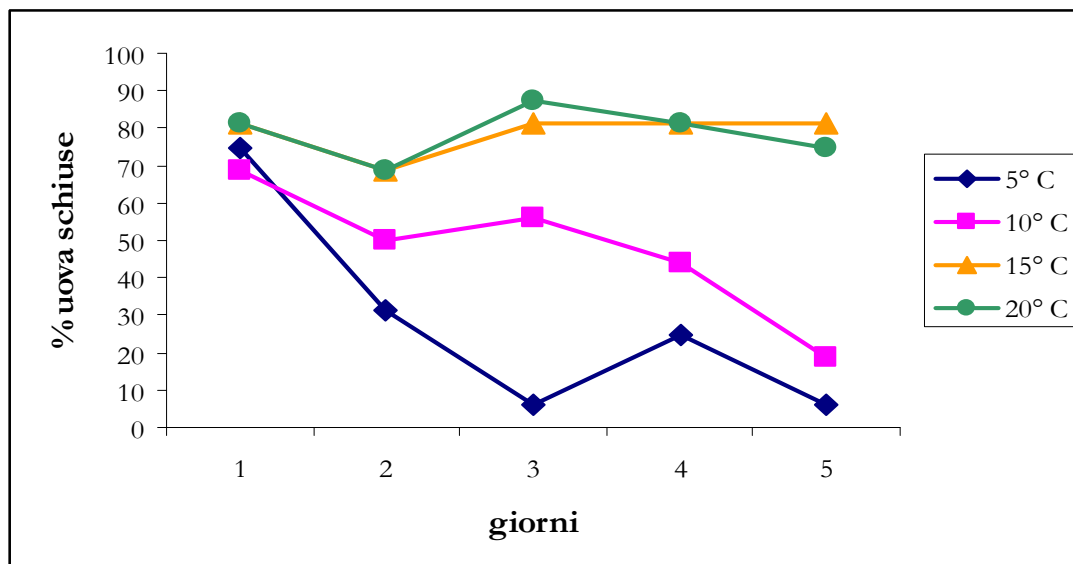


Grafico 2.1 - Effetto della temperatura e della durata di conservazione sulla vitalità delle uova del parassitoide *Exorista larvarum*: andamento della percentuale di schiusa dopo 1, 2, 3, 4, 5 giorni di stoccaggio a 5, 10, 15, 20°C.

Graphic 2.1 - Effect of storage temperature and duration on survival of eggs of the parasitoid *Exorista larvarum*: trend of the % hatching after 1, 2, 3, 4, 5 days at 5, 10, 15, 20°C.

Infine, va precisato che, come era prevedibile, nessun uovo conservato a basse temperature era schiuso al momento in cui è stato tolto dalle condizioni sperimentali per

essere posto alla temperatura standard di 26°C. Come già puntualizzato nella parte introduttiva, infatti, la schiusa delle uova mantenute costantemente a 26°C avviene 2-3 giorni dopo la deposizione. I tempi di schiusa, dopo che le uova erano state stoccate alle varie temperature, non sono stati valutati in questo lavoro e saranno oggetto di studi ulteriori.

2.5 Discussione dei risultati e conclusioni

La produzione massale di insetti entomofagi a fini commerciali richiede metodi e attrezzature adatte al loro stoccaggio, in modo da potere in ogni momento soddisfare le richieste della clientela (Van Lenteren e Tommasini, 2003). Anche nel caso di piccoli allevamenti, mantenuti a scopo di sperimentazione e ricerca, è fondamentale poter disporre di una riserva di individui, in modo da far fronte a problemi di discontinuità, che possono insorgere per cause diverse (malattie, cattivo funzionamento delle celle di allevamento, carenza di manodopera, ecc.) (Leopold, 2007). Va tenuto conto che la disponibilità di allevamenti efficienti è spesso alla base della buona riuscita di ricerche di carattere entomologico, anche se non sempre si dà a questo aspetto tutta l'importanza che merita (Cohen, 2001). Come già detto, le basse temperature rappresentano la forma di stoccaggio maggiormente impiegata, per gli insetti in generale e per gli entomofagi in particolare.

I risultati ottenuti nello studio qui effettuato aprono una nuova prospettiva per quanto riguarda lo stoccaggio dei parassitoidi, cioè la possibilità di conservare a basse temperature le loro uova per poi recuperarle ai fini della produzione dell'entomofago, ponendole su dieta artificiale. *E. larvarum* ben si prestava a una sperimentazione in questo filone essendo già, nel suo caso, disponibile una dieta artificiale idonea e di semplice preparazione (quella a base di latte scremato messa a punto da Mellini e Campadelli, 1995). I risultati conseguiti dimostrano che, una volta riportate alla temperatura standard di 26°C, le uova conservate a 15 e 20°C fino a 5 giorni hanno la stessa capacità di schiusa delle uova testimoni, mantenute costantemente a 26°C; le temperature di 5 e 10°C si

sono invece dimostrate totalmente inidonee allo stoccaggio anche per un brevissimo periodo: le percentuali di schiusa delle uova conservate a tali temperature, sono state infatti di gran lunga inferiori rispetto alle uova testimoni, anche dopo soli 2 giorni di stoccaggio. Va notato che entrambe le temperature inidonee erano inferiori a 13,4°C, il limite termico inferiore finora accertato, in corrispondenza di cui il parassitoide ha dimostrato di poter compiere il suo sviluppo completo, a ritmi molto rallentati (Hafez, 1953c).

Presso i laboratori di Entomologia del DiSTA sono già in corso ricerche volte a stabilire la capacità di accrescersi e svilupparsi *in vitro* delle larvette di *E. larvarum* sgusciate da uova conservate a 15°C per 5 giorni, in confronto a larvette sgusciate da uova testimoni (trasferite sulla dieta entro 2-3 ore dall'ovideposizione, come nella procedura standard). Uno dei parametri che vengono presi in considerazione è il tempo di schiusa delle uova (che non è stato misurato nella presente tesi). Qualora, non ci fosse differenza tra i tempi di schiusa delle uova testimoni e delle uova stoccate per 5 giorni a 15°C, si potrebbe dedurre che, alla bassa temperatura, lo sviluppo embrionale del tachinide si è arrestato, o è proseguito a livelli minimi. Viene inoltre posto a confronto l'andamento dello sviluppo su dieta artificiale delle larvette sgusciate da uova stoccate rispetto alle larvette testimoni, per verificare se il trattamento a bassa temperatura ha in qualche modo compromesso la vitalità dei parassitoidi. Analoghe ricerche potranno essere eseguite per le uova conservate a 20°C.

Lavori precedenti hanno accertato che gli adulti di *E. larvarum* ottenuti su dieta artificiale, pur ben formati, fertili e ugualmente longevi rispetto agli adulti ottenuti nell'ospite *G. mellonella*, sono da considerarsi di qualità globalmente inferiore rispetto a questi ultimi: infatti le femmine, in studi diversi, hanno deposto un minor numero di uova, sia su ospiti naturali, che di sostituzione; in prove di laboratorio (Dindo *et al.*, 2006) e semi-campo (Dindo *et al.*; 2002). A maggior ragione, oltre a considerare le rese in adulti, sarà necessario saggiare la qualità dei parassitoidi ottenuti sulla dieta artificiale partendo da uova stoccate a basse temperature. Comunque, come puntualizzato da Grenier e De Clercq (2003), per il controllo di qualità degli insetti allevati in cattività non ci sono criteri

assoluti: questi dipendono dagli obiettivi per cui essi sono stati prodotti: lo stoccaggio delle uova e, più in generale, l'allevamento su dieta artificiale sono di grande utilità come tecniche di supporto e potenziamento degli allevamenti massali, ma non possono certo essere considerati come pienamente alternativi alla produzione *in vivo* effettuata secondo procedure standard: pertanto, in quest'ottica, un leggero calo qualitativo dei parassitoidi ottenuti *in vitro* da uova stoccate a basse temperature, può essere, entro certi limiti, considerato accettabile.

La possibilità di stoccare le uova a basse temperature potrà estendersi, nel caso di *E. larvarum*, anche a uova deposte fuori dall'ospite, ampliando quindi le possibilità di mantenimento e potenziamento della colonia di parassitoidi.

In ricerche future sarà inoltre saggiata l'influenza dell'età delle uova sulla loro conservabilità a bassa temperatura, come del resto già effettuato per altri insetti entomofagi (Etzel e Legner, 1999) (nella presente tesi le prove sono state effettuate utilizzando solo uova neo-deposte).

In un tempo successivo si potrà anche provare a stoccare le uova del tachinide per periodi di tempo più lunghi e valutare se, come suggerito da Coudron (2007), sia anche il caso di cercare di migliorare la risposta alle basse temperature delle uova agendo sull'alimentazione delle femmine adulte.

CAPITOLO 3

3.1 Accettabilità di Lepidotteri Nottuidi da parte del parassitoide *Exorista larvarum* (L.)

L'accettabilità rappresenta la terza fase del processo di selezione dell'ospite da parte dei parassitoidi e, come le due precedenti (localizzazione dell'habitat dell'ospite e localizzazione dell'ospite) è condizionata da fattori in primo luogo chimici, ma anche tattili, visivi e sonori. Forma, colori, dimensioni e movimento dell'ospite possono pertanto essere determinanti anche per la sua accettabilità (Vinson, 1976). Riguardo agli stimoli chimici, che in moltissimi sistemi parassitoide-ospite hanno dimostrato di essere i più importanti ai fini dell'intero processo di selezione, essi sono stati suddivisi da Godfray (1994) in tre vaste categorie: a) segnali odorosi provenienti dall'habitat della vittima o dalla pianta di cui questa si nutre; b) segnali odorosi associati con l'attività dell'ospite nel suo ambiente (come, ad esempio, gli odori delle sue feci); c) semiochimici provenienti direttamente dall'ospite, che agiscono quindi da kairomoni. Questi ultimi sono ovviamente i segnali più attendibili, ma, di solito, possono essere percepiti dal parassitoide solo a distanza ravvicinata: sono pertanto quelli che condizionano maggiormente la fase di accettabilità. Come gli altri aspetti del parassitoidismo, anche questo è stato studiato, in larga misura per gli imenotteri: questi ultimi, in effetti, prevalgono per numero di specie e varietà di comportamenti, oltre a essere, a tutt'oggi, praticamente gli unici utilizzati nei programmi di lotta biologica e integrata; tuttavia i parassitoidi ditteri (rappresentati principalmente dai tachinidi), pur numericamente di gran lunga inferiori, presentano caratteristiche biologiche assai interessanti e che, nonostante gli immancabili fenomeni di convergenza, non possono essere omologate a quelle degli imenotteri. Le differenze tra le manifestazioni parassitarie di questi due gruppi sono state ampiamente discusse da Mellini (1976; 1994), a cui si rimanda per approfondimenti.

In generale le ricerche concernenti il processo di selezione dell'ospite nei tachinidi sono state, finora, abbastanza scarse, tanto che, come puntualizzato anche da Stireman *et al.* (2006), i meccanismi utilizzati da questi parassitoidi in tale processo non sono ancora del tutto noti. E' comunque accertato che anche i tachinidi usano un gran numero di segnali per localizzare l'ospite. Nel 1990 Mellini, nella sua sinossi dedicata a questi ditteri, nell'ampio capitolo dedicato alle modalità di parassitizzazione ha accennato anche ai meccanismi del processo di selezione (compresa l'accettabilità) con relativi stimoli.

Va enfatizzato che, in tutti i parassitoidi, la modalità di parassitizzazione dell'ospite (diretta o indiretta) condiziona notevolmente i fattori che inducono il processo di selezione dell'ospite e, in particolare, la fase di accettabilità. Contrariamente a quanto si verifica per gli imenotteri, nell'ambito dei tachinidi la parassitizzazione **indiretta** è abbastanza comune. Qualora la prole venga deposta nell'ambiente, per garantire la presa di possesso dell'ospite, il comportamento della femmina deve essere integrato con quello della larveta, la quale deve attendere il passaggio della vittima e attaccarla. La femmina non è dunque direttamente coinvolta né nella fase di localizzazione dell'ospite, né in quella di accettabilità, ma solo nella prima fase, quella di localizzazione dell'habitat dell'ospite. In generale, sembra che gli stimoli che inducono la deposizione delle uova o delle larvette siano essenzialmente di natura chimica e provengano, oltre che direttamente dalla vittima, dalle sue deiezioni, dai suoi secreti e dalle alterazioni apportate alla pianta ospite (Hsiao *et al.*, 1966; Roth *et al.*, 1978; Nettles e Burks, 1975). Praticamente nulla si sa invece circa gli stimoli specifici utilizzati dalle larvette del parassitoide per localizzare l'ospite (Feener e Brown, 1997).

Nei casi in cui la parassitizzazione indiretta avviene tramite la deposizione di uova microtipiche sul pabulum dell'ospite (come si verifica in quasi tutti i goniini), la femmina, pure non direttamente coinvolta nelle fasi di localizzazione e accettabilità, ritrova l'ambiente dell'ospite essenzialmente grazie a stimoli provenienti dalle piante, e in particolare dalle lesioni apportate alle piante; anche se i segnali di natura chimica hanno una notevole importanza, non sono da trascurare quelli di natura fisica (come la forma, il colore, lo spessore della foglia): ad esempio, Mellini *et al.* (1980) hanno dimostrato che

pur in assenza di stimoli chimici, *Pseudogonia rufifrons* (Wied.) è stimolata a ovideporre su zimbelli di cera liscia, sottili, di forma ovale, di colore giallo, di area compresa tra 2 e 7 cm².

Pur in misura meno accentuata che negli imenotteri, anche nei tachinidi prevalgono le specie a parassitizzazione **diretta**; a queste appartiene anche *Exorista larvarum*. Nei tachinidi a parassitizzazione diretta, la fase di accettabilità è condizionata, oltre che da stimoli chimici, anche da fattori fisici quali il colore, la forma e le dimensioni dell'ospite (Tanaka *et al.*, 1999), nonché dai movimenti dell'ospite stesso (Mellini, 1990). Questo si verifica indipendentemente dal fatto che la deposizione delle uova o delle larvette avvenga esternamente (come in *Exorista larvarum*) o internamente al corpo della vittima. Tuttavia, Burks e Nettles (1978), in riguardo a *Eucelatoria* sp., non hanno trovato differenze significative nelle percentuali di parassitizzazione tra larve di *Heliothis virescens* (F.) mobili e larve immobilizzate mediante trattamento con CO₂: secondo gli stessi autori determinanti sono invece gli stimoli olfattivi provenienti da semiochimici presenti nella cuticola delle larve ospiti. In seguito Nettles (1979), sempre in riguardo alla stessa coppia, scoprì che i segnali odorosi provenienti dalla pianta su cui l'ospite si evolve sono più efficaci di quelli emessi dall'ospite stesso; inoltre l'attrattività varia con la specie di pianta, col mutare delle condizioni ambientali e con le ore del giorno. Già molti anni prima Monteith (1956a), sperimentando su *Drino bohémica* Mesn., aveva dimostrato che, nelle operazioni di selezione dell'ospite, tale tachinide era molto sensibile a stimolazioni chimiche e tattili, derivate, ad un tempo, dall'ospite e dalla sua pianta; lo stesso Monteith (1956b) comprovò poi che, una volta che la femmina aveva localizzato l'ospite grazie alle stimolazioni odorose, il movimento assumeva un ruolo molto importante nell'indurre l'ovideposizione. Abbastanza di recente Stireman (2002) ha dimostrato che la fase di accettabilità del lepidottero arctiide *Grammia geneura* (Strecker) da parte del tachinide *Exorista mella* (Walker) è fortemente condizionata dai movimenti dell'ospite.

Più in generale Vinson (1976), con riguardo ai parassitoidi imenotteri, afferma che, in caso di parassitizzazione diretta, i segnali odorosi assumono un ruolo determinante in tutte le fasi del processo di selezione dell'ospite, mentre i movimenti sono importanti

soprattutto in fase di accettabilità in quanto stimolano l'ovideposizione da parte delle femmine. Diversi studi sperimentali, riportati dallo stesso Vinson (1976) confermano, per gli imenotteri questa ipotesi. Anche per i tachinidi, le poche ricerche svolte su questo aspetto sembrano avvalorarla. Oltre ai lavori più sopra citati, sono da ricordare, a questo proposito, le ricerche compiute da Weseloh (1980), per *Compsilura concinnata* (Meigen) e da Dippel e Hilker (1998) per *Drino inconspicua* Meigen.

Nei paragrafi seguenti vengono descritte le indagini effettuate sull'accettabilità (e l'idoneità) di due lepidotteri nottuidi di interesse agrario nei confronti di *E. larvarum*, allo scopo di valutare le potenzialità del tachinide come agente di controllo dei due fitofagi. Le prove qui illustrate proseguono un filone di ricerca già iniziato, volto, in generale, a verificare l'efficacia di *E. larvarum* verso specie bersaglio di interesse economico, sia forestale (Dindo *et al.*, 1999b; 2002) che agrario (Simoes *et al.*, 2004).

I due nottuidi considerati in questo studio sono uno di interesse italiano, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) e uno di interesse spagnolo *Pseudaletia (Mhytimna) unipuncta* (Haworth).

3.2 Accettabilità di *Spodoptera littoralis* (Boisduval)

Spodoptera littoralis (Boisduval) (comunemente nota come “Nottua mediterranea”) è un lepidottero nottuidi a prevalente distribuzione africana e sudmediterranea (www.faunaeur.org; www.eppo.org visitato il 10/12/2008). La specie è stata a lungo confusa con la congenerica *Spodoptera litura* (Fabricius); entrambe sono state, nel tempo attribuite a generi diversi (come *Prodenia* e *Laphygma*) (Mochida, 1973). Più precisamente, Balachowsky (1972) riporta che le due specie, *litura* e *littoralis*, sono state confuse fino al 1963 e che è possibile distinguerle l'una dall'altra procedendo allo studio dell'armatura genitale.

E' comunque ora accertato che le due specie sono distinte e allopatriche; quella presente nelle regioni dell'EPPO e, in particolare, nell'area mediterranea, è *S. littoralis*, mentre *S.*

litura è praticamente assente nelle regioni dell'EPPO ed è distribuita prevalentemente in Asia e Oceania,

(http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Spodoptera_litura/PRODLI_ds.pdf, visitato il 10/12/2008).

Dato il potenziale danno fitosanitario conseguente a una sua possibile introduzione, *S. litura* è stata inserita nella lista A1 dell'EPPO.

A questo punto si rende necessaria una precisazione. Come già illustrato in altri paragrafi della tesi (1.1) la biologia di *E. larvarum* è stata approfonditamente studiata in Egitto da Hafez (1953 a,b,c) su *Prodenia* (= *Spodoptera*) *litura* (Fabricius). Alla luce delle scoperte successive (circa l'assenza di *S. litura* dall'area mediterranea) è assai verosimile, se non certo, che la biologia del tachinide sia stata studiata, in realtà, su *S. littoralis* (Pradolesì *et al.*, 2005). Del resto, lo stesso Hafez, nel 1976, annovera *S. littoralis* (non *S. litura*), tra i fitofagi più dannosi al cotone in Egitto e cita *E. larvarum* tra i suoi principali parassitoidi (Hafez *et al.*, 1976a).

S. littoralis, fino a pochi decenni fa era segnalata per danni nella nostra penisola solo in Sicilia, nelle altre regioni era presente saltuariamente, a parte alcuni attacchi in serra in Italia settentrionale. Dall'inizio degli anni '90 la specie si è resa responsabile di gravi danni alle più svariate colture (sia in serra che in pieno campo) anche in altre regioni centro-meridionali della penisola (Sannino e Espinosa, 1999). Si nutre di piante erbacee ed è estremamente polifaga. Pollini (1998) riporta che questa specie vive su oltre un centinaio di piante, appartenenti ad una cinquantina di famiglie. In Egitto è comunissima sul cotone (da cui prende origine il nome volgare inglese "cotton leaf worm"), ma attacca anche il trifoglio alessandrino, il mais e l'erba medica. Il nottuidè attacca anche svariate piante ortive (carciofo, cavolo, lattuga, fagiolino, melanzana, peperone ecc.), la fragola e alcune piante ornamentali. Dato l'ampio spettro alimentare (che comprende centinaia di piante) *S. littoralis* può arrecare danno praticamente a tutte le colture ortive. L'elevata polifagia rende la specie particolarmente difficile da combattere poiché, pur sconfitta in una piantagione, essa sopravvive nei campi vicini su altre colture (Sannino *et al.*, 2006). La specie è inserita nella lista A2 dell'EPPO.

Per quanto riguarda la biologia di *S. littoralis*, in base a quanto riportato sul sito dell'EPPO

(http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Spodoptera_litura/PRODLI_ds.pdf visitato il 10/12/2008) le femmine possono arrivare a deporre da 1000 a 2000 uova in ooplacche di 100-300 ciascuna. Questo si verifica a una temperatura di 30°C e a umidità relativa elevata (90%), mentre a temperatura di 35°C e in condizioni di scarsa umidità relativa (30%), il numero di uova/femmina si abbassa a 150 (Pollini, 1998). Le ooplacche sono ricoperte da un feltro di peli provenienti dagli ultimi uriti della femmina. A una temperatura di 25-26°C, le uova schiudono dopo circa 4 giorni; lo sviluppo larvale ha una durata variabile da 15 a 23 giorni e si compie attraverso sei età. Le giovani larve (dalla I alla III età) si nutrono in gruppo, sulla pagina inferiore delle foglie delle piante ospiti, lasciando la pagina superiore intatta. Successivamente le larve si disperdono, trascorrono i giorni nel terreno e si nutrono di notte o la mattina presto, a spese delle intere foglie e poi anche degli steli. L'incrisalidamento avviene nel suolo, in una cella terrosa a pochi cm di profondità. Le crisalidi sono anoiche. Lo stato di crisalide dura, a 25-26°C, 11-13 giorni, dopodiché sfarfallano gli adulti. L'intero ciclo di sviluppo si compie quindi, a 25-26°C, in 4-5 settimane. Gli adulti possono sopravvivere 4-10 giorni. Il numero di generazioni è molto influenzato dalle condizioni ambientali: in Sicilia, in coltura protetta, *S. littoralis* può arrivare a compiere 7-9 generazioni per anno (Pollini, 1998). I dati qui riportati sul ciclo biologico sono stati confermati dalle osservazioni effettuate nel nostro allevamento massale.

3.3 Materiali e Metodi

Le prove sono state svolte presso i laboratori del DiSTA, Università di Bologna.

3.3.1 Allevamento di *S. littoralis*

La colonia è stata avviata a partire da ooplacche deposte da individui prelevati da Lanzoni *et al.* in campi sperimentali di spinacio, presso Latina nella primavera 2006.

Come pianta nutrice è stato scelto il fagiolo *Phaseolus vulgaris* var. “borlotto lingua di fuoco”, data la relativa facilità di coltivazione in cella climatizzata ed il rapido ciclo di sviluppo (circa 15 giorni dopo la semina, a 20°C si ottengono piante idonee all'alimentazione delle larve).

L'allevamento è stato mantenuto in cella climatizzata a 25°±1°C, con umidità relativa 65 ± 5% e fotoperiodo 16 L: 8 D (El Guindy *et al.* 1978). Le foglie con le ooplacche venivano prelevate dalla gabbia degli adulti e sistemate su piante di fagiolo all'interno di gabbie di plexiglas di dimensioni 60x35x50 cm, con prese d'aria in rete di ottone. Ogni gabbia conteneva contemporaneamente fino a due vasi rettangolari (delle dimensioni di 45x15x15 cm) contenenti complessivamente circa 40 piantine di fagiolo dell'altezza di 25 cm circa, su cui le larve neosgusciate si alimentavano. Quando le larve avevano consumato tutte le piante, il vaso veniva sostituito con uno contenente nuove piante. Raggiunta la maturità, le larve smettevano di nutrirsi e scendevano nel terriccio; qui scavavano fino a portarsi alla profondità di circa 2 cm, dove, in una celletta, si incrisalidavano. Dopo lo sfarfallamento, che, alle condizioni sopra indicate, avveniva a circa 30-35 giorni dalla schiusa delle uova (quindi in linea con quanto riportato in letteratura), gli individui adulti venivano prelevati dalle gabbie in plexiglas e posti in gabbie di rete metallica delle dimensioni di 25x30x40 cm.

Gli adulti venivano nutriti con batuffoli di cotone imbevuti di una soluzione di acqua e miele al 20% (Bebas *et al.*, 2001), rinnovata a giorni alterni; veniva inoltre spruzzata acqua di fonte sulle pareti della gabbia, quotidianamente.

Come substrato di ovideposizione venivano utilizzate piante di fagiolo dell'altezza di circa 10 cm, che venivano poste all'interno della gabbia.

3.3.2 Impostazione delle prove

Per la prova finalizzata a verificare l'accettabilità e l'idoneità di *S. littoralis* da parte di *E. larvarum*, sono state prelevate dall'allevamento 80 larve di IV-V età di dimensioni uniformi. Ognuna è stata isolata all'interno di cilindri di plexiglas di dimensioni 10cm x 10cm Ø; quotidianamente sono state fornite alle larve foglie di fagiolo fresche come

alimento. Ogni giorno è stata controllata l'eventuale muta larvale, che veniva verificata tramite l'individuazione della capsula cefalica all'interno del cilindro. Ogni volta che veniva rilevata la muta di una larva, quest'ultima veniva posta nella gabbia di *E. larvarum* per la parassitizzazione, in modo tale da evitare che le uova del parassitoide venissero eliminate insieme all'esuvia durante la muta (questo fenomeno, in generale, è la causa della perdita di molte uova del tachinide, come evidenziato da Mellini e Campadelli, 1996).

Le larve sono state poste all'interno di una gabbia di allevamento contenente circa 30-35 coppie di *E. larvarum*, sfarfallate da 5-7 giorni; sono state esposte alle femmine fino alla deposizione di un numero variabile di uova da 4 a 6 / larva (Dindo *et al.* 1999): si è proceduto alla rilevazione del tempo necessario. Dopo la deposizione, la larva veniva rimossa dalla gabbia di *E. larvarum*, e rimessa nel suo cilindro. I cilindri venivano posti in cella climatizzata a $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, con umidità relativa $65 \pm 5\%$ e fotoperiodo 16 L: 8 D. Ogni giorno venivano fornite foglie di fagiolo fresche e veniva effettuato il controllo delle larve che erano state esposte al parassitoide, per verificare eventuale morte, muta, incrisalidamento o presenza di pupari.

Contemporaneamente è stata condotta la stessa prova alle stesse condizioni, su 80 larve di *G. mellonella* mantenute come testimoni e prelevate dall'allevamento continuo presente presso il DiSTA.

3.3.3 Rilievo dei dati e analisi statistica

Il rilievo dei dati è stato finalizzato al calcolo dei seguenti parametri:

- 1) Tempo necessario per la deposizione delle uova (4-6) di *E. larvarum* su ogni singola larva di *S. littoralis* e *G. mellonella*. Ai fini dell'analisi statistica, ogni larva è stata considerata come una ripetizione. Il numero di ripetizioni, per ciascuna tesi, è stato dunque pari a 80. L'analisi statistica è stata effettuata mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis.
- 2) Per ognuna delle due specie, numero di individui morti prima di arrivare allo stato adulto, con relativa percentuale di mortalità ($= \text{n. individui morti} / \text{n. iniziale larve} \times$

100 e numero di adulti sfarfallati, con relativa percentuale di sfarfallamento ($= \frac{n. \text{ adulti sfarfallati}}{n. \text{ iniziale larve}} \times 100$). L'analisi statistica è stata effettuata mediante tabella di contingenza 2x2.

3) Per ognuna delle due specie, numero delle larve parassitizzate con successo (cioè che hanno prodotto pupari). Dato che, come verrà esposto nei risultati, una sola larva di *S. littoralis* ha prodotto pupari mentre tutte le larve di *G. mellonella* morte hanno prodotto pupari, non è stato necessario effettuare il calcolo delle percentuali, né l'analisi statistica. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il programma STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., 2001)

3.4 Risultati

Il tempo necessario per la deposizione di 4-6 uova su ogni singola larva è risultato pari a $\min 5,23 \pm 3,8$ (d.s.) per *S. littoralis* e a $\min 4,08 \pm 2,7$ (d.s.) per *G. mellonella*. Le femmine di *E. larvarum* hanno dunque impiegato un tempo superiore per ovideporre su *S. littoralis* piuttosto che su *G. mellonella*. La differenza, comunque, non è risultata (anche se per poco) significativa (N= 160; H = 3,5; P= 0,0614). Ulteriori approfondimenti sul comportamento e sulla reazione delle larve all'ovideposizione di *E. larvarum* vengono descritti in un capitolo a parte (Capitolo 5)

Nel caso di *S. littoralis* solo una delle larve morte ha prodotto pupari (uno solo) di *E. larvarum*, mentre il 100% delle larve di *G. mellonella* morte è stato parassitizzato con successo dal tachinide, avendo prodotto uno o più pupari.

I risultati relativi alla mortalità totale (dovuta cioè a ogni possibile causa) delle due specie ospiti in seguito a parassitizzazione sono illustrati in tabella 3.1. Come si può notare la differenza di mortalità tra le due specie è altamente significativa, nel senso che la mortalità in *S. littoralis* è stata significativamente minore rispetto a *G. mellonella*.

Specie ospite	Morti (=individui in cui si sono formati pupari + individui morti per altre cause)		Vivi (= adulti sfarfallati)		χ^2	P
	N.	%	N.	%		
<i>Spodoptera littoralis</i>	36	45%	44	55%	13,78	P<0,001
<i>Galleria mellonella</i>	60	75%	20	25%		

Tabella 3.1 -Tabella di contingenza 2x2 per valutare l'indipendenza della specie ospite (*S. littoralis* o *G. mellonella*) e della mortalità in seguito a parassitizzazione da parte di *Exorista larvarum*. E' stata applicata la correzione di Yates per piccoli campioni (<100)

Table 3.1 - The 2x2 contingency table for testing the independence of lepidopterous host species and host mortality following parasitization by *E. larvarum*. Yates corrected chi-square value is presented (sample size < 100)

3.5 Accettabilità di *Pseudaletia unipuncta* (Haworth)

Pseudaletia unipuncta (Haworth) è un lepidottero nottuide cosmopolita originario dell'America del Nord. È molto comune nelle regioni umide delle zone tropicali, subtropicali e temperate. In Europa è una specie migratoria (Balachowsky, 1972). ed è piuttosto diffusa (www.faunaeur.org), ma i danni prodotti alle piante sono stati quasi inesistenti fino al 1950, anno in cui furono descritti forti attacchi nel sud della Francia (Balachowsky, 1972).

Il nome volgare dell'insetto in inglese è "armyworm" ed è anche conosciuto con il nome di *Mythimna unipuncta*.

Le larve si nutrono principalmente di piante della famiglia delle graminacee, soprattutto mais, ma anche riso, avena, grano, sorgo, segale, orzo, canna da zucchero (Capinera, 2006). Possono inoltre attaccare piante ortive come fava, pisello, lattuga, colza, cipolla, peperone, cetriolo, sedano, carciofo, fagiolo, carota e patata dolce (Bonnemaison, 1964). Possono consumare praticamente tutte le parti verdi della pianta e sono particolarmente voraci a partire dalla terza età larvale.

Spesso questo nottuide compare con attacchi esplosivi, di forti popolazioni, che si sviluppano inizialmente su piante spontanee e infestanti presenti alla periferia delle coltivazioni, per poi trasferirsi in massa sulle piante coltivate.

La specie è ottima volatrice, in grado di compiere lunghe migrazioni. La femmina depone fino a 1500 uova, in gruppi di 100-150 unità. La schiusa può avvenire dopo 4 giorni circa in estate e dopo 8-10 giorni in primavera, in funzione delle condizioni

climatiche. Inizialmente, le larvette erodono solo una pagina fogliare, successivamente divorano porzioni fogliari partendo dal margine penetrano nelle spighe e danneggiano le cariossidi in fase di maturazione. La larva passa attraverso 5-9 stadi, dopodiché si interra a qualche centimetro di profondità e si incrisalida. Lo stadio di crisalide ha una durata variabile di 7-14 giorni in estate, ma può arrivare fino a 40 giorni a seconda del clima (Balachowsky, 1972). Sia in Italia che in Spagna la specie è in grado di completare 3-4 generazioni all'anno, in particolare in Catalogna presenta 4 generazioni (Lopez *et al.*, 2000). Lo svernamento avviene allo stadio di larva giovane o matura, nel terreno. La durata del ciclo completo da uovo ad adulto copre un intervallo di 30-40 giorni (Pollini, 1998).

3.6 Materiali e Metodi

Le prove sono state interamente svolte presso i laboratori IRTA (Institut de recerca i tecnologia agroalimentàries) di Lleida (Spagna) nel periodo compreso tra ottobre 2007 e giugno 2008.

3.6.1 Allevamento di *P. unipuncta*

La colonia di *P. unipuncta* è stata avviata a partire da individui adulti catturati con trappole luminose nei campi sperimentali dell'Università di Lleida.

L'allevamento è stato mantenuto in cella climatizzata a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C, UR = 70%, fotoperiodo 16 L : 8 D.

Gli adulti sono stati collocati in gabbie di plexiglass di dimensioni 60x50x60 cm, con prese d'aria in garza, e sono stati nutriti con una soluzione di acqua e saccarosio al 5%, posta in abbeveratoi in plastica di forma cilindrica (h. 3 cm, Ø 5 cm) con un foro sul tappo in cui era stato collocato un batuffolo di cotone. Come substrato di ovideposizione sono state inoltre poste 2-3 piante di mais all'interno della gabbia, di altezza pari a 40-50 cm. Tali piante venivano coltivate nella serra sperimentale dell'IRTA.

Le larve neosgusciate venivano prelevate dalla gabbia degli adulti con un pennello e, per evitare cannibalismo, venivano poste una ad una in cilindri di dimensioni h. 3 cm x Ø 5 cm, contenenti un cubetto di 1x1x1 cm di dieta artificiale. La dieta veniva fornita alle larve ogni 2 giorni.

Una volta raggiunta la maturità, le larve si incrisalidavano nei cilindri e da qui venivano prelevate e spostate nella gabbia degli adulti in attesa dello sfarfallamento.

La dieta era basata su quella per nottuidi messa a punto da Shorey & Hale (1965), e conteneva:

- 600 ml acqua
- 12 g agar
- 100 g fagioli cannellini secchi
- 30 g lievito di birra
- 3 g acido ascorbico
- 1 g acido sorbico
- 2 g Methil-4-idrossibenzoato
- 2 ml formaldeide

Prima di procedere alla preparazione della dieta, i fagioli venivano posti in acqua per 24 ore circa, dopodiché venivano triturati con un mixer elettrico.

Per la preparazione della dieta veniva portata ad ebollizione l'acqua con l'agar e la sospensione così composta veniva fatta bollire per 10 minuti circa. Quando la temperatura della sospensione scendeva a 60° C circa, potevano essere aggiunti gli altri ingredienti, con l'ordine in cui sono stati elencati. Gli ingredienti venivano mescolati con un mixer elettrico, fino ad ottenere un composto omogeneo e senza grumi. La dieta a questo punto veniva versata in scatole Petri in vetro (25 cm Ø) formando un strato alto circa 1 cm e una volta raffreddata era conservata in frigorifero a 4-5°C.

3.6.2 Impostazione delle prove

E' stata effettuata una prova finalizzata a verificare l'accettabilità e l'idoneità di *P. unipuncta* da parte di *E. larvarum*.

Per la prova sono state isolate dall'allevamento 40 larve di IV o V età di *P. unipuncta*, che erano state nutrite con dieta artificiale e 40 larve di IV o V età che erano state nutrite con foglie di mais. Tutte le larve sono state poste all'interno di una gabbia di allevamento contenente circa 30-35 coppie di *E. larvarum*, sfarfallate da 5-7 giorni e sono state esposte alle femmine fino alla deposizione di un numero variabile di uova da 4 a 6 / larva (Dindo *et al.* 1999). Dopo la deposizione, ciascuna larva veniva rimossa dalla gabbia di *E. larvarum* e rimessa nel suo cilindro. I cilindri venivano mantenuti in cella climatizzata a $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, con umidità relativa $65 \pm 5\%$ e fotoperiodo 16 L : 8 D. Ogni giorno veniva effettuato il controllo delle larve che erano state esposte al parassitoide, per verificare eventuale morte, muta, incrisalidamento o presenza di pupari e veniva fornito alimento fresco. Altre 40 larve di IV o V età sono state isolate, nutrite sia con dieta che con foglie di mais e mantenute alle stesse condizioni climatiche, come testimone di controllo.

3.6.3 Rilievo dei dati e analisi statistica

Il rilievo dei dati è stato finalizzato al calcolo dei seguenti parametri:

1. Numero di individui morti prima di arrivare allo stato adulto, con relativa percentuale di mortalità ($= \text{n. individui morti} / \text{n. iniziale larve} \times 100$) e numero di adulti sfarfallati, con relativa percentuale di sfarfallamento ($= \text{n. adulti sfarfallati} / \text{n. iniziale larve} \times 100$)
2. Numero delle larve parassitizzate con successo (cioè che hanno prodotto pupari) e relativa percentuale ($= \text{n. larve che hanno prodotto pupari} / \text{n. complessivo larve morte} \times 100$)
3. Numero pupari sfarfallati. Dato l'esiguo numero, non è stata calcolata la percentuale.

Per i parametri indicati ai punti 1. e 2., l'analisi statistica è stata effettuata mediante tabelle di contingenza 2x2 utilizzando il programma STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., 2001). E' stata applicata la correzione di Yates per piccoli campioni (< 100).

3.7 Risultati

Indipendentemente dal tipo di alimento, le larve di *P. unipuncta* su cui *E.larvarum* aveva ovideposto sono morte in modo significativamente maggiore rispetto alle larve testimoni, non esposte al parassitoide (Tabella 3.2) La mortalità delle larve esposte al parassitoide non è stata influenzata in modo significativo dall'alimentazione delle larve (Tabella 3.3). La percentuale di larve morte che hanno prodotto pupari è stata bassa, sia nelle larve alimentate con la pianta, sia in quelle alimentate con la dieta, senza significative differenze fra i due tipi di alimentazione, anche se la percentuale riferita alle larve alimentate su dieta è stata leggermente più alta (Tabella 3.4). E' da segnalare che non è mai stato ottenuto più di un pupario per larva. I pupari ottenuti nelle larve alimentate su dieta hanno lasciato sfarfallare l'adulto in 5 casi su 7. Dai 2 pupari ottenuti da larve ottenute su pianta non è sfarfallata *E. larvarum*.

<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Morti (=individui in cui si sono formati pupari +individui morti per altre cause)		Vivi (= adulti sfarfallati)		χ^2	P
	N.	%	N.	%		
Testimone (larve su dieta e pianta, non esposte a <i>E. larvarum</i>)	2	5%	38	95%	37,97	P <0,001
Larve su dieta, esposte a <i>E. larvarum</i>	30	75%	10	25%		
	N.	%	N.	%	43,02	P<0,001
Testimone (larve su dieta e pianta, non esposte a <i>E. larvarum</i>)	2	5%	38	95%		
Larve su pianta, esposte a <i>E. larvarum</i>	32	80%	8	20%		

Tabella 3.2 - Tabelle di contingenza 2x2 per valutare l'indipendenza dell'esposizione a femmine di *E. larvarum* e della mortalità di larve di *P. unipuncta* (alimentate con dieta artificiale o con mais). E' stata applicata la correzione di Yates per piccoli campioni (<100)

Table 3.2 - The 2x2 contingency tables for testing the independence of exposure to *E. larvarum* females and the mortality of *P. unipuncta* larvae (fed artificial diet or maize plant). Yates corrected chi-square values are presented (sample size < 100)

Alimentazione delle larve di <i>Pseudaletia unipuncta</i> esposte a <i>E. larvarum</i>	Morti (=individui in cui si sono formati pupari +individui morti per altre cause)		Vivi (= adulti sfarfallati)		χ^2	P
	N.	%	N.	%		
Pianta di mais	32	80%	8	20%	0,07	P >0,05
Dieta artificiale	30	75%	10	25%		

Tabella 3.3 - Tabella di contingenza 2x2 per valutare l'indipendenza del tipo di alimentazione e della mortalità di larve di *P. unipuncta* in seguito a parassitizzazione da parte di *Exorista larvarum*. E' stata applicata la correzione di Yates per piccoli campioni (<100)

Table 3.3 - The 2x2 contingency table for testing the independence of larval food and larval mortality of *P. unipuncta* following parasitization by *E. larvarum* . Yates corrected chi-square value is presented (sample size < 100)

Alimentazione delle larve di <i>Pseudaletia unipuncta</i> esposte a <i>E. Larvarum</i>	Larve morte che hanno prodotto pupari		Larve morte che non hanno prodotto pupari		χ^2	P
	N.	%	N.	%		
Pianta di mais	2	6,3%	30	93,7%	1,67	P> 0,05
Dieta artificiale	7	23,3%	23	76,7%		

Tabella 3.4 - Tabella di contingenza 2x2 per valutare l'indipendenza del tipo di alimentazione e del numero di larve morte di *P. unipuncta* che hanno prodotto un

pupario, in seguito a parassitizzazione da parte di *Exorista larvarum*. E' stata applicata la correzione di Yates per piccoli campioni (<100).

Table 3.4 - The 2x2 contingency table for testing the independence of larval food and number of dead larvae which produced a puparium following parasitization by *E. larvarum*. Yates corrected chi-square values are presented (sample size < 100). No larva produced more than one puparium

3.8 Discussione dei risultati e conclusioni

Nella prova effettuata, *E. larvarum* ha dimostrato una scarsa efficacia quale agente di controllo di *S. littoralis*, pure annoverata tra i suoi ospiti naturali (Hafez, 1953 a,b,c; Hafez *et al.*, 1976; Assal e Koilab, 1984). In base al tempo impiegato dalle femmine del tachinide per ovideporre, l'accettabilità di *S. littoralis* non è stata significativamente dissimile rispetto a quella di *G. mellonella*, abitualmente impiegata come ospite di sostituzione per questo parassitoide nei laboratori del DiSTA.. Va però notato che, per deporre un numero di 4-5 uova su ogni larva, le femmine hanno impiegato in media 1 minuto abbondante in più su *S. littoralis* piuttosto che su *G. mellonella*, ma soprattutto, pur accettato, il nottuide si è, in questa prova, dimostrato inidoneo per il parassitoide: infatti, su 80 larve su cui le femmine avevano ovideposto, una sola ha prodotto un pupario. Questa situazione ricalca, in modo più accentuato, quella osservata da Dindo *et al.* (1999) in uno studio di laboratorio in cui era stato valutato il parassitismo di *E. larvarum* nell'ospite naturale *Lymantria dispar* e in *G. mellonella*. Le larve parassitizzate con successo (cioè che produssero pupari) furono il 23% per *L. dispar* e l'87% per *G. mellonella*. Un'ipotesi per la minore idoneità degli ospiti naturali rispetto a quelli di sostituzione è stata formulata da Pimentel (1963) e da Hokkanen e Pimentel (1984), dopo avere messo a confronto un certo numero di nuove e vecchie associazioni ospite-parassitoide (il sistema *G.mellonella-E.larvarum* rappresenta una nuova associazione, i sistemi *L.dispar-E.larvarum* e *S. littoralis-E. larvarum* rappresentano vecchie associazioni). In base a questa ipotesi, nelle vecchie associazioni si sarebbe creata nel tempo, una sorta di equilibrio tra

parassitoide e ospite, quest'ultimo cioè avrebbe sviluppato, nei confronti dell'antagonista, una sorta di resistenza; viceversa, nelle nuove associazioni, questo equilibrio non si sarebbe ancora evoluto. Hokkanen (1983) ha condotto uno studio sull'evoluzione avvenuta nell'America tropicale, nell'arco di 200 anni di interazione tra l'ospite *Nezara viridula* (L.) e il parassitoide tachinide *Trichopoda pennipes* (Fabricius); l'autore è giunto alla conclusione che quest'ospite ha evoluto una capacità di resistere agli attacchi del parassitoide superiore del 10% rispetto a ospiti conspecifici, ma provenienti da altre regioni geografiche.

Naturalmente, allo stato attuale, per la coppia *S. littoralis*-*E. larvarum* (così come per *L. dispar*-*E. larvarum*) non può essere esclusa nemmeno un'ipotesi diversa, e per certi versi, opposta: cioè che *E. larvarum*, allevata per anni a spese di un ospite di sostituzione, possa avere perso (o diminuito) la propria capacità di parassitizzare con successo ospiti naturali (la colonia presso il DiSTA è stata allestita nel 1992 e rinnovata nel 2004 con parassitoidi sfarfallati da larve parassitizzate di *L. dispar* raccolte in campo). Questo è, del resto, uno dei problemi che devono essere costantemente affrontati quando si allevano massalmente insetti entomofagi, anche a scopi commerciali (Van Lenteren, 2003). Per quanto riguarda *S. littoralis*, comunque, i risultati ottenuti sembrano indicare che l'azione limitatrice di *E. larvarum* nei confronti nel nottuide sia scarsamente efficace. Maggiori ricerche sono comunque necessarie prima di trarre conclusioni definitive. In particolare, sarà necessario stabilire se effettivamente la mortalità riscontrata in *S. littoralis* possa essere ricondotta a un'azione del parassitoide (in particolare al suo sviluppo, quantunque incompleto). A tale fine, occorrerà dissezionare larve di *S. littoralis*, parassitizzate senza avere prodotto pupari di *E. larvarum* e comunque morte, per rilevare eventuali tracce di larve del tachinide. Inoltre sarà opportuno verificare se, a seguito della parassitizzazione da parte di *E. larvarum*, l'entomofago, pur non completando il proprio sviluppo, possa indebolire l'ospite prima di ucciderlo, contribuendo quindi a limitare l'attività trofica del fitofago, come del resto riscontrato in altri sistemi ospite-parassitoide ad antagonista tachinide (Dindo, 1983). Va tuttavia rilevato che *E. larvarum*, essendo un parassitoide a sviluppo indipendente dalla fisiologia dell'ospite e a fase parassitaria breve, presenta con

l'ospite stesso relazioni assai poco sofisticate (Mellini, 1986): è quindi probabile che il comportamento della vittima, prima di soccombere, venga scarsamente influenzato dall'azione del tachinide.

Per quanto concerne *P. unipuncta*, essa non è segnalata come ospite naturale di *E. larvarum*. Tuttavia Arnaud (1978) cita questo notturno come ospite naturale di un tachinide neartico, *Exorista mella* Walker. Tale specie, secondo Sabrosky e Reardon (1976) e Morewood e Wood (2002), è assai simile a *E. larvarum*; secondo i medesimi autori esisterebbero degli individui intermedi (ibridi?) tra le due specie, o comunque individui che non possono essere attribuiti con certezza all'una o all'altra specie. Nel presente studio, *P. unipuncta* si è dimostrata scarsamente idonea per lo sviluppo di *E. larvarum*, indipendentemente dalla dieta somministrata alle larve (dieta artificiale o pianta di mais). Da segnalare, a questo proposito, che vari studi hanno posto in luce che l'alimentazione dell'ospite può, in misura maggiore o minore, avere un effetto sul parassitoide (Elzen *et al.*, 1984; Reis *et al.*, 2003). Non mancano, comunque, in letteratura, casi in cui, come nel presente studio, l'alimentazione dell'ospite è ininfluenza ai fini dello sviluppo del parassitoide (Urrutia *et al.*, 2007). Va comunque enfatizzato che, nelle larve su cui le femmine di *E. larvarum* avevano ovideposto, la mortalità è stata sensibilmente più alta rispetto alle larve testimoni (non parassitizzate) anche se pochi parassitoidi hanno completato con successo il loro sviluppo. Questa situazione conferma quanto era già stato osservato, in uno studio precedente, da Simoes *et al.* (2004) in larve della stessa *P. unipuncta* e di altri due notturni, nonché da Dindo *et al.* (1999; 2002) in *L. dispar*: un'elevata mortalità delle larve ospiti sottoposte a parassitizzazione nonostante le rese in pupari fossero basse. Va notato che, nello studio condotto da Simoes *et al.*, 2004, per nessuno dei tre notturni oggetto di studio, compresa *P. unipuncta*, era stato effettuato un confronto con larve testimoni non parassitizzate; tale confronto è stato invece condotto nella presente ricerca. I risultati qui ottenuti portano ad avvalorare l'ipotesi già avanzata nello studio di Simoes (2004): cioè che l'elevata mortalità di larve sottoposte a parassitizzazione sia correlata con l'attività del parassitoide, anche quando questo non riesce a completare il suo sviluppo. In conclusione, lanci inondativi di *E. larvarum* contro

P. unipuncta potrebbero efficacemente contribuire ad abbassarne la popolazione, anche se la parassitizzazione viene portata a termine con successo in pochissimi casi. L'efficacia di un parassitoide in campo viene di solito valutata in base al numero di insetti bersaglio parassitizzati con successo (Grenier e De Clercq, 2003), ma, come già enfatizzato, tra gli altri, da Dindo (1986), si dovrebbe tenere conto anche di altri fattori di mortalità dell'ospite correlati all'attività del parassitoide, come le punture dell'ospite e l' "host feeding" per gli imenotteri e la mortalità dovuta a sviluppo incompleto del parassitoide tanto per gli imenotteri che per i tachinidi.

CAPITOLO 4

4.1 Ruolo svolto dalla pianta nel processo di parassitizzazione di Lepidotteri Nottuidi da parte del parassitoide *Exorista larvarum* (L.)

Le emissioni chimiche giocano un ruolo fondamentale nel comportamento di ricerca dell'ospite da parte degli insetti parassitoidi (Godfray 1994). Numerosi parassitoidi localizzano i propri ospiti sfruttando le miscele di volatili rilasciate dalle piante danneggiate dai fitofagi (Turlings *et al.*, 1995; De Moraes *et al.*, 1998).

Le piante danneggiate da un insetto fitofago, o anche solo meccanicamente, producono composti chimici volatili diversi per quantità e qualità da quelli prodotti dalle piante indenni. Il tipo di composti emessi sembra essere legato principalmente all'insetto (specie, stadio di sviluppo) e alla pianta (specie, genotipo, età), ma anche agli stress ambientali (Paré e Tumlinson, 1999). Questi composti rappresentano nelle piante un meccanismo di difesa indiretta, in quanto possono attirare predatori e parassitoidi, indurre risposte difensive nelle piante vicine a quelle infestate e prendere parte ai processi che regolano il comportamento degli insetti fitofagi, facilitando o sfavorendo le loro interazioni con le piante. È stato dimostrato, ad esempio, che piante di fagiolo e melo infestate dall'acaro *Tetranychus urticae* Koch emettono composti volatili che attirano i suoi predatori (Takabayashi e Dicke, 1996), mentre piante di mais e cotone infestate da larve di Lepidotteri rilasciano composti che attirano i parassitoidi (Tumlinson *et al.*, 1993).

La capacità degli insetti entomofagi di percepire i segnali emessi dalle piante, distinguendoli da quelli di sottofondo presenti nell'ambiente, indica che le piante danneggiate dai fitofagi emettono composti chimici che sono distinguibili da quelli emessi in risposta ad altri tipi di danno (ad esempio un semplice danno meccanico), o da quelli rilasciati dalle piante indenni. Infatti, se i parassitoidi localizzassero i propri ospiti affidandosi unicamente alla proprie capacità visive, la ricerca finirebbe spesso per essere vana. A differenza degli insetti impollinatori, che vanno alla ricerca di bersagli (fiori)

facilmente individuabili dal punto di vista visivo, i parassitoidi si sono specializzati nella ricerca di insetti fitofagi piccoli, che spesso sono ben mimetizzati e localizzati solitamente sulla pagina inferiore delle foglie. Gli stimoli visivi, in fase di localizzazione dell'ospite, sembrano, comunque, avere maggiore importanza per i tachinidi che per gli imenotteri (Stireman, 2002). Per la maggior parte degli entomofagi le piante sulle quali si nutrono i fitofagi forniscono importanti informazioni e contribuiscono alla localizzazione delle prede e degli ospiti.

Per esempio, è stato dimostrato che piante di fagiolo (*P. lunatus*) danneggiate da *T. urticae* rilasciano una complessa miscela di composti volatili che attira *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, predatore di acari, contribuendo indirettamente alla difesa della pianta (Dicke *et al.*, 1990; Bouwmeester *et al.*, 1999). In studi condotti in tunnel del vento, femmine di *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera Braconidae) si dirigono verso piante di *Vicia faba* L. infestate dal proprio ospite, l'afide *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera Aphididae) (Du *et al.*, 1996, 1997; Guerrieri *et al.*, 1993, 1997; Powell *et al.*, 1998). I soli ospiti e le sole piante risultano scarsamente attrattivi, a differenza delle piante infestate o recentemente danneggiate da afidi, suggerendo che l'attività di nutrizione del fitomizo induca nelle piante danneggiate l'emissione di composti volatili che agirebbero da sinomoni (Guerrieri *et al.*, 1996).

Sia McCall *et al.* (1993) che Steinberg *et al.* (1993) hanno dimostrato, attraverso una serie di analisi gas-cromatografiche e di prove condotte in tunnel del vento, come i soli odori emessi dai fitofagi siano segnali poco attrattivi e poco abbondanti, a differenza dei composti rilasciati dalle piante danneggiate dai fitofagi, che sono invece più facilmente individuabili nell'ambiente (Vet e Dicke, 1992).

In generale, è già stato ampiamente dimostrato che le sostanze chimiche rilasciate dalle piante in seguito all'attacco di un fitofago, sono importanti richiami per molti imenotteri parassitoidi (Turlings *et al.*, 1990; Potting *et al.*, 1995), ma solo pochi studi riguardano ditteri parassitoidi, per i quali tali meccanismi sono ancora poco noti.

In particolare, tra questi studi si possono citare Roth *et al.*, 1982 che, in prove condotte in campo con gabbie, hanno dimostrato che il tachinide *Lixophaga diatraeae* (Townsend)

era maggiormente attratto dalle parti della gabbia che contenevano piante di canna da zucchero infestate con larve del baco della canna da zucchero, *Diatraea saccharalis* (Fabricius). All'interno delle gabbie, i parassitoidi erano in grado di distinguere tra piante infestate e piante non infestate, dimostrando così che l'interazione tra il fitofago e la sua pianta nutrice è un fonte attrattiva per le femmine del tachinide.

A tutt'oggi, solo per il tachinide *Cyzenis albicans* (Fallén), parassitoide del lepidottero geometride *Operophtera brumata* L., è stato individuato il borneolo come attrattivo chimico; tale composto era stato isolato da un estratto di foglie della pianta ospite *Quercus garryana* (Roland *et al.*, 1995).

Mondor & Roland (1997) hanno dimostrato che i tachinidi *Leschenaultia exul* (Townsend) e *Patelloa pachypyga* (Aldrich & Webber) sono attirati dalle feci dell'ospite naturale, il lepidottero lasiocampide *Malacosoma disstria* (Hübner) e dal complesso formato da foglie della pianta ospite e larve dello stesso fitofago nell'atto di nutrirsi.

Exorista japonica Townsend è attirata dal complesso pianta/fitofago, formato dal lepidottero *Mythimna separata* (Walker) nell'atto di nutrirsi su piante di mais ed è attirata in misura minore da piante danneggiate, da cui erano state rimosse larve e feci del fitofago (Kainoh *et al.*, 1999).

In prove effettuate in olfattometro, femmine di *Exorista mella* Walker, erano più attratte da composti chimici volatili prodotti da piante nutrici dell'ospite *Grammia geneura* Strecker danneggiate meccanicamente (senza l'intervento del fitofago), piuttosto che dalla larva stessa (Stireman, 2002).

Infine, in prove effettuate in tunnel del vento, *E. japonica* è risultata essere più attratta da piante infestate da larve di *M. separata*, rispetto a piante danneggiate artificialmente e a piante integre (Ichiki, 2008).

Nei paragrafi che seguono, vengono descritte prove eseguite al fine di accertare il ruolo svolto dalla pianta, infestata da *Spodoptera littoralis* o da *Pseudaletia unipuncta*, nella fase di localizzazione dell'ospite da parte del tachinide *Exorista larvarum*. Le prove sono state

eseguite, per *S. littoralis*, in gabbia posta in cella climatizzata e per *P. unipuncta* in tunnel del vento.

4.2 Materiali e metodi *E. larvarum* – *S. littoralis*

Le prove sono state svolte presso i laboratori del DiSTA, Università di Bologna, all'interno di una cella climatizzata a $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, con umidità relativa $65 \pm 5\%$ e fotoperiodo 16 L: 8 B e sono state svolte tra le ore 14.00 e le ore 18.00, poiché da osservazioni personali avevo constatato che era il momento di maggiore attività di volo dei parassitoidi durante la giornata.

Le femmine di *E. larvarum* utilizzate avevano una età compresa tra i 5 e 12 giorni (Dindo *et al.*, 1999) ed erano state precedentemente poste in gabbia insieme a ugual numero di maschi per garantire l'accoppiamento (Ichiki, 2008).

Le prove sono state condotte in una gabbia di plexiglass di dimensioni 60x35x50 cm con prese d'aria in rete di ottone. In uno dei due lati corti della gabbia sono state posizionate 3 scatole Petri prive di coperchio, una contenente una larva di *G. mellonella*, una contenente una larva di *S. littoralis* e una contenente una larva di *S. littoralis* nell'atto di nutrirsi su una foglia di pianta di fagiolo (Ichiki, 2007).

Dal lato opposto della gabbia sono state introdotte una per volta 40 femmine di *E. larvarum*, attraverso una fessura posta ad una altezza di circa 30 cm dalla base. Tali femmine erano state precedentemente nutrite con zucchero in zollette e soluzione di acqua e miele (20%), come nelle condizioni di allevamento standard, al fine di evitare che gli insetti volassero in cerca di cibo.

Per ogni femmina è stato registrato il tempo impiegato per individuare l'ospite e deporre almeno un uovo. Se dopo 10 minuti all'interno della gabbia il tachinide non mostrava interesse verso nessuna delle tre scelte (ad esempio non si avvicinava ai bersagli, non volava, non camminava o si muoveva nel lato opposto della gabbia) veniva estratto e sostituito da un'altra femmina e non veniva considerato ai fini della prova. Ogni volta che una femmina effettuava la scelta e ovideponeva su un ospite, tutte e tre le tre larve

bersaglio venivano sostituite e la disposizione delle Petri all'interno della gabbia veniva cambiata, in maniera casuale. Per ogni tesi (larva di *S. littoralis*, larva di *G. mellonella* e larva di *S. littoralis* su foglia di pianta di fagiolo) sono dunque state saggiate 40 femmine. Per ogni femmina sono stati registrati la scelta effettuata e il tempo impiegato per ovideporre almeno un uovo. Ai fini dell'elaborazione statistica sono stati considerati, per ogni tesi, il numero e la percentuale di femmine che hanno effettuato la scelta. I dati sono stati elaborati, per quanto riguarda le scelte effettuate dalle femmine, mediante tabelle di contingenza 3x2, seguite da test di Kimball (1954) per la scomposizione dei gradi di libertà. I dati relativi ai tempi impiegati dalle femmine per effettuare la scelta e ovideporre almeno un uovo sul bersaglio scelto sono stati elaborati mediante analisi della varianza. E' stato impiegato il programma STATISTICA 6.0.

4.2.1 Risultati

Il 37,5% delle femmine ha scelto di ovideporre su larve di *S. littoralis*, il 50% ha scelto di ovideporre su larve di *G. mellonella* e solo il 12,5% ha scelto di ovideporre su larve di *S. littoralis* poste su foglia di fagiolo. In base alla tabella di contingenza 3x2 [valore critico di χ^2 (0,05; 2) = 5,99; (0,01; 2) = 9,21], effettuata al fine di verificare l'ipotesi dell'indipendenza dei tre bersagli rispetto alla scelta/non scelta effettuata dalla femmina, il tipo di bersaglio ha avuto, sulla scelta, una influenza altamente significativa ($P < 0,01$ ($\chi^2 = 13,51$)). I dati sono stati successivamente rielaborati utilizzando la formula di Kimball, al fine di verificare l'ipotesi dell'indipendenza di due bersagli rispetto alla scelta compiuta dalle femmine; sono state saggiate tutte le combinazioni possibili (*S. littoralis* . *G. mellonella*; *S. littoralis* . *S. littoralis* foglia di fagiolo e, infine *G. mellonella* . *S. littoralis* foglia di fagiolo). I risultati sono riportati in Tabella 4.1 Come si può notare, *S. littoralis* foglia di fagiolo è stata scelta in percentuale significativamente inferiore rispetto alla sola *S. littoralis* e a *G. mellonella*; i due ultimi bersagli sono stati scelti in percentuale non significativamente diversa.

Bersaglio	<i>S. littoralis</i>	<i>G. mellonella</i>	<i>S. littoralis</i> su foglia di fagiolo
<i>S. littoralis</i>		P>0,05 $\chi^2 = 2,81$	P<0,01** $\chi^2 = 11,25$
<i>G. mellonella</i>			P<0,01** $\chi^2 = 25,21$
% scelte	37,5a	50a	12,5b

Tabella 4.1 - Tabella di contingenza 2x2, calcolata secondo la formula di Kimball (1954) per valutare l'indipendenza del bersaglio e della scelta effettuata da *Exorista larvarum*.

Table 4.1 - The 2x2 contingency table calculated according to Kimball (1954) for testing the independence of target samples and choice by *E. larvarum* females.

Il tempo medio per effettuare la scelta è stato pari (media \pm dev. st.) a $10,4 \pm 3$ min per *S. littoralis* su pianta di fagiolo (n= 5), $6 \pm 3,48$ min per *S. littoralis* e $6,05 \pm 3,04$ min per *G. mellonella*. La differenza tra i tempi relativi a *S. littoralis* su pianta da un lato e gli altri due bersagli dall'altro è significativa ($F_{2,37}=4,63$ P < 0,05).

4.3 Materiali e metodi *E. larvarum* – *P. unipuncta*

Le prove sono state svolte presso i laboratori del Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal dell'Università di Lleida (Spagna).

Il tunnel del vento utilizzato nelle prove era costruito in vetro e misurava 50 x 50 x 200 cm; il flusso d'aria all'interno aveva una velocità di 30 cm/secondo. (Ichiki, 2008; Kainoh, 1999). La temperatura nella stanza era di circa 26°C

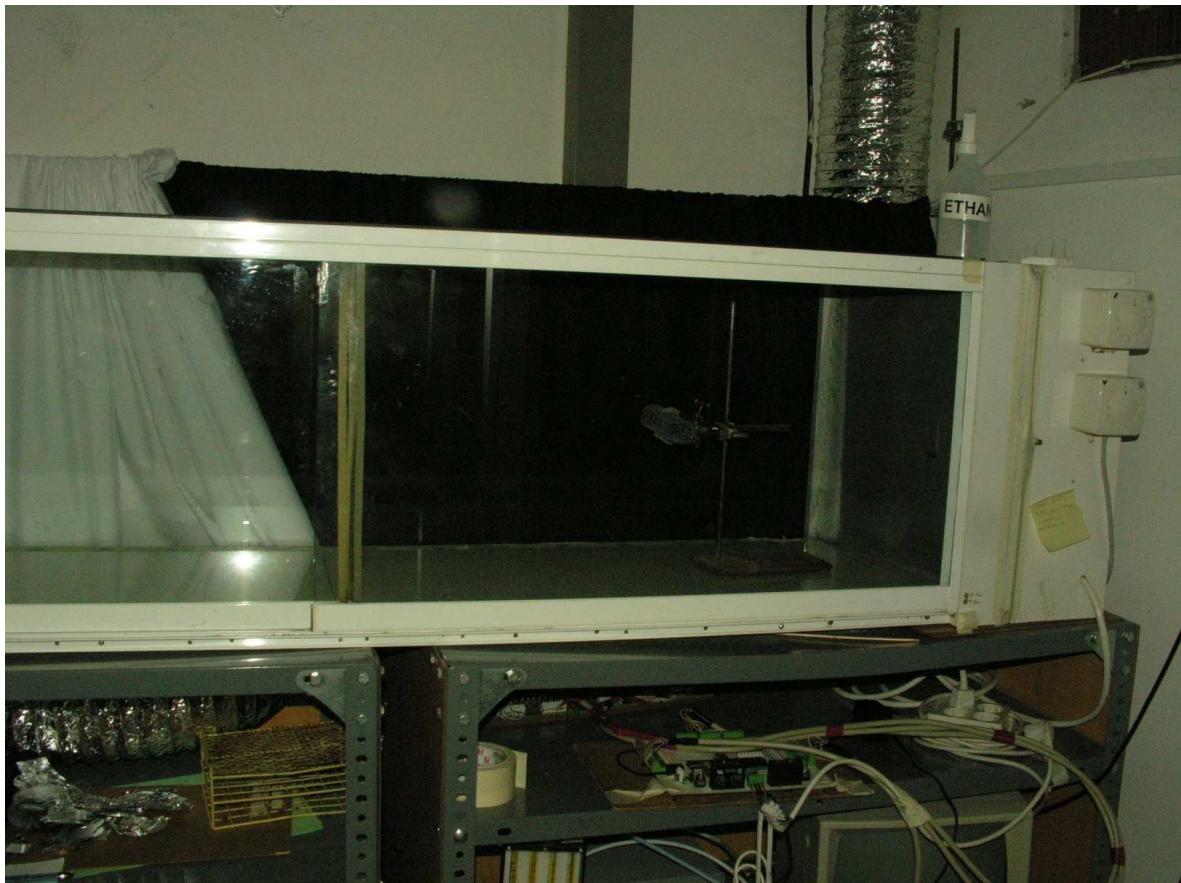


Figura 1 - Tunnel del vento

Figure 1 - Wind tunnel

Le larve di *P. unipuncta* utilizzate nelle prove erano tutte in IV o V età larvale ed erano state allevate su dieta e foglie di mais. Come nella prova effettuata con *S. littoralis*, le femmine di *E. larvarum* avevano una età compresa tra i 5 e 12 giorni ed erano state precedentemente poste in gabbia insieme a ugual numero di maschi per garantire l'accoppiamento.

Come bersaglio nel tunnel sono stati preparati 7 campioni (sorgenti di odore), ognuno dei quali è stato saggiato su 40 femmine di tachinide, senza esperienza di ovideposizione (naïve).

I bersagli utilizzati sono elencati nella Tabella 4.2.

1. Il primo bersaglio era costituito da 5 larve di IV-V età di lepidottero poste in un contenitore di rete (\varnothing 2cm, h 5cm) posizionato ad una altezza di circa 25 cm dalla base del tunnel tramite un'asta di supporto, munita di pinza.
2. Il secondo bersaglio era costituito da 3 foglie di mais recise ad una lunghezza di 40 cm circa e poste in acqua in una beuta da 250 cl, il cui collo è stato chiuso con un batuffolo di cotone, per evitare l'accesso all'acqua da parte delle femmine.
3. Il terzo bersaglio era costituito da foglie di mais sistemate come nel bersaglio 2, precedentemente sottoposte all'attacco di 5 larve di *P. unipuncta*. Le larve e le feci erano state rimosse una volta che avevano consumato circa il 20% della superficie delle foglie che fuoriusciva dalla beuta (ciò si verificava indicativamente in circa 2 ore).
4. Il quarto bersaglio era costituito da foglie di mais sistemate come nel bersaglio 2, danneggiate meccanicamente con una macchina foratrice per fogli. Sono stati effettuati circa 10 fori (del diametro di 5 mm) su ogni foglia.
5. Il quinto bersaglio era costituito da foglie di mais sistemate come nel bersaglio 2, su cui erano state poste 5 larve di *P. unipuncta* nell'atto di alimentarsi.
6. Il sesto bersaglio era costituito da foglie di mais sistemate come nel bersaglio 2, bagnate con circa 40 μ l di saliva di *P. unipuncta*. La saliva era stata precedentemente prelevata da larve alimentate solo con foglie di mais. Per prelevare la saliva, la larva di *P. unipuncta* era stata posta sul fondo di una scatola Petri, qui veniva molestata e schiacciata per ottenere l'emissione di saliva (riflesso naturale utilizzato dalla larva come forma di difesa) (Gross, 1993). A questo punto la saliva veniva raccolta con capillari in vetro monouso, posta in provette Eppendorf e in seguito distribuita in gocce fatte ricadere con micropipetta sulla pianta.
7. Il settimo bersaglio era costituito dal bersaglio 2 e dal bersaglio 5 posti

contemporaneamente all'interno del tunnel.

Sorgenti di odore	
1	5 larve di <i>P. unipuncta</i>
2	foglie integre
3	foglie erose dalle larve
4	foglie danneggiate meccanicamente
5	foglie con 5 larve di <i>P. unipuncta</i>
6	foglie integre bagnate con saliva di <i>P. unipuncta</i>
7	foglie con 5 larve + foglie integre

Tabella 4.2 - Bersagli impiegati nella prova in tunnel del vento

Table 4.2 - Odour samples used in the wind tunnel trial

Le femmine venivano introdotte nel tunnel su una piattaforma ad una altezza di 25 cm circa dalla base del tunnel e alla distanza di 1 metro circa dal bersaglio; quest' ultimo si trovava a 50 cm dalla fonte del flusso d'aria (Kainoh, 1999).

Tutti i tachinidi sono stati depositati, all' interno del tunnel, su una zolletta di zucchero posta sulla piattaforma, al fine di fornire alimento al parassitoide ed evitare così che il volo potesse essere finalizzato alla ricerca di cibo.

Se dopo 5 minuti dall'introduzione nel tunnel la femmina non aveva ancora lasciato la piattaforma, veniva sostituita con un' altra. Se dopo 10 minuti dall'inizio del volo la femmina non aveva ancora individuato il bersaglio, cioè non si era ancora posata sulla sorgente di odore, veniva estratta dal tunnel e la prova si considerava conclusa.

Quella femmina veniva comunque considerata ai fini dei risultati.

I dati relativi al numero e alla percentuale di femmine che hanno raggiunto ogni bersaglio sono stati analizzati mediante una tabella di contingenza 7x2 e, successivamente, mediante singole tabelle di contingenza 2x2

4.3.1 Risultati

I risultati sono illustrati nel Grafico 4.1.

In base alla tabella di contingenza 7x2 [valore critico di χ^2 (0,001; 6) = 40,117], effettuata al fine di verificare l'ipotesi dell'indipendenza dei 7 bersagli rispetto alla scelta/non scelta effettuata dalla femmina, il tipo di bersaglio ha avuto, sulla scelta, una influenza altamente significativa [$P < 0,001$ ($\chi^2 = 40,12$)].

Contrariamente a quanto avvenuto nella prova in gabbia con *S. littoralis*, gli esperimenti in tunnel del vento hanno mostrato che *E. larvarum* era maggiormente attirata dal bersaglio costituito da larve nell'atto di nutrirsi sulla pianta; infatti le femmine di *E. larvarum* hanno raggiunto il bersaglio numero 5 (foglie con larve) e il bersaglio numero 7 (foglie con larve + foglie integre) in maniera maggiore, con una differenza statisticamente significativa, rispetto ai bersagli 1 (larve) ($\chi^2 = 9,04$ e $17,64$), 2 (foglie integre) ($\chi^2 = 4,27$ e $11,17$), 4 (foglie danneggiate meccanicamente) ($\chi^2 = 7,17$ e $15,24$), 6 (foglie integre bagnate con saliva) ($\chi^2 = 11,25$ e $20,31$).

Il bersaglio numero 3 (foglie erose dalle larve) ha attirato i tachinidi in maniera intermedia, poiché ha mostrato di attirare le femmine in misura minore, con differenza statistica significativa, rispetto al bersaglio 7 ($\chi^2 = 3,33$) ma non rispetto al bersaglio 5 ($\chi^2 = 0,23$ n.s.).

I bersagli 1, 4 e 6 hanno mostrato una scarsa attrattività da parte delle femmine, ma a mio avviso il comportamento dei parassitoidi all'interno del tunnel è stato differente relativamente ai vari bersagli. Per quanto riguarda il bersaglio numero 1, *E. larvarum* si muoveva all'interno del tunnel, in maniera apparentemente casuale, volando e camminando in tutte le zone del tunnel, mentre per quanto riguarda i bersagli 4 e 6 la maggior parte dei tachinidi, poco dopo essersi spostata dalla piattaforma di partenza, rimaneva pressochè immobile, e si muoveva molto poco. Ritengo possibile che questo

secondo comportamento fosse dovuto al forte odore emanato dal bersaglio (assai più percepibile rispetto agli altri), probabilmente infatti pochi minuti dopo l'inserimento del bersaglio, l'aria all'interno del tunnel si saturava di odore, impedendo che si mantenesse un flusso continuo.

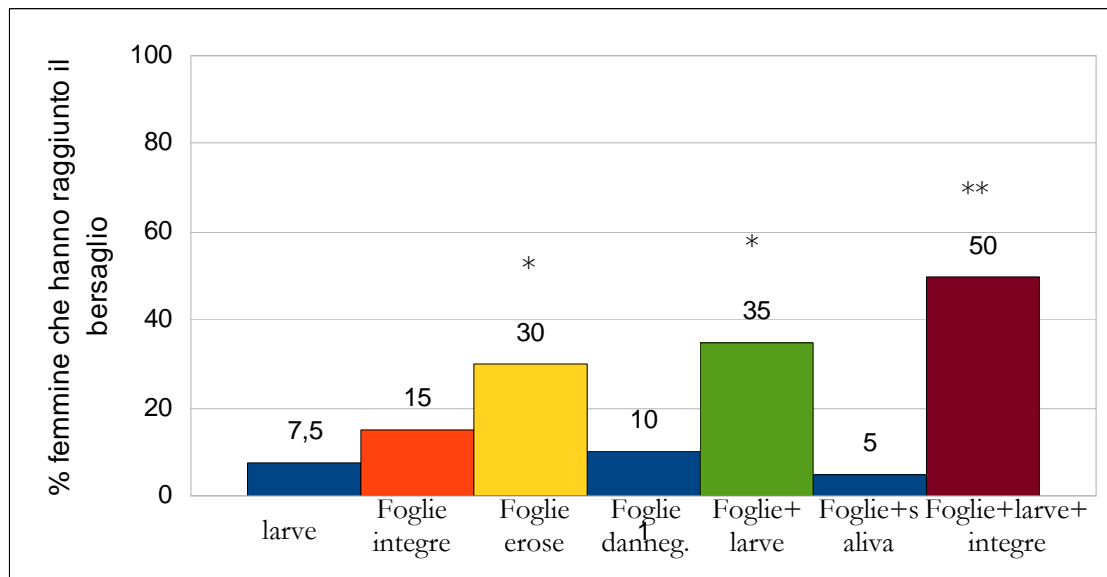


Grafico 4.1 - Percentuale di femmine che hanno raggiunto il bersaglio per ogni sorgente di odore.

Graphic 4.1 - Percentage of female that reached the target for each odoure source

4.4 Discussione dei risultati e conclusioni

I risultati relativi alla prova effettuata per indagare il ruolo della pianta ospite sul parassitismo dell'ospite naturale *S. littoralis* da parte di *E. larvarum* indicano che la foglia di fagiolo anziché incentivare l'attrattività del nottuido nei confronti del tachinide l'ha diminuita, a vantaggio degli altri bersagli. Questa conclusione si basa sia sui risultati relativi alle scelte effettuate dalle femmine (che hanno di gran lunga preferito le larve sia di *G. mellonella* sia di *S. littoralis* senza pianta ospite) sia sui tempi impiegati per la scelta e per ovideporre il primo uovo; nei pochi casi in cui sono state scelte le larve su foglia, infatti, i tempi sono stati più lunghi quasi del doppio rispetto agli altri due bersagli. I

risultati ottenuti potrebbero confermare la particolare importanza che gli stimoli visivi hanno per i tachinidi sul processo di localizzazione dell'ospite. E' infatti possibile che le larve di nottuide su foglia di fagiolo siano state meno percepite dalle femmine, e pertanto meno scelte, a causa della loro colorazione e della quasi immobilità, che le ha rese poco visibili. E' da tenere presente che la prova è stata eseguita in un ambiente ristretto, in cui è possibile che gli stimoli visivi abbiano maggiore importanza rispetto agli stimoli odorosi. Questo aspetto merita sicuramente ulteriori ricerche.

Per quanto riguarda *P. unipuncta*, i risultati mostrano che i bersagli più attrattivi sono stati quelli in cui era presente la combinazione larva-pianta, con la sola eccezione del bersaglio n. 6 (foglie integre bagnate con saliva), in cui, probabilmente, l'attrattività è stata inibita dall'eccessiva potenza dello stimolo odoroso. L'attrattività maggiore è stata manifestata dai bersagli 5 e 7, rispettivamente costituiti da larve su foglie e da larve su foglie e foglie integre (quest'ultimo è stato in assoluto il bersaglio più attrattivo). Un'ipotesi di questo fenomeno potrebbe essere che a una certa distanza le femmine sono state maggiormente attratte da stimoli odorosi, provenienti anche dalla pianta, mentre a distanza più ravvicinata hanno agito orientandosi visivamente e, in particolare, seguendo i movimenti delle larve. Quest'ipotesi è, in un certo senso, avvalorata dai risultati ottenuti dalle prove in gabbia con *S. littoralis*. Questi aspetti meritano ulteriori approfondimenti, anche considerando che, finora, i meccanismi che regolano il processo di localizzazione dell'ospite da parte dei tachinidi non sono ancora del tutto noti (Stireman, 2002). Questo lavoro offre un contributo alla conoscenza di questi aspetti.

CAPITOLO 5

5.1 Comportamento difensivo di differenti larve di lepidottero in seguito all'attacco da parte del tachinide *E. larvarum*

Premetto che, in questa ultima parte del mio lavoro, ho espresso alcune considerazioni, che non sono supportate da dati scientifici e analisi statistica. Tali considerazioni potrebbero essere considerate forzate, ma ritengo che il comportamento dell'insetto ospite possa essere importante prima di tutto dal punto di vista etologico e in secondo luogo dal punto di vista scientifico, ogni qualvolta ci si trovi per esempio a dover impostare una prova o avviare un allevamento massale di parassitoidi: ciò mi ha portato ad alcune riflessioni.

Tra i vari fattori che possono incidere sull'esito della parassitizzazione dei lepidotteri, da parte di insetti parassitoidi, il comportamento delle larve gioca un ruolo importante che però spesso non viene tenuto in debita considerazione ai fini sperimentali. Le larve di lepidottero infatti mostrano un comportamento molto variabile nei confronti dei parassitoidi che li attaccano e in base a questo la loro vulnerabilità verso il parassitoide stesso può variare molto.

Le tre linee di difesa che le larve ospiti normalmente mostrano in seguito all'attacco di un parassitoide sono state suddivise in tre classi (Gross 1993 e Godfray 1994). La prima riguarda le caratteristiche dell'ospite stesso, come ad esempio un determinato colore, le dimensioni o la morfologia, che possono ridurre la probabilità di essere individuato e raggiunto dal parassitoide.

La seconda riguarda difese comportamentali che vengono attivate dalla larva nel momento in cui è già stata individuata da un parassitoide, ad esempio reazioni aggressive come mordere, muoversi a scatti rapidi, rigurgitare cibo.

La terza e ultima classe riguarda risposte fisiologiche che bloccano lo sviluppo delle uova o delle larve degli endoparassitoidi, una volta che la larva è stata attaccata. Quest'ultimo tipo di difesa prende inizio nel momento in cui l'ospite è stato parassitizzato.

Nel corso delle osservazioni descritte in questo capitolo ho valutato l'efficacia delle difese del secondo tipo (sensu Gross, 1993) di 5 specie differenti di lepidotteri, in reazione all'attacco del parassitoide tachinide *Exorista larvarum*. Ricordo che *E. larvarum* parassitizza l'ospite direttamente, ovideponendo le uova macrotipiche sul tegumento della vittima. Per i tachinidi gli stimoli visivi sono particolarmente importanti in fase di localizzazione e accettabilità dell'ospite (Stireman, 2002). Per quelli a parassitizzazione diretta (come *E. larvarum*), è noto che i movimenti della larva ospite giocano un ruolo di notevole importanza in entrambe le fasi del processo di selezione dell'ospite dell'ospite (Monteith, 1956; Weseloh, 1980; Stireman, 2002) e come reazione di difesa (Mellini, 1990). Su questa base ho effettuato le osservazioni che seguono.

5.2 Materiali e metodi

Le prove sono state svolte presso i laboratori dell'Università di Bologna e presso i laboratori del Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal dell'Università di Lleida (Spagna).

Come ospiti sono state utilizzate larve di dimensioni omogenee appartenenti a 5 specie diverse di lepidottero: *Galleria mellonella*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera littoralis*, *Hiphantria cunea* Drury (Lepidoptera Arctiidae), *Pseudaletia unipuncta*.

Per ogni specie sono state saggiate 10 larve di lepidottero, di dimensioni simili.

Le larve sono state introdotte 5 per volta in un' arena di osservazione, formata da un contenitore cilindrico in vetro (20 Ø cm x 10 cm), chiuso in alto da un coperchio di scatola Petri, insieme a 5 femmine di *E. larvarum*, già accoppiate e in grado di ovideporre. Per essere sicuri che si fossero nutrite, le femmine erano state precedentemente poste in cilindri di plexiglass di dimensioni 7cm x 7 Ø cm, contenenti una zolletta di zucchero ed un piccolo abbeveratoio costituito da un batuffolo di cotone inserito in una provetta Eppendorf piena d'acqua distillata.

Sia le larve che i tachinidi erano liberi di muoversi all'interno dell'arena. Le osservazioni sono state svolte tra le ore 14.00 e le ore 18.00, temperatura $25^{\circ} \pm 1$ C e umidità relativa $65 \pm 5\%$.

Il comportamento di tutte le larve è stato osservato visivamente e per quanto riguarda *G. mellonella*, *O. nubilalis*, *S. littoralis*, *H. cunea* è stato filmato. Ogni osservazione ha avuto una durata di circa 10 minuti.

Alla fine di ogni osservazione le larve venivano estratte dall'arena e osservate per rilevare l'eventuale presenza di uova di tachinide.

Gli allevamenti di *S. littoralis* e *P. unipuncta* sono già stati descritti nei paragrafi 3.3.1 e 3.6.1. Le larve di *O. nubilalis* e *H. unipuncta* sono state raccolte in campo, poste in cella climatizzata, e nutrite con foglie di mais le prime e con foglie di gelso le seconde, fino al raggiungimento delle dimensioni idonee alla prova.

5.3 Risultati

G. mellonella ha mostrato un comportamento estremamente passivo all'attacco del parassitoide. Di fatto le larve si sono limitate a muoversi continuamente all'interno dell'arena, ma nel momento di contatto con il tachinide nessuna di esse ha mostrato un comportamento che rivelasse sensibilità; alla fine dell'osservazione tutte le larve presentavano alcune uova sul corpo. Queste osservazioni confermano quanto viene abitualmente rilevato nella conduzione dell'allevamento standard di *E. larvarum*, in particolare nella fase di parassitizzazione.

Le larve di *O. nubilalis* poste all'interno dell'arena si sono mosse poco e hanno trascorso la maggior parte del tempo quasi immobili alla periferia dell'arena stessa. Probabilmente in conseguenza di questo comportamento, gli attacchi di *E. larvarum* sono stati poco aggressivi, dato che, come ho già spiegato, l'individuazione della vittima a breve raggio da parte del tachinide avviene principalmente visivamente. I lepidotteri hanno reagito solo se attaccati al capo e la reazione è consistita solo nello spostamento del capo stesso, probabilmente perché solo in tal caso l'ospite poteva vedere il tachinide.

Le larve di *S. littoralis* hanno mostrato più di tutte le altre un comportamento aggressivo. Se avvicinate dal parassitoide hanno sempre reagito in maniera violenta, tentando di mordere il tachinide e in alcuni casi attaccandolo direttamente. Le larve muovevano il capo, lo rigiravano sul corpo velocemente e, al contempo, rigurgitavano liquidi attraverso l'apertura boccale, bagnandosi il corpo. Nel momento in cui il tachinide toccava il corpo della larva con le zampe o con l'ovopositore, *S. littoralis* girava il capo verso il punto di contatto e sembrava "cercare" con le mandibole l'uovo. In tutti i casi in cui l'uovo era raggiungibile dalle mandibole, la larva è stata in grado di individuarlo e di eliminarlo divorandolo, dimostrando così di avvertire perfettamente il punto di attacco esatto del parassitoide. Questo comportamento conferma quanto riportato da Mellini (1990), circa le reazioni delle larve di nottuidi ad attacchi di tachinidi a parassitizzazione diretta.

Anche *H. cunea* ha mostrato un comportamento di difesa deciso.

Ogni volta che il parassitoide si avvicinava ad una larva e ne toccava i peli, questa reagiva girando il capo in direzione del tachinide e muovendolo a scatti ritmicamente. Il movimento continuava per diversi minuti anche dopo che il parassitoide si era allontanato. Anche in questo caso la larva girava il capo esattamente verso il punto di attacco, dimostrando di avvertire il contatto con *E. larvarum* e di essere in grado di individuarlo sul proprio corpo.

Infine *P. unipuncta* ha mostrato un comportamento molto simile a quello di *S. littoralis*, cioè ha sempre reagito agli attacchi del tachinide, tentando di morderlo. Le larve muovevano il capo rigirandolo sul corpo velocemente e emettevano dei rigurgiti. Non ho però mai osservato l'atto di individuazione ed eliminazione dell'uovo con le mandibole, come in *S. littoralis*.

5.4 Conclusioni

Le conclusioni relative alle osservazioni da me effettuate in questo ultimo studio non sono sostenute da dati o analisi statistica. Vorrei tuttavia proporre una interpretazione

delle osservazioni effettuate, sulla base di mie personali considerazioni e di alcuni riferimenti bibliografici.

Per quanto riguarda *G. mellonella* il comportamento appare in linea con il fatto che tale lepidottero è un ospite idoneo per *E. larvarum*, ma di sostituzione e, in quanto tale (in base a quanto affermato, tra gli altri, da Pimentel, 1963 e Hokkanen e Pimentel, 1984) non ha sviluppato difese di alcun genere (comprese quelle attive) nei confronti del parassitoide. In natura, infatti, *G. mellonella* è parassita degli alveari e le sue larve vivono all'interno delle arnie; di conseguenza esse non possono venire a contatto con *E. larvarum* né con altri tachinidi, che non entrano negli alveari.

Analoghe considerazioni possono valere anche per *O. nubilalis*. Anch'essa, infatti, ha mostrato un comportamento quasi completamente passivo nei confronti di *E. larvarum* e anche in questo caso come per *G. mellonella*, ciò potrebbe essere spiegato partendo dal comportamento in natura di questo insetto. Normalmente infatti, le larve di *O. nubilalis* vivono all'interno delle piante di mais. Gli adulti depongono le uova sulla pagina inferiore delle foglie, ma le larve neosgusciate entrano nel fusto o nella pannocchia e qui si sviluppano fino alla maturità; pertanto anche per questa specie difficilmente le larve possono entrare in contatto con *E. larvarum* (come enfatizzato anche da Kara e Tschorsnig, 2003) o altri tachinidi a uova macrotipiche. Per questo motivo si può ipotizzare che *O. nubilalis* non abbia sviluppato difese comportamentali nei confronti di *E. larvarum* di cui non è ospite naturale.

H. cunea in Italia viene parassitizzato in natura da *E. larvarum* (tanto è vero che l'allevamento presso il Dista è stato avviato anche a partire da individui sfarfallati da larve di questo lepidottero parassitizzate e raccolte in campo) era quindi prevedibile che le larve esibissero comportamenti difensivi nei confronti di un nemico naturale e che ne avvertissero la presenza e l'attacco, ancora sulla base dell'ipotesi in base alla quale, nelle vecchie associazioni ospite-parassitoide, si instaurerebbe un equilibrio, che porterebbe la vittima a sviluppare una sorta di resistenza nei confronti dell'antagonista (Pimentel, 1963; Hokkanen e Pimentel, 1984). Va considerato che le larve passano la maggior parte del tempo sulle foglie delle piante e sono continuamente esposte al potenziale attacco da

parte di nemici naturali: pertanto ritengo plausibile pensare che abbiano sviluppato evolutivamente un senso di pericolo e un istinto di difesa nei confronti di tali nemici, compresi i parassitoidi a uova macrotipiche. Il fatto che la larva di *H. cunea* faticchi a percepire la presenza delle uova sul proprio corpo è presumibilmente collegato al fatto che questo è ricoperto da una fitta peluria; è però in grado di avvertire quale parte del corpo che viene interessata dall'attacco, probabilmente a seguito del movimento dei peli. Il comportamento di *S. littoralis* (comune, come si è detto, nei nottuidi ospiti di tachinidi) è paragonabile a quello di *H. cunea*; tuttavia le larve del nottuide hanno una maggiore sensibilità al contatto con il parassitoide, poiché, possedendo un corpo glabro, sono in grado di avvertire con più precisione il punto di attacco e di conseguenza attivare un meccanismo di difesa che prevede addirittura l'eliminazione dell'uovo del parassitoide. *P. unipuncta* ha esibito un comportamento simile a *S. littoralis*, con la differenza che le larve non hanno eliminato l'uovo con le mandibole. Questo nottuide che non è ospite naturale di *E. larvarum* si è rivelato non del tutto idoneo al completo sviluppo del tachinide (paragrafo 3.5) a questa scarsa idoneità, va forse collegata la diversa reazione di difesa.

CAPITOLO 6

6.1 Considerazioni conclusive sulle prospettive di impiego dei tachinidi in lotta biologica, con particolare riferimento a *E. larvarum*

I tachinidi, in generale, presentano caratteristiche di notevole interesse ai fini di un loro uso in programmi di lotta biologica: tra l'altro, come enfatizzato da Grenier (1988), molti dei loro ospiti sono compresi in ordini (Lepidotteri in primo luogo) che includono insetti fitofagi dannosi. Tuttavia, come più volte ribadito da Mellini (ad esempio nel suo lavoro del 1990), i tachinidi risultano di gran lunga meno studiati dei parassitoidi imenotteri da tutti i punti di vista e, come logica conseguenza, anche riguardo al loro impiego in campo applicativo. Non mancano comunque casi in cui i tachinidi sono stati utilizzati, talvolta con grande successo, in operazioni di lotta biologica, per lo più attraverso lanci inoculativi e aumentativi¹. Una ventina d'anni fa, Grenier (1988) ha effettuato una revisione bibliografica dedicata a tale argomento (i casi sotto riportati sono in parte stati tratti proprio da quel lavoro): è significativo il fatto che, in seguito nessun'altra revisione bibliografica sia stata dedicata alle potenzialità dei tachinidi come agenti di lotta biologica.

La maggior parte delle operazioni di lotta biologica con tachinidi è stata finora effettuata nelle regioni neartica e neotropicale, mentre quasi del tutto assenti sono stati, a tutt'oggi, i lanci eseguiti nella regione paleartica. Tra le operazioni più riuscite si possono ricordare i lanci inoculativi e aumentativi di *Compsilura concinnata* (Meig.) (Fusco *et al.*, 1978; Blumenthal *et al.*, 1979) e *Blepharipa pratensis* Meig. (Odell e Godwin, 1984), realizzati in Nord America contro il lepidottero defogliatore di interesse forestale *Lymantria dispar* (L.), introdotto dall'Europa nella seconda metà del XIX secolo. Entrambi i tachinidi sono da tempo stabilmente insediati in Nord America, dove contribuiscono a tenere sotto controllo le popolazioni del lepidottero (Grenier, 1988). Tra i successi, si può inoltre ricordare, per quanto riguarda la regione neotropicale, il caso di *Lixophaga diatraeae*

¹ Per quanto riguarda gli aspetti fondamentali della lotta biologica, si possono consultare alcuni trattati sull'argomento, ad esempio De Bach (1964), DeBach e Rosen (1991), Viggiani (1994).

Townsend, introdotta da Cuba (dove è indigeno) in diverse isole delle Indie Occidentali, nonché in Brasile e in Colombia, per controllare vari lepidotteri dannosi alla canna da zucchero, in primo luogo *Diatraea saccharalis* Boj. Anche grazie a periodiche reintroduzioni, il tachinide si è stabilizzato in diverse aree e svolge un importante ruolo nel contenimento del complesso dei lepidotteri dannosi alla canna da zucchero. Contro tali fitofagi, nella nativa Cuba, *L. diatraeae* viene anche utilizzato per lanci inondativi (Bueno e Van Lenteren, 2002). Grenier (1988) riporta altri casi di successi conseguiti utilizzando i tachinidi per lanci inoculativi e aumentativi contro insetti fitofagi di interesse forestale e agrario, nonché numerosi esempi di insuccessi, alla cui base stava spesso la scarsa conoscenza della biologia, etologia ed ecologia della specie impiegata.

Da alcuni anni a questa parte, sono stati sollevati dei dubbi circa i potenziali rischi collegati all'introduzione in un nuovo ambiente di parassitoidi o predatori esotici, i quali potrebbero entrare in competizione con l'entomofauna autoctona e/o esercitare un'azione di limitazione indesiderata nei confronti di insetti ospiti/prede non bersaglio, o addirittura causare l'estinzione delle stesse specie bersaglio (Howarth, 1997). Tale eventualità avrebbe maggiore probabilità di verificarsi nelle isole (Van Driesche e Hoddle, 1997) Uno dei pochi casi documentati in proposito, anche se controverso, riguarda proprio un tachinide, *Bessa remota* (Aldrich), introdotto con successo nel 1925-26 dalla Malesia nelle Isole Fiji per il controllo del lepidottero zigenide *Levuana iridescens* Bethune-Baker, dannoso alla palma di cocco (Tothill *et al.*, 1930). I risultati sarebbero andati oltre le aspettative, in quanto il tachinide avrebbe causato addirittura l'estinzione del lepidottero nelle Isole Fiji (Howarth, 1997). Altri lavori più recenti hanno comunque messo in dubbio tale ipotesi (Sands, 1997; Kuris, 2003.) Casi come questo (in realtà assai sporadici) non devono comunque scoraggiare la lotta biologica effettuata inoculando in un nuovo ambiente entomofagi esotici (tachinidi e non), ma, piuttosto, suggerire cautele che, in concreto, comportano studi di laboratorio e di campo che consentano (almeno entro certi limiti) di prevedere i potenziali rischi di tale operazione (van Lenteren *et al.*, 2003).

I tachinidi, comunque, presentano delle potenzialità, al momento assai poco indagate, anche per lanci inondativi. E' auspicabile che, in un prossimo futuro, questa famiglia di parassitoidi sia più studiata, anche sotto questo aspetto.

E. larvarum, come è stato detto nella parte introduttiva, annovera tra i suoi ospiti, oltre a *S. littoralis*, numerosi altri lepidotteri di notevole interesse agrario e forestale. Finora, però, se si escludono gli sporadici interventi inoculativi effettuati nel nord degli Stati Uniti (Grimble, 1976; Sabrosky e Reardon, 1976), essa non è mai stata impiegata per applicazioni di lotta biologica. La facilità di allevamento, anche su dieta artificiale, rende tuttavia questo parassitoide assai interessante in campo applicativo, soprattutto in vista di lanci inondativi, per i quali, come è noto, è necessario poter disporre di grandi quantitativi di entomofagi di buona qualità, con costi di produzione contenuti, per non rendere l'operazione troppo dispendiosa. Ovviamente, sono necessarie ricerche approfondite volte a valutare l'efficacia del parassitoide contro le specie bersaglio. La presente tesi costituisce un contributo in quest'ambito. In base ai risultati ottenuti, il parassitoide si è dimostrato più efficace nei confronti di *P. unipuncta* (specie non annoverata tra i suoi ospiti naturali), piuttosto che nei confronti dell'ospite naturale *S. littoralis*. Nel caso di *P. unipuncta*, infatti, si è riscontrata un'elevata mortalità nelle larve sottoposte a parassitizzazione, anche se il parassitoide solo in pochi casi è riuscito a portare a termine con successo il suo sviluppo. Come già detto, l'efficacia di un parassitoide in campo viene di solito valutata in base al numero di insetti bersaglio parassitizzati con successo (Grenier e De Clercq, 2003), ma si dovrebbe tenere conto anche di altri fattori di mortalità dell'ospite correlati all'attività del parassitoide. Ricerche future (di laboratorio e di campo) potranno quindi essere mirate a valutare la capacità di *E. larvarum* di indurre mortalità in altri lepidotteri bersaglio, non necessariamente ospiti naturali, e indipendentemente dalla capacità del parassitoide di svilupparsi con successo in tali ospiti. Maggiori dati sono necessari prima che possa essere consigliata la produzione e la commercializzazione del tachinide da parte delle biofabbriche, ma le prospettive sono interessanti.

BIBLIOGRAFIA

AYVAZ A., KARASU E., KARABORKLU S., TUNCBILEK A., 2008.- Effects of cold storage, rearing temperature, parasitoid age and irradiation on the performance of *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae). - *Journal of Stored Products Research*, 44: 232–240

ARNAUD P. H. Jr., 1978.- A host-parasite catalog of North American Tachinidae (Diptera).- *United States department of Agriculture, Miscellaneous Publications*, 1319: 1-860.

ASSAL O.M., KOILAB M.O., 1984.- Parasites of the cotton leaf-worm, *Spodoptera littoralis* in lower Egypt.- *Minufiya-Journal-of-Agricultural-Research*, 8: 449-462

BALACHOWSKY A. S., 1972.- *Entomologie Appliquee a L'Agriculture*. Tome II. Lepidopteres. Masson ET Cie. 1634 pp.

BEBAS P., CYMBOROWSKI B., GIEBULTOWICZ J.M., 2001. -Circadian rhythm of sperm release in males of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*: in vivo and in vitro study. - *J Insect Physiol*, 47:859-866.

BLUMENTHAL .M., FUSCO R.A., REARDON R.C., 1979.- Augmentative release of two established parasite specie sto suppress populations of the gypsy moth.- *Journal of Economic Entomology*, 72: 281-288.

BONNEMAISON L., 1964. – Enemigos animales de las plantas cultivadas y forestales, vol II. -Vilasarc de Mar : 496 *Oikos-tau* s.a- ediciones.

BOUWMEESTER H.J., VERSTAPPEN F., POSTHUMUS M.A., DICKE M., 1999. - Spider-mite induced (3S)-(E)-nerolidol synthase in cucumber and Lima bean. The first dedicated step in acyclic C₁₁-homoterpene biosynthesis. - *Plant Physiol.*, 121(1): 173–180.

BRATTI A., COULIBALY A.K., 1995. - *In vitro* rearing of *Exorista larvarum* on tissue culture-based diets. - *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 74: 47-53.

BUENO V.H.P., VAN LENTEREN J.C., 2002.-The popularity of augmentative biological control in Latin America: history and state of affairs. International Symposium of Biological Control of Arthropods, West Virginia: 180-184.

BURGIO G., NICOLI, G., 1994.- Cold storage of *Dyglyphus isaea*.- in *Proceedings, 7th Global IOBC Workshop 'Quality Control of mass Reared Arthropods'*, 13-16 September 1993, Rimini, Italy, pp.171-178.

BURKS M. L., NETTLES W. C., 1978. - *Eucelatoria sp.*: effects of cuticular extract from *Heliothis virescens* and other factors on oviposition. - *Environmental Entomology.*, 7: 897-900.

CAMPADELLI G., 1973.- Allevamento di *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera Galleriidae) con dieta semiartificiale. – *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bol.*, 32: 11-25.

CAMPADELLI G., 1986. – Effetti della bassa temperatura sulla coppia oopate-parassita *Galleria mellonella* L. – *Pseudogonia rufifrons* Wied. – *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 41: 29-49.

CAPINERA J.L., 2006. – University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Departement of Entomology and Nematology.

COHEN A.C., 2001.- Formalizing insect rearing and artificial diet technology.- *American Entomologist*, 47: 198-206.

CONSOLI F. L., PARRA J. R. P., 1999. – In vitro rearing of parasitoid: Constraints and perspectives – *Trends in Entomologi*, pp. 19-32.

COUDRON T.H., 2007.- Improving cold storage with dietary changes.- Proceedings of the 11th meeting of the Working Group Arthropod Mass Rearing and Quality Control – 28/10/2007-1/11/2007, Montreal, Canada (curatori: J.C. van Lenteren, P. DeClercq e M.W.Johnson) – *Bulletin IOBC Global* No.3: 34-37

CSOKA G., LESKO K., AMBRUS A., 1989. – Biology and damage of *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae) in Hungary. – *Nonenyvedelem*, 25: 61-65.

DEBACH P., 1964.- Biological Control of Insect Pests and Weeds.- Reinhold Publ. Corp., New York, 844 pp.

DEBACH P., ROSEN D., 1991. - Biological Control by Natural Enemies, 2nd Edition. - Cambridge University Press, Cambridge, 440 pp.

DE CLERCQ, P. DE; DEGHEELE, D., 1993. - Cold storage of the predatory bugs *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus sagitta* (Fabricius) (Heteroptera : Pentatomidae) – *Parasitica* 49: 27-41.

DELRIO G., LUCIANO P., 1983. – I parassiti di *Malacosoma neustria* L. in Sardegna. – *Atti XIII Congr. Naz. It. Ent., Sestriere – Torino*: 237-244

DELRIO G., LUCIANO P., FLORIS I., 1988. – I parassiti di *Tortix viridiana* L. in Sardegna. - *Atti XIII Congr. Naz. It. Ent., L' Aquila*: 407-414.

DE MORAES C.M., LEWIS W.J., PARÉ P.W., ALBORN H.T., TUMLINSON J.H., 1998. - Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. - *Nature*, 393: 570-573.

DICKE M., VAN BEEK T.A., POSTHUMUS M.A., BEN DOM N., VAN BOKHOVEN H., DE GROOT A.E., 1990. - Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. Involvement of host plant in its production. - *J. Chem. Ecol.*, 16(2): 381-396.

DINDO M.L., 1983.- Effetti indotti dai Ditteri Tachinidi nei loro ospiti. Il caso della coppia *Galleria mellonella* L. - *Gonia cinerascens* Rond. - *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 37: 137-155.

DINDO M.L., 1986.- Pupal premature mortality as host mortality factor in the system *Galleria mellonella* L.-*Pseudogonia rufifrons* Wied. (Lep. Galleriidae – Dipt. Tachinidae).- *Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell'Università di Bologna*, 40: 215-220.

DINDO M.L., FARNETI R., SCAPOLATEMPO M., GARDENGHI G., 1999a. – *In vitro* rearing of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) (Diptera: Tachinidae) on meat homogenate-based diets. – *Biological control*, 16: 258-266.

DINDO M.L., SIGHINOLFI L., CAMPADELLI G., BARONIO P., 1999b.- Laboratory Evaluation of Wax Moth and Gypsy Moth Larvae by *Exorista larvarum* (L.) cultured *in vivo* and *in vitro*.- *Boll. Ist. Ent "G. Grandi" Univ. Bologna*, 53 : 109-119.

DINDO M.L., GRENIER S., GUILLAUD J., SIGHINOLFI L., BARONIO P., 2002. – Allevamento in *Exorista larvarum* (L.) (Diptera: Tachinidae): confronto tra parametri biologici e biochimici di parassitoidi ottenuti *in vivo* e *in vitro*. – *Atti XIX Congr. naz. ital. Ent.*, Catania 10-15 giugno 2002: 831-835.

DINDO M.L., MARCHETTI E., GALVAGNI G., BARONIO P., 2003. - Rearing of *Exorista larvarum* (Diptera Tachinidae): simplification of the in vitro technique. - *Bulletin of Insectology*, 56 (2): 253-257

DINDO M.L., GRENIER S., GUILLAUD J., SIGHINOLFI L., BARONIO P., 2004.- Allevamento di *Exorista larvarum* (Diptera, Tachinidae): confronto tra parametri biologici e biochimici dei parassitoidi ottenuti *in vivo* e *in vitro*.- *Atti XIX Congresso Nazionale Italiano di Entomologia* (Catania, 10-15 giugno 2002) pp. 831-835.

DINDO M.L., GRENIER S., SIGHINOLFI L., BARONIO P., 2006.- Biological and biochemical differences between in vitro- and in vivo-reared *Exorista larvarum*.- *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 120: 167-174.

DINDO M.L., MARCHETTI E., BARONIO P., 2007.- *In vitro* rearing of the parasitoid *Exorista larvarum* (Diptera: Tachinidae) from eggs laid out of host.- *Journal of Economic Entomology*, 100 (1): 26-30.

DINDO M.L., 2007.- Rearing the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) (Diptera, Tachinidae) on artificial media.- Proceedings of the 11th meeting of the Working Group Arthropod Mass Rearing and Quality Control – 28/10/2007-1/11/2007, Montreal, Canada (curatori: J.C. van Lenteren, P. DeClercq e M.W.Johnson) – *Bulletin IOBC Global* No.3: 43-46.

DIPPEL C., HILKER M., 1998.- Effects of physical and chemical signals on host foraging behavior of *Drino inconspicua* (Diptera: Tachinidae), a generalist parasitoid.- *Environmental Entomology*, 27: 682-687.

DU Y.J., POPPY G.M., POWELL W., 1996. - Relative importance of semiochemicals from the first and second trophic levels in host foraging behaviour of *Aphidius ervi*. - *J. Chem. Ecol.*, 22(9): 1591-1605.

DU Y.J., POPPY G.M., POWELL W., WADHAMS L.J., 1997. - Chemically mediated associative learning in the host foraging behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). - *J. Insect Behav.*, 10(4): 509-522.

EL-GUINDY, M.A., ABDEL-SATTAR, M.M.; EL-ASSAR, M.R.S., 1978. - Studies on the interaction of the juvenile hormone analogue R-20458 and the organo-phosphorous compound Dursban on the reproductive biology of Matabil - susceptible and resistant strains of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) - 84(4): 424-430.

ELZEN G.W., WILLIAMS H.J., VINSON S.B., 1984.- Role of diet in host selection of *Heliothis virescens* by parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae).- *Journal of Chemical Ecology*, 10: 1535-1541.

ETZEL L.K., LEGNER E.F., 1999.- Culture and colonization.- In: T.S. Bellows T.W. Fisher, L.E. Caltagirone "Handbook of Biological Control: Principles and Applications of Biological Control", Academic Press, London, pp. 103-124.

FEENER D. H., BROWN B. V., 1997. - Diptera as parasitoids. - *Annual Review of Entomology*, 42: 73-79.

FUSCO R.A., RHOADS L.D., BLUMENTHAL M., 1978.- *Compsilura concinnata*: effect of temperature on laboratory propagation.- *Environmental Entomology*, 7: 15-18.

GAUTAM R.D., 1986. – Effect of cold storage on the adult parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Scelionidae: Hymenoptera). - *J. Entomol. Res.* 10: 125-131.

- GODFRAY H.C.J., 1994. Parasitoids. Princeton University Press Princeton NJ.
- GRENIER S., 1988.- Applied biological control with Tachinid flies (Diptera, tachinidae): A review.- *Anz. Schädlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 61: 56-60.
- GRENIER, S., GREANY P. D., CHOEN A. C., 1994. - Potential for mass release of insect parasitoid and predators through development of artificial culture techniques -.In: *Pest Management in the Subtropical Biological Control - A Florida Perspective*. (Rosen D., Bennet F.D and Capinera J.L.). Andover, Intercept Ltd, pp. 181-205.
- GRENIER, S., DE CLERCQ P., 2003. - Comparison of Artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control -.In: *Quality control and production of biological control agents: Theory and testing procedures*. (Van Lenteren J.C.). Cambridge, CABI Publishing, pp. 115-132.
- GRIMBLE D.G., 1976. – Parasite release to suppress gypsy moth and reduce defoliation. – *N.Y. State Univ. Coll. Environ. Sci. fov. Appl. For. Res. Inst. Rep.*, 32: 25.
- GROSS P., 1993. - Insect Behavioral and Morphological Defenses Against Parasitoids - *Annual Review of Entomology*, 38: 251-273.
- GUERRIERI E., PENNACCHIO F., TREMBLAY E., 1993. - Flight behavior of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) in response to plant and host volatiles. - *Eur. J. Entomol.*, 90(9): 415-421.
- GUERRIERI E., DU Y.J., POPPY G.M., POWELL W., PENNACCHIO F., TREMBLAY E., 1996. - The role of host-induced plant synomones on in-flight orientation of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). - *Proceedings XX Congresso Internazionale di Entomologia*. Firenze, Agosto 1996: 647.

GUERRIERI E., PENNACCHIO F., TREMBLAY E., 1997. - Effect of adult experience on in-flight orientation to plant and plant-host complex volatiles in *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae). - *Biol. Control*, 10(3): 159-165.

HAFEZ M., 1953a. - Studies on *Tachina larvarum* L. (Diptera, Tachinidae).I. Preliminary notes. - *Bull. Soc. Fouad. Entomol.*, 37: 255-266.

HAFEZ M., 1953b. - Studies on *Tachina larvarum* L. (Diptera, Tachinidae).II. Morphology of the adult and of its early stages. - *Bull. Soc. Fouad. Entomol.*, 37: 305-335.

HAFEZ M., 1953c. - Studies on *Tachina larvarum* L. (Diptera, Tachinidae).III. Biology and life history. - *Bull. Soc. Fouad. Entomol.*, 37: 305-335.

HAFEZ M., TAWFIK M.F.S., AZAB A.K., IBRAHIM A.A., 1976.- Survey and economic importance of parasites of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.), in Egypt.- *Bulletin-of-the-Entomological-Society-of-Egypt*. 60: 179-189

HERTING B., 1960. - Biologie der Westpalaarktischen Raupenfliegen Dipt. Tach. - *Monogr. Z. Angew. Entom.*, 16:188 pp.

HOKKANEN H., 1983.- The effect of 200 year association of coevolution between the green stink bug, *Nezara viridula* (Hemiptera, Pentatomidae) and the parasite *Trichopoda pennipes* (Diptera, Tachinidae) on the host-parasite relationship.- In: H. Hokkanen "Interspecific homeostasis, pest problems and the principles of classical biological pest control. PhD Thesis, Cornell University, Ithaca, NY, 157 pp.

HOKKANEN H., PIMENTEL D., 1984.- New approach for selecting biological control agents.- *Canadian Entomologist*, 116: 1109-1121.

HOWARTH F.G., 1997. - Environmental impacts of classical biological control. - *Annual Review of Entomology* 36: 485-509.

HSIAO T., HOLDAWAY F. G., CHANG H. C., 1966. - Ecological and physiological adaptations in insect parasitism. - *Entomologia experimentalis et applicata*, 9: 113-123.

ICHIKI R., KAINOH Y., NAKAMURA S., 2007.- The role of olfactory cues in plant foraging by the micro type tachinid, *Pales pavidus*.- *X European Workshop on Insect Parasitoids*, Erice (Sicily) – Italy – September 17-21 2007 – Abstracts, p. 99

ICHIKI R.T., KAINOH Y., KUGIMIYA S., TAKABAYASHI J., NAKAMURA S., 2008. – Attraction to herbivore-induced plant volatiles by the host-foraging parasitoid fly *Exorista japonica*. - *J. Chem. Ecol* 34: 614-621

KARA K., TSCHORSNIG H.P., 2003.- Host catalogue for the Turkish Tachinidae (Diptera). - *Journal of Applied Entomology*, 127: 465-476

KAINOH Y., TANAKA C., NAKAMURA S., 1999. – Odor from herbivore-damaged plant attracts the parasitoid fly *Exorista japonica* Townsend (Diptera: Tachinidae) - *Appl. Entomol.Zool.* 34 (4): 463-467

KURIS A.M., 2003. - Did biological control cause extinction of the coconut moth, *Levuana iridescens*, in Fiji? - *Biological Invasions* 5: 131-141.

LEOPOLD R.A., ROJAS R.R., ATKINSON P.W., 1998. - Post Pupariation Cold Storage of Three Species of Flies: Increasing Chilling Tolerance by Acclimation and Recurrent Recovery Periods. – *Cryobiology* 36: 213-224.

LEOPOLD R.A., 2007.- Colony maintenance and mass rearing: using cold storage technology for extending the shelf life of insects.- in “Area-Wide Control of Insect Pests. From Research to Field Implementation” (a cura di M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson e J. Hendrichs). Springer, Dordrecht, pp. 149-162.

LINDQUIST D.A., ABUSOWA M., HALL M.J.R., 1992. - The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication – *Med & Vet. Entomol.* 6: 2-8.

LÓPEZ C., SANS A., EIZAGUIRRE M., 2000. – Vuelos de la defoliadora de maiz, pastos y céspedes, *Mythimna (Pseudaletia) unipuncta* (Haworth) en la zona de Lleida. - *Bol. San. Veg.* 26: 255-259.

MARCHETTI E., BARONIO P., DINDO M.L., 2008.- *In vitro* rearing of the tachinid parasitoid *Exorista larvarum* with exclusion of the host insect for more than one generation.- *Bulletin of Insectology*, 61 (2): 333-336.

McCALL P.J., TURLINGS T.C.J., LEWIS W.J., TUMLINSON J.H., 1993. - Role of plant volatiles in host location by the specialist parasitoid *Microplitis croceipes* cresson (Braconidae: Hymenoptera). - *J. Insect Behav.*, 6(5): 625-639.

MELLINI E., 1983.- L'ipotesi della dominazione ormonale, esercitata dagli ospiti sui parassitoidi, alla luce delle recenti scoperte nella endocrinologia degli insetti.- *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna*, 38: 135-166.

MELLINI E., 1990.- Sinossi di biologia dei Ditteri Larvevoridi.- *Boll. Ist. Ent. “G. Grandi” Univ. Bologna*, 45: 1-38.

MELLINI E., 1994. – Elementi per un confronto tra il parassitoidismo degli Imenotteri e quello dei Ditteri. – *Bollettino dell' Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell' Università di Bologna*, 49: 41-100.

MELLINI E., GARDENGHI G., COULIBALY A.K., 1993. – Caratteristiche anatomiche ed istologiche dell'apparato genitale femminile di *Exorista larvarum* (L.), parassitoide deponente uova macrotipiche sull'ospite. - *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 48: 45-58.

MELLINI, E., CAMPADELLI, G., DINDO M. L., 1996. – Actual possibilities of mass production of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) (Dipt. Tachinidae) on oligidic diets – *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 51: 37-51.

MELLINI E., CAMPADELLI G., 1995. – Formulas for “inexpensive” artificial diets for the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) - *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 50: 95-106.

MELLINI E., CAMPADELLI G., 1996a. – Analisi del superparassitoidismo di *Exorista larvarum* (L.) nell'ospite di sostituzione *Galleria mellonella* (L.). – *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 51: 1-11.

MELLINI E., CAMPADELLI G., 1996b. – A first overall comparison between the *in vitro* and *in vivo* production of the *Exorista larvarum* (L.). – *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 50: 183-199.

MELLINI E., CAMPADELLI G., 1999. – Allevamento di parassitoidi su diete artificiali: l'apporto dell'istituto di Entomologia “Guido Grandi” dell'Università di Bologna – *Inf.tore Fitopat.*, 1 – 2: 26-34.

MELLINI E., MALAGOLI M., RUGGERI L., 1980. - Substrati artificiali per l'ovideposizione dell'entomoparassita *Gonia cinerascens* Rond. (Diptera Larvevoridae) in cattività. - *Bollettino dell' Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell' Università di Bologna*, 45: 1-38.

MOCHIDA, O., 1973.- Two important insect pests, *Spodoptera litura* (F.) and *S. littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), on various crops-morphological discrimination on the adult, pupal and larval stages.- *Applied Entomology and Zoology*, 8 (4): 205-214.

MONDOR E.B., ROLAND J., 1997. – Host locating behaviour of *Leschenaultia exul* and *Patelloa pachipyga*: two tachinid parasitoids of the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*. - *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 161-168.

MONTEITH L. G., 1956a. - Influence of host and its food plant on host-finding by *Drino bohémica* Mesn. (Diptera Tachinidae) and interaction of other factors. - *Proc. 10th Int. Congr. Ent.*, 2: 603-606.

MONTEITH L. G., 1956b. - Influence of host movement on selection of hosts by *Drino bohémica* Mesn. as determined in an olfactor. - *Can. Ent.*, 88: 583-586.

MONTOYA R., 1970. – First meeting of the Working Party on Integrated Control in Mediterranean Pine Forests. – *Boletín del Servicio de Plagas Forestales*, 13:119-129.

MOREWOOD D. W., WOOD D. M., 2002.- Host utilization by *Exorista thula* Wood (sp. nov.) and *Chetogena gelida* (Coquillett) (Diptera: Tachinidae), parasitoids of arctic *Gynaephora* species (Lepidoptera: Lymantriidae).- *Polar Biology*, 25: 575-582.

NETTLES W. C. Jr., 1979. - *Eucelatoria* sp. females: factors influencing response to cotton and okra plants. - *Environmental Entomology.*, 8: 619-623.

- NETTLES W. C., BURKS M. L., 1975. - A substance from *Heliothis virescens* larvae stimulating larviposition by females of the tachinid, *Archytas marmoratus*. – *Journal of Insect Physiology*, 21: 965-978.
- ODELL T.M., GODWIN P.A., 1984.- Host selection by *Blepharipa pratensis* (Meigen), a tachinid parasite of the gypsy moth, *Lymantria dispar* L.- *J. Chemical Ecology* 10: 311-320.
- PARÉ P.W., TUMLINSON J.H., 1999. - Plant volatiles as a defense against insect herbivores. - *Plant Physiol.*, 121: 325-331.
- PIMENTEL D., 1963.- Introducing parasites and predators to control native pests.- *Canadian Entomologist*, 95: 785-792.
- POLLINI A., 1998. - Manuale di entomologia applicata. Edagricole - Calderini, Italia
- POTTING R.P.J., VET L.E.M., DICKE M., 1995. - Host microhabitat location by stemborer parasitoid *Cotesia flavipes*: the role of herbivore volatiles and locally and systemically induced plant volatiles. - *J. Chem. Ecol.*, 21(5): 525-539.
- POWELL W., PENNACCHIO F., POPPY G.M., TREMBLAY E., 1998. - Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). - *Biol. Control*, 11(2): 104-112.
- PRADOLESI G., BOSELLI M., MELANDRI M., 2005.- *Exorista larvarum* (Linnaeus), un parassitoide gregario.- *Agronomica*, 4: 24-30.
- REIS J., OLIVEIRA L., GARCIA P., 2003.- Effects of the larval diet of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) on the performance of the parasitoid *Glyptapanteles militaris* (Hymenoptera: Braconidae).- *Environmental Entomology*, 32: 180-186.

RICHTER V.A., 1991. – A new tribe, new and little known species of the tachinid flies (Diptera, Tachinidae) of the fauna of the USSR. – *Entomol. Obozr.*, 70 (1): 229-246.

ROLAND J., DENFORD K.E., JIMENEZ L., 1995. – Borneol as an attractant for *Cyzenis albicans*, a tachinid parasitoid of the winter moth, *Operophtera brumata* L. (Lepidoptera: Geometridae). – *Canadian Entomologist* 127 (3): 413-421.

ROTH J. P., KING E. G., THOMPSON A. C., 1978. – Host location behavior by the tachinid, *Lixophaga diatraeae*. – *Environmental Entomology*, 7: 794-798.

SABROSKY C.W., REARDON R.C., 1976. – Tachinid parasites of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, with keys to adults and puparia. – *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, 10 (2):126 pp.

SANDS D.P.A., 1997.- The safety of biological control agents: assessing their impact on beneficial and other non-target hosts. – *Memoirs of the Museum of Victoria* 65: 611-616.

SANNINO L., ESPINOSA B., E CAPONERO A., CORTESE G. 2006. – Attacchi di *Spodoptera littoralis* (Boisduval) alla vite in Puglia e Basilicata. – *Informatore Fitopatologico* (1) 48-50.

SANNINO L., ESPINOSA B., 1999. – Biology of *Maestra brassicae* (Lepidoptera Noctuidae) in Campania (South Italy). – *Boll. Lab. Entomol. agrar. "Filippo Silvestri"*, 55: 79-91

SHI Z.H., LIU S.S., XU W.L. HE J.H., 1993. – Comparative studies on the biological characteristics of geographic/host populations of *Trichogramma dendrolimi* in China III. Responce to temperature and humidity. – *Chin. J. Biol. Cont.* 9: 97-101.

SHOREY H.H., HALE R.L., 1965. - Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. - *J Econ Entomol* 58: 522–524

SIMÕES A.M., DINDO M.L., GRENIER S., 2004.- Development and yields of the tachinid *Exorista larvarum* in three common Noctuidae of Azores Archipelago and in a laboratory host.- *Bulletin of Insectology*, 57 (2): 145-150.

SPRADBERY J.P., 1990. - Australian Screwworm fly manual of operations. – *CSIRO Aust. Div. Entomol. Tech.* 49: 241

STATSOFT INC., 2001. STATISTICA (Data analysis Software System). Version 6. www.statsoft.com

STEINBERG S., DICKE M., VET L.E.M., 1993. - Relative importance of infochemicals from first and second trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. - *J. Chem. Ecol.*, 19(1): 47-59.

STIREMAN J.O. III, 2002.- Host location and selection cues in a generalist tachinid parasitoid.- *Entomologia experimentalis et applicata*, 103: 23-34.

STIREMAN J.O., O'HARA J., WOOD D.M., 2006.- Tachinidae: Evolution, Behavior, and Ecology.- *Annual Review of Entomology*, 51: 525-555.

TANAKA C., KAINOH Y., HONDA H., 1999.- Physical factors in host selection of the parasitoid fly, *Exorista japonica* Townsend.- *Applied Entomology and Zoology*, 34: 91-97.

TAKABAYASHI J., DICKE M., 1996. - Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. - *Trends Plant Sci.*, 1(4): 109-113.

THOMPSON S.N., HAGEN K.S., 1999. - Nutrition of entomophagous insects and other arthropods. - *Handbook of biological control. Academic*, San Diego, CA: 594-652

TOTHILL, J.D., TAYLOR, T.H.C., PAINE, R.W., 1930. - The Coconut Moth in Fiji: a History of its Control by Means of Parasites. - *Imperial Bureau of Entomology*, London.

TUMLINSON J.H., LEWIS W.J., VET L.E.M., 1993. - How parasitic wasps find their hosts. - *Sci. Am.* 268(3): 100-106.

TURLINGS T.C.J., TUMLINSON J.H., LEWIS W.J., 1990. - Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. - *Science*, 250: 1251-1253.

TURLINGS T.C.J., LOUGHRIN J.H., MCCALL P.J., RÖSE U.S.R., LEWIS W.J., TUMLINSON J.H., 1995. - How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(10): 4169-4174.

URRUTIA C., MAURICIO A., WADE M.R., PHILLIPS C.B., WRATTEN S.D., 2007.- Influence of host diet on parasitoid fitness: unravelling the complexity of a temperate pastoral agroecosystem.- *Entomologia experimentalis et applicata*, 123: 63-71.

VAN DRIESCHE R.G., HODDLE M., 1997.- Should arthropod parasitoids and predators be subject to host range testing when used as biological control agents?- *Agriculture and Human Values*, 14:211-226.

VAN LENTEREN J.C. (a cura), 2003.- "Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures" (a cura di J.C. Van Lenteren). CABI Publishing, Cambridge.

VAN LENTEREN J.C., TOMMASINI G., 2003.- Mass production, storage, shipment and release of natural enemies.- in “Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures” (a cura di J.C. Van Lenteren). CABI Publishing, Cambridge, pp. 181-189.

VAN LENTEREN J.C., BABENDRIER D., BIGLER F., BURGIO G., HOKKANEN H.M.T., KUSKE S., LOOMANS A.J.M., MENZLER-HOKKANEN I., VAN RIJN P.C.J., THOMAS M.B., TOMMASINI M.G., ZENG Q.-Q., 2003.- Environmental risk assessment of exotic natural enemies in inundative biological control.- *Biocontrol*, 48: 3-38.

VET L.E.M., DICKE M., 1992. - Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. - *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 141-172.

VIGGIANI G., 1994.- Lotta biologica e integrata nella difesa fitosanitaria. - Volume primo. *Lotta biologica*. Liguori Editore, Napoli: 517 pp.

VINSON S. B., 1976. - Host selection by insect parasitoids. - *Annual Review of Entomology*, 21: 109-133.

WESELOH R.M., 1980.- Host recognition behavior of the tachinid parasitoid, *Compsilura concinnata*.- *Annals of the Entomological Society of America*, 73: 593-601.

Efficacy of the parasitoid *Exorista larvarum* (L.) (Diptera Tachinidae) cultured in captivity: improvement of the rearing techniques, acceptance of the target insect hosts and role played by the host plant on the parasitization process

Extended summary

***EXORISTA LARVARUM* BIOLOGY AND REARING TECHNIQUES: STATE OF THE ART**

E. larvarum is a polyphagous, gregarious larval parasitoid belonging to Exoristinae, which is considered the most primitive sub family of Tachinidae (Richter, 1991). The species is well distributed in Europe, Asia and North America. At the beginning of the 20th century it was introduced into United States from Europe (Herting, 1960). The hosts mostly belong to Lepidoptera and some of them are pests of forest or agricultural interest. In cork oak forests in Sardinia, *E. larvarum* is an important antagonist of different lepidopterous defoliators, including *Lymantria dispar* (L.), *Malacosoma neustria* (L.) (Delrio *et al.*, 1983) and *Tortrix viridana* L. (Delrio *et al.*, 1988). According to Herting (1960), *E. larvarum* is the second more important natural enemy of *L. dispar* in Europe; yet it has been used in biological control programs only in a very few inoculative releases carried out in the North of United States (Grimble, 1976; Sabrosky and Reardon, 1976). This was probably also due to the high production costs. To date, however, *E. larvarum* is the only tachinid which has been cultured on artificial media composed of crude components with adult yields and puparial size comparable to those usually obtained in a living host (Mellini and Campadelli, 1995, 1996b; Dindo *et al.*, 1999). These results allow to hypothesize that, in a near future, this beneficial insect may be mass produced *in vitro* at reasonable costs so as to be utilized in biological control programmes.

The biology of *E. larvarum* is very simple. The females lay unincubated macrotype eggs on the host body. It is quite common that some eggs get detached from the host

integument or are eliminated at host moulting (Mellini *et al.*, 1993; Mellini and Campadelli, 1996a). Parasitization is more likely to be successful if oviposition occurs on newly-moulted larvae of an advanced stage (Hafez, 1953c). The eggs undergo a period of embryonic development (about 3 days at 26-27°C) before hatching. The newly-hatched larvae penetrate the host integument very close to the empty egg shell (Hafez, 1953c).

As all tachinids, *E. larvarum* displays 3 larval endophagous stages. Soon after penetrating the host, the first instar larvae induce the formation of a primary integumental respiratory funnel. The occurrence of a black spot on the host integument around the entrance hole reveals the presence of the parasitoid larva (Fig.1). The development of *E. larvarum* larvae is independent of host physiology and hormonal balance. The parasitoid thus displays simple interactions with the host, which is quickly killed (Mellini and Campadelli, 1996a). The parasitoid larvae usually complete their development in the host larvae, or, sometimes, in the host pupae. Pupation usually occurs outside the host remains. Observations performed during the maintenance of the colony of *E. larvarum* in the laboratory of Entomology of the Department of Agroenvironmental Science and Technology of the University of Bologna have shown that, in the factitious host *Galleria mellonella* (L.), at 26°C the parasitoid development lasts about 16 days (3 days for hatching, 6 days for larval development until pupation and 8 days from puparium formation to adult emergence). Soon after emergence the adults mate (Fig.2) and females start laying eggs after a pre-oviposition period of 2-3 days (Mellini *et al.*, 1993). Adult longevity depends on different factors, including food, temperature and sex. In general, females live longer than males (18 days vs. 21-22 days). Sex-ratio is usually 1:1 (Hafez, 1953c; Dindo *et al.*, 2002, 2004).

In vivo rearing

In the laboratory of Entomology of the Department of Agroenvironmental Science and Technology, *E. larvarum* is reared on the factitious host *Galleria mellonella*. The colony was established in 1992 from adults emerged from larvae and pupae of *Hyphantria cunea*

Drury collected in the province of Forlì-Cesena (Emilia Romagna, Italy) and re-newed in 2004 with adults emerged from *H. cunea* larvae collected in the province of Modena (Emilia Romagna, Italy).

The colony is maintained in a climatic chamber at 25-26°C, 70-80% UR and a 16: 8 L:D photoperiod. The adults are kept in plexiglass cages (40x30x30 cm) (50-70 adults per cage). They are fed on lump sugar and cotton balls soaked in a honey and water solution (20% honey). The standard parasitization procedure is performed by exposing 75-100 mature *G. mellonella* larvae to flies about once a week. The larvae are removed when 3-4 eggs per host larva have been laid (generally after 30-40 min) (Mellini and Campadelli, 1996a). The larvae with eggs are placed in the same climatic chamber, inside a plastic box (24x13x8 cm) until puparium formation. The newly-formed puparia are removed from the box and placed in a plexiglass cage, where the new adults will emerge.

In vitro rearing

The *in vitro* rearing of entomophagous insects (that is directly on an artificial medium or diet, in the absence of host or prey) is an interesting technique from both a scientific and applied point of view. From one side, this methodology may allow to increase knowledge on biology, physiology and nutritional needs of entomophagous insects; from the other side this procedure may facilitate the mass production of parasitoids and predators, should an efficient and economical medium or diet be developed. A number of overviews have been written on this topics (including Grenier et al., 1994; Consoli e Parra, 1999; Thompson e Hagen, 1999; Grenier e De Clercq, 2003).

Several characteristics make *E. larvarum* a particularly suitable parasitoid for *in vitro* rearing, including polyphagy, non-synchronized development with the host, gregariousness, capacity of the larvae to breath atmospheric oxygen from the beginning of their development; the larvae have also shown to be able to grow in media contaminated by moulds, should contamination be limited (Mellini e Campadelli, 1996a; Dindo *et al.*, 2003).

E. larvarum was first reared *in vitro* on a medium composed of bovine serum supplemented with homogenate of *G. mellonella* pupae, yeast extract, trehalose, chicken egg yolk, gentamicin (to prevent bacterial contamination) and agar as a physical support (Mellini et al., 1993). Subsequent research works were aimed at simplifying the medium preparation and deleting host material. The currently used medium (“milk medium”) was developed by Mellini and Campadelli (1995a) and consists of skimmed milk, chicken egg yolk, yeast extract, sucrose and gentamicin. Either agar or absorbent cotton may be used as a physical support (Dindo et al., 2003). On all media (both including and devoid of host components) fecund adults were obtained and yields were comparable or higher than those usually obtained in the host *G. mellonella*.

The quality control of mass produced entomophagous insects is fundamental also when the production is performed by the standard procedure, i.e. at the expenses of a host or prey (van Lenteren, 2003). The evaluation of the quality of the natural enemies reared on artificial media or diets is even more important, because the beneficial insects must be competitive with the *in vivo*-reared ones in terms of biological parameters (including fecundity, longevity, predation and parasitization efficiency evaluated in the laboratory) and, in particular, field performance against of target insects (Thompson and Hagen, 1999; Grenier and De Clercq, 2003).

As regards the quality control of *in vitro* vs. *in vivo*-reared *E. larvarum*, in the laboratory no significant difference in parasitism of the natural host *L. dispar* was found by Dindo *et al.* (1999b). More recently Dindo *et al.* (2006) have shown that longevity was not different between the *in vitro*- and the *in vivo*-reared females. With homogeneous puparial weight of of milk medium- and host-reared females, the former however laid fewer eggs on the factitious host, thus showing a non optimal composition of the artificial medium.

The *in vitro* procedure of *E. larvarum* is usually performed starting from eggs removed from previously superparasitized larvae. In our laboratory colony, although host larvae are available, females oviposit around the cage and the eggs are usually lost. Experiments were carried out to compare the *in vitro* rearing (on the milk medium) from eggs laid out of the host versus those removed from *G. mellonella* larvae. The percentages of hatched

eggs, of puparia and adults did not differ significantly between treatments (Dindo *et al.*, 2007). It was thus demonstrated that, for one generation, *E. larvarum* may be reared *in vitro* with a total exclusion of the host insect. A recent paper has however shown that the quality of the *in vitro*-cultured tachinids decreases over generations, especially if the host is completely excluded from their line of production, i.e. not even used for collecting eggs (Marchetti *et al.*, 2008). Further studies are thus required to improve knowledge on *E. larvarum* nutritional needs and hence make the necessary changes to media to improve the quality of the *in vitro*-reared parasitoids, even over generations.

RESEARCH PURPOSES

The possibility to mass rear *E. larvarum* quite easily both *in vivo* and *in vitro* makes this tachinid an interesting candidate for use in biological control or IPM programs. Researches aimed at improving the parasitoid rearing techniques and knowledge on its biology, interaction with host and potential for use against selected target pest species are thus justified. That being stated, the aims of the present thesis were to study:

- 1) the possibility to make the rearing of *E. larvarum* more flexible, by storing its eggs for a short time;
- 2) host acceptance (and suitability) of two noctuid pests, one of Italian and one of Spanish interest, by *E. larvarum* obtained from the factitious host *G. mellonella*; the host species were *Spodoptera littoralis* (Boisduval) and *Pseudaletia unipuncta* (Haworth)
- 3) the role of the host plant on the parasitization process of *S. littoralis* or *P. unipuncta* by *E. larvarum*.

The researches concerning *P. unipuncta* were carried out at the Department of Agroenvironmental Sciences of the University of Lleida (Spain).

***IN VITRO* REARING OF *EXORISTA LARVARUM*: EFFECT OF SHORT TERM STORAGE AT DIFFERENT TEMPERATURES ON EGG VIABILITY**

As briefly described in the introduction, *E. larvarum* can be reared *in vitro* starting from eggs laid out of host, at least for one generation (Dindo *et al.*, 2007; Marchetti *et al.*, 2008). The possibility to retrieve the eggs laid out of host by placing them on an artificial medium may be very useful for colony augmentation, especially when the host is scarce.

With the aim of making the *in vitro* rearing of this tachinid even more flexible and easy to manage, an experiment was carried out to study the effect of short-term storage at different temperatures on the viability of *E. larvarum* eggs. This experiment represents a first step toward assessing the optimal storage time and temperature conditions for *E. larvarum* eggs. It is well known that temperature is a key factor to successfully store the insects, including entomophages (De Clercq and Degheele, 1993; Burgio and Nicoli, 1994; van Lenteren and Tommasini, 2003; Ayvaz *et al.*, 2008). As regards Tachinidae, Campadelli (1982) showed that the microtype eggs of *Pseudogonia rufifrons* (Wiedemann) (which are released by parasitoid females on the host food) remain viable at +4°C for 60 days. No research on the egg storage at low temperature was until now carried out for any parasitoid which oviposits in or on the host. In the case of *E. larvarum*, such a study is justified by the possibility to retrieve the eggs for parasitoid production by placing them on an artificial medium.

Materials and Methods

Unincubated (0-day-old) eggs were exposed to 5, 10, 15, 20°C for 1, 2, 3, 4, 5 days and then restored at the standard rearing temperature of 26°C. During storage, all eggs were maintained at 60-70% RH and L0:D24 photoperiod, as in the standard *in vitro* rearing conditions of *E. larvarum*. For each temperature and storage time, 16 eggs were tested (with a total of 80 eggs per temperature). The selected storage temperatures were two below and two above the limit of 13.4°C at which *E. larvarum* has proven to be able to

develop in a natural host, though very slowly (Hafez, 1953c). It has also been taken into account that insects are usually stored at temperatures between 4 and 15°C (van Lenteren and Tommasini, 2003). Control eggs (=160) were maintained at 26°C.

The eggs were removed from *G. mellonella* by the methods described by Dindo *et al.* (2007) and placed in plastic Petri dishes containing agar jelly (6% agar).

Egg viability was evaluated in terms of their capability to hatch, as shown in the results.

Results

The results are presented in Chapter 2, Tables 1-10 and in Graphic 1.

The eggs stored for 5 days at 15°C and 20°C hatched at the same rate as the control eggs, which were always kept at 26°C. For the eggs stored at 5 and 10°C for 3-5 days, the hatchability was dramatically lower compared to controls. These temperatures therefore proved to be unsuitable for the storage of *E. larvarum* eggs.

Discussion

Mass production of entomophagous insects for commercial purposes requires proper storage methods and facilities to be able to meet the requirements of clients at any time. Also in the case of small experimental colonies it is very important the availability of a reserve supply of entomophages to overcome discontinuity problems (Leopold, 2007).

The results obtained in the present study open a new perspective about parasitoid storage, i.e.. to store the eggs at low temperature and to retrieve them for parasitoid production by placing on artificial medium. *E. larvarum* is a good model for these kinds of experiments, because suitable media for its *in vitro* culture have already been developed. The results showed that *E. larvarum* eggs may be stored at 15 and 20°C for 5 days and maintain the same hatching capability as the control eggs, once they have been placed again at the standard temperature of 26°C. On the opposite, the temperatures of 5 and 10°C are not suitable for storage. It has to be noted that both of the latter temperatures are lower than 13,4°C, the limit temperature at which *E. larvarum* has proven to be able to develop in a natural host (Hafez, 1953c).

Next step will be to rear *E. larvarum* on artificial medium starting from eggs stored at 15°C or 20°C for 5 days and to evaluate the quality of the adults obtained from these eggs. However, for the quality control of the entomophagous insects reared in captivity, the criteria mainly depend on the purposes for which the insects have been produced (Grenier and De Clercq, 2003). Egg storage and, in general, *in vitro* rearing may be very useful techniques for supporting and increasing the mass rearing of the entomophages, but cannot be considered as fully alternatives to the *in vivo* culture. In this view, a possible decrease of the quality of the parasitoids obtained *in vitro* starting from stored eggs might be considered acceptable, should it be slight.

The possibility to store *E. larvarum* eggs laid out of host will be also tested in future studies as well as the effects of a longer storage on the egg viability.

ACCEPTANCE AND SUITABILITY OF TWO LEPIDOPTEROUS SPECIES, *SPODOPTERA LITTORALIS* (BOISDUVAL) AND *PSEUDALETIA UNIPUNCTA* (HAWORTH) (NOCTUIDAE) BY THE PARASITOID *EXORISTA LARVARUM* (L.)

Acceptance is the third step of the host selection process by parasitoids and, similarly to the first two (host habitat location and host location), is primarily affected by chemical factors. Also physical factors (host shape, color, size and movement) may however be very important for acceptance (Vinson, 1976). The chemical stimuli were divided by Godfray (1994) in three categories: a) cues derived from the habitat of the host or from the plant which it feeds on b) odours associated with host activity (for example, the smells of its faeces); c) host semiochemicals acting as kairomones. The latter signals are more reliable, but, usually, may be perceived by parasitoid only at a short distance and are therefore those that most affect acceptance. As other aspects of parasitism, also acceptance has been especially studied for hymenopteran parasitoids. Hymenopteran and tachinid parasitoids do show some commonality with respect to host selection, but differences exist between the two groups. In particular, many tachinids have a relatively wide host range and use more general and may be less reliable cues than most

hymenopterans (Stireman, 2002). The differences between the modes of parasitoidism by Hymenoptera and Diptera (especially Tachinidae) have been widely discussed by Mellini (1976, 1994).

In all parasitoids, how the host is parasitized widely influences acceptance. In many Tachinidae the females lay eggs in the host environment or food and are thus directly involved in host habitat location, but not in host location and acceptance. In most species, however, the female flies directly oviposit their eggs on (or sometimes in) the host body. Also *E. larvarum* lays its eggs on the host cuticle. For these species host location and acceptance depends on the female, which responds to chemical and physical stimuli (Mellini, 1990), that are not always well known (Stireman, 2006).

Host suitability is also an important step of the parasitization process. Factors involved in this step have been widely discussed by Vinson and Iwantsch (1980).

The experiments below described were aimed at investigating some aspects of host acceptance and/or suitability of *Spodoptera littoralis* and *Pseudaletia unipuncta* by *E. larvarum* so as to start evaluating the potential of this tachinid as a biological control agent against these two noctuid pests.

Acceptance and suitability of *Spodoptera littoralis*

Spodoptera littoralis is widespread in the African and Sub-Mediterranean region (www.eppo.org accessed 10/12/2008). In Italy, until a few decades ago it was recorded as a pest only in Sicily, in other regions it was occasionally present, with a few attacks in greenhouse in northern Italy. From the beginning of the 90s, the species has become responsible for more serious damage to different crops (both in greenhouse and open field) in other parts of central and southern Italy (Sannino and Espinosa, 1999). This herbivore pest is widely polyphagous and attacks several horticultural plants (artichoke, cabbage, lettuce, green beans, eggplant, pepper, etc..) strawberry and some ornamental plants. Due to the high number of host plants, *S. littoralis* may virtually cause damage to all horticultural crops. The species is included in the EPPO A2 List of pests

recommended for regulation. According to the EPPO website (http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Spodoptera_litura/PRODLI_ds.pdf, accessed 10/12/2008) *S. littoralis* females lay 1000-2000 eggs in egg masses of 100-300 on the lower leaf surface of the host plant. Fecundity is adversely affected by high temperature and low humidity (Pollini, 1998). The eggs hatch in about 4 days in warm conditions, or up to 11-12 days in winter. The larvae pass through six instars in 15-23 days at 25-26°C. . The young larvae (first to third instar) feed in groups, leaving the opposite epidermis of the leaf intact. Later, the (4th to 6th instar) larvae disperse and spend the day in the ground under the host plant, feeding at night and early in the morning. The pupal period is spent in earthen cells in the soil and lasts about 11-13 days at 25°C. Longevity of adults is about 4-10 days, being reduced by high temperature and low humidity. Thus, the life cycle can be completed in about 5 weeks. The number of generations is widely influenced by the environmental conditions (Pollini, 1998). The data reported here on the biological cycle were confirmed by the observations made in our stock colony.

Materials and Methods

The trials were conducted at DiSTA, University of Bologna.

A colony of *S. littoralis* was started from egg masses collected in the field in the province of Latina (Lazio, central Italy) by Alberto Lanzoni et al. in spring 2006. The colony was maintained on bean plants (*Phaseolus vulgaris* “Borlotto Firetongue”) in a rearing chamber at 25 ± 1 ° C, $65 \pm 5\%$ RH and 16 L: 8 D photoperiod. The experiment was carried out in the same rearing chamber.

For the experiment 80 four-fifth instar larvae were placed singly in plastic cylinders (10cm x 10cm Ø) and daily supplied with fresh bean leaves. Soon after moulting the larvae were exposed to *E. larvarum* naive females. The larvae were removed from the cage as soon as 4-6 eggs per larva had been laid (Dindo *et al.*, 1999). The larvae with eggs were then removed from the cage, placed again in their cylinders and daily observed to detect death, or moulting (with parasitoid egg losses as a consequence), or pupation, or

E. larvarum puparium formation. The experiment was conducted under the same conditions, on 80 larvae of *G. mellonella* maintained as controls.

Host acceptance was evaluated in terms of the time necessary to obtain the oviposition of 4-6 *E. larvarum* eggs on *S. littoralis* vs. *G. mellonella* larvae. Host suitability was evaluated in terms of number and percentage of larvae which were successfully parasitized (i.e. which gave puparia).

Results

The time required for the deposition of 4-6 eggs on each larva was equal to 5.23 ± 3.8 min (mean \pm SD) for *S. littoralis* and 4.08 ± 2.7 min (mean \pm SD) for *G. mellonella*. For *E. larvarum* more time was thus necessary to oviposit on *S. littoralis* than on *G. mellonella*. The difference was not significant, but P was equal to 0.0614 (N = 160, H = 3.5). In the case of *S. littoralis* only one of the death larvae produced a single puparium of *E. larvarum*, while 100% of *G. mellonella* death larvae were successfully parasitized. The results for total mortality (i.e. due to any cause) of the two host species following oviposition by *E. larvarum* are illustrated in Chapter 3 Table 1. In *S. littoralis* mortality was significantly lower than in *Galleria*.

Acceptance and suitability of *Pseudaletia unipuncta*

Pseudaletia unipuncta (“armyworm”) is a noctuid of north American origin, also known as *Mhytimna unipuncta*. In Europe, it is widespread (www.faunaeur.org), but damage to plants were negligible until 1950, when strong attacks were described in southern France (Balachowsky, 1972).

The larvae are polyphagous and mainly attack Gramineae, especially maize, but also rice, oats, wheat, sorghum, rye, barley, sugar cane (Capinera, 2006). They can also attack horticultural plants such as beans, peas, lettuce, rape, onion, bell pepper, cucumber, celery, artichokes, beans, carrot and sweet potato (Bonnemaison, 1964).

They can consume almost all the green parts of the plant and are particularly voracious from the third larval age onwards. *P. unipuncta* is a migratory species (Balachowsky,

1972). Females lay up to 1,500 eggs in groups of 100-150. The eggs hatch in about 4 days or up to 8-10 days in spring, depending on climatic conditions. The young larvae initially feed on a leaf epidermis, then devour leaf portions from the edge and penetrate the ears, damaging the kernels in the process of maturation. The larva passes through 5-9 instars, then pupates in the ground. The pupal period lasts 7-14 days in summer (Balachowsky, 1972). In both Italy and Spain the species completes 3-4 generations per year; in particular, in Catalonia it completes 4 generations (Lopez et al., 2000). The armyworm overwinters as young or mature larva in the ground. The complete life cycle may last 30-40 days (Pollini, 1998).

Materials and Methods

The tests were entirely carried out in the laboratories of IRTA of Lleida (Spain) between October 2007 and June 2008. The colony of *P. unipuncta* was established starting from adults collected with light traps in the experimental fields of the University of Lleida. The colony was maintained in a climatic chamber at $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, 70% RH and 16 L: 8 D photoperiod. The experiment was carried out at the same conditions. The adults were placed in plexiglass cages (cm 60x50x60) and fed with a solution of water and sucrose (5% sucrose). As oviposition substrate 2-3 maize plants (40-50 cm high) were placed in the cage. The newly-hatched larvae were removed from the adult cage, placed singly in plastic cylinders to avoid cannibalism and fed on an artificial diet based on that developed by Shorey & Hale (1965). For the experiment, some larvae were reared on maize leaves.

The experiment was carried out with 40 fourth-instar larvae fed on artificial diet and 40 fourth-instar larvae fed on maize leaves. All larvae were exposed to *E. larvarum* females and removed when 4 to 6 eggs per larva had been laid (Dindo et al. 1999). Forty larvae were not exposed to *E. larvarum*, fed on both artificial diet and maize plant and maintained as control. The larvae with eggs were placed again in their cylinders and maintained in the rearing cell.

In all treatments included controls, the percentage of dead larvae vs. those which reached the pupal stage and emerged as adults was calculated. For the larvae exposed to parasitoids, host suitability was evaluated in terms of number and percentage of dead larvae which were successfully parasitized (i.e. which gave puparia).

Results

Regardless of the type of food, mortality was significantly higher for *P. unipuncta* larvae on which *E. larvarum* eggs were laid, compared to control larvae (Table 3.2). Larval food did not significantly affect mortality (Table 3.3). A few larvae however produced puparia (Table 3.4). Five of the seven puparia obtained from diet-fed larvae let a parasitoid adult emerge. No adults emerged from the 2 puparia formed in plant-fed larvae.

Discussion of the results and conclusions

E. larvarum has shown little effectiveness as a biological control agent of *S. littoralis*, one of its natural hosts (Koilar Assal, 1984). On the basis on the time required for oviposition, acceptance of *S. littoralis* larvae was not significantly different compared to the factitious host *G. mellonella*. The female flies however took more than 1 minute more to lay eggs on *S. littoralis* than on *G. mellonella* larvae. Even accepted, in this test *S. littoralis* proved to be unsuitable for the parasitoid, as only one puparium was obtained from 80 larvae exposed to flies. The results suggest that *E. larvarum*, maintained for years at the expense of a factitious host, may have lost much of the capability to successfully parasitize one of the natural hosts. At present, however, it is not to be discarded the hypothesis according to which, in the old host-parasitoid associations (such as *S. littoralis*-*E. larvarum*), a balance occur, so that the victim develops a sort of resistance towards the antagonist (Pimentel, 1963; Hokkanen and Pimentel, 1984).

This result reflects, in a more evident way the findings of Dindo et al. (1999b), concerning parasitism of the natural host *Lymantria dispar* by *E. larvarum*.

P. unipuncta is not recorded as a natural host of *E. larvarum*. Arnaud (1978) however mentions this noctuid species among the natural hosts of the nearctic tachinid *Exorista*

mella Walker. *E. mella* is very similar to *E. larvarum* and hybrids between the two species exists as well as specimens that cannot be attributed with certainty to either species (Morewood and Wood, 2002). In this study, *P. unipuncta* has however proved to be poorly suitable for the development of *E. larvarum*, regardless of the food supplied to the larvae (artificial diet or maize leaves). A number of studies has shown that host food may, to a greater or lesser extent, have an effect on the parasitoid (Elzen et al., 1984; Rei al., 2003). In other host-parasitoid systems, however, host nutrition proved to be irrelevant for parasitoid development (Urrutia et al., 2007).

It should be emphasized that, in *P. unipuncta* larvae on which *E. larvarum* females laid eggs, mortality was significantly higher than in control (unparasitized) larvae, although a few parasitoids have successfully completed their development. In conclusion, *E. larvarum* could effectively contribute to lower the population of *P. unipuncta*, even if parasitization is successfully completed only in a few cases.

ROLE OF THE HOST PLANT IN THE PARASITIZATION PROCESS OF TWO NOCTUID MOTHS BY EXORISTA LARVARUM (L.)

Olfactory cues play a major role in the host finding behavior of parasitoids (Godfray 1994). Many parasitoids can locate their hosts using mixtures of volatiles released by plants damaged by phytophagous insects (Turlings et al., 1995, De Moraes et al., 1998). These plant compounds may thus represent an indirect mechanism of defense as, among other things, they may attract predators and parasitoids of herbivore pests (Takabayashi and Dicke, 1996; Tumlinson et al., 1993). The ability of entomophagous insects to distinguish between chemical cues released by plants damaged by insects and other cues indicates that herbivore-induced plant volatiles may be distinguishable from those released by plants in response to other types of damage (such as a mechanical damage), or those released by undamaged plants. Visual stimuli also play a role in host searching behavior by parasitoids, especially in the case of Tachinidae (Stireman, 2002). The mechanisms of host selection in Tachinidae, including the role of host plant, however remain largely unknown, as a few studies have been performed on these topics with regard to these parasitoids. In particular, the chemical attractant of only one of the species of tachinid flies *Cyzenis albicans* (Fallen), a parasitoid of the winter moth *Operophtera brumata* L., has been identified (Roland et al., 1995). Recently, in tests performed in a wind tunnel, *Exorista japonica* Townsend, a polyphagous gregarious larval parasitoid of Lepidoptera, was found to be more attracted to plants infested with larvae of the noctuid moth *Mythimna separata* (Walker), compared to artificially damaged and undamaged plants (Ichiki et al., 2008).

The experiments below described were aimed at starting investigating the response of *Exorista larvarum* to plants infested with larvae of two noctuid moths (*Spodoptera littoralis* or *Pseudaletia unipuncta*). The tests were respectively conducted in a climatic chamber (for *S. littoralis*) and in a wind tunnel (for *P. unipuncta*).

E. larvarum – *S. littoralis*

Materials and Methods

The tests were conducted at DISTA, University of Bologna, in a climatic chamber at $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ $65 \pm 5\%$ RH and 16 L: 8 D photoperiod. Inexperienced *E. larvarum* females (n=40) were placed individually in a Plexiglas cage with three targets: 1) one larva of *S. littoralis*, 2) one larva of *G. mellonella*, 3) one larva of *S. littoralis* in the act of feeding on a leaf of a bean plant. Each female was tested only once. The results were evaluated in terms of 1) female choice (i.e. on which target host each female laid at least one egg) 2) time (in min) to make the choice.

Results

Targets 1 (*S.littoralis* larvae) and 2 (*G. mellonella* larvae) were chosen, respectively, by 37.5% and 50% females. Although more females chose *G. mellonella* than *S. littoralis* larvae, the difference between the two targets was not significant (Table 4.1) Only 12.5% females chose target 3 (larvae of *S. littoralis* in the act of feeding on a leaf of a bean plant). The time to make the choice was (mean \pm ds) 10.4 ± 3 min for target 3 (n = 5), 6 ± 3.48 min for target 1 and 6.05 ± 3.04 min for target 2. The time referred to target 3 was significantly longer than the other two times (one-way ANOVA, $F_{2,37} = 4.63$ $P < 0.05$).

E. larvarum – *P. unipuncta*

Materials and Methods

The tests were conducted at the Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal of the University of Lleida (Spain) in a wind tunnel. The wind tunnel was 50-cm high x 50 cm wide and 2 m long. Air was drawn through the tunnel at 30 cm/s (Ichiki et al., 2008) (Chapter 4 Figure 1) Seven odour sources (= targets) were individually tested. As illustrated in Table 4.2, the odour sources were the following: 1) five *P. unipuncta* larvae;

2) intact maize leaves, 3) maize leaves damaged by *P. unipuncta* larvae; 4) artificially damaged leaves; 5) five larvae of *P. unipuncta* in the act of feeding on a maize leaf; 6) intact leaves treated with saliva of *P. unipuncta* larvae; 7) five larvae of *P. unipuncta* in the act of feeding on a maize leaf and intact leaves. For each target, 40 inexperienced *E. larvarum* females were tested (using a total of 280 females). The test was conducted according to the methods described by Ichiki et al. (2008). The results were evaluated in terms of number and percentages of females which landed on each target within 10 min after having taken off. The data were analysed using a 7x2 contingency table and, furthermore, using 2x2 contingency tables.

Results

The results are shown in Graphic 4.1. The more attractive targets were those where the plant was combined with *P. unipuncta* larvae. The females however poorly responded to the leaves treated with larval saliva. A higher proportion of females landed on target 5 (larvae of *P. unipuncta* in the act of feeding on a maize leaf) and 7 (larvae of *P. unipuncta* in the act of feeding on a maize leaf and intact leaves).

Discussion and conclusions

The results of the test conducted to investigate the role of the host plant on parasitism of *S. littoralis* by *E. larvarum* indicate that the bean leaf has decreased, instead of increasing, the attractiveness of the larvae towards the noctuid larvae. These results may support the hypothesis that, for tachinids, the visual stimuli play an important role in host location. The noctuid larvae on bean leaves may have not been perceived by *E. larvarum* females because of their colour. It has to be noted that the test was performed in a small environment (the Plexiglas cage). Visual cues may have more influence than olfactory cues in attracting tachinid females in such environments. This aspect certainly deserves further research. It should also be noted that, even in a non-significant way, *S. littoralis* was chosen to a lesser extent (and in a slightly longer time) than *G. mellonella*.

This results reflects the findings of the tests on host acceptance and suitability: a greater capacity by *E. larvarum* to parasitize the factitious than the natural host.

As for *P. unipuncta*, the results show that the most attractive targets were those where the plant was combined with *P. unipuncta* larvae. The females poorly responded to the leaves treated with larval saliva, possibly because of the excessive power of the olfactory cues. The greatest attraction was expressed by targets 5 and 7, respectively consisting of larvae on leaves and larvae on leaves + intact leaves (the latter was the most attractive target). A hypothesis for this phenomenon could be that at some distance females were more attracted by olfactory stimuli (produced by the larvae and by the leaves) while at a shorter distance they oriented visually, following, in particular the movements of larvae. These aspects deserve further study, also considering that, until now, the mechanisms that regulate the process of host location by the tachinids is not well-known not yet fully known (Stireman, 2002). This work offers a contribution to the knowledge of these issues.

DEFENSIVE BEHAVIOR OF DIFFERENT LEPIDOPTEROUS LARVAE AGAINST THE ATTACK OF *EXORISTA LARVARUM*

According to Gross (1993) and Godfray (1994) the lines of defense that lepidopterous larvae show against parasitoid attack may be divided into three classes: (1) host characteristics that reduce the probability of being found and achieved by natural enemies, such as colours, behaviour and morphology (2) defensive behavior shown by the larvae following the attack of parasitoid females (i.e. aggressive reactions such as biting, moving, regurgitating food); (3) physiological responses that stop the parasitoid development.

I describe here the observations performed in the laboratory about the defensive behaviour (class 2 sensu Gross, 1993) of the larvae of 5 different lepidopterous species against the attack of *Exorista larvarum*. The lepidopterous species were *Galleria mellonella*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera littoralis*, *Hyphantria cunea* and *Pseudaletia unipuncta*. *G. mellonella*

and *P. unipuncta* are factitious hosts of *E. larvarum*, but the former is well-suitable and the latter poorly suitable for the parasitoid (as shown in other chapter of the thesis). *S. littoralis*, *O. nubilalis* and *H. cunea* are known as natural hosts of *E. larvarum*. The larval behaviour has been video-recorded.

G. mellonella larvae did not react to parasitoid attack and none of them showed a defensive behaviour against *E. larvarum*. *O. nubilalis* larvae showed a weak reaction (rapid movements) only when oviposition occurred on their head. On the opposite, *S. littoralis* larvae showed a more aggressive behaviour compared to the other species; they always reacted violently, trying to bite the tachinid females and in some cases even attacking them directly. The larvae moved their head, wriggled and also regurgitated liquids. In several cases, the larvae turned their head towards the point of contact between their body and the parasitoid egg. When the egg could be reached by the mandibles, the larva succeeded in locating and devouring it. Similar behaviors has been reported for other noctuid larvae following the attack of Tachinidae (Mellini, 1990). Also *H. cunea* showed a defensive behaviour against the parasitoid attack. Every time the female approached the larva and touched its hair, the host larva reacted by turning its head towards the tachinid and moving it rhythmically. The movement continued for several minutes even after the parasitoid had been removed. Finally *P. unipuncta* has always responded to *E. larvarum* attacks, trying to bite the females. The larvae moved their heads quickly turning them on their body and even regurgitated liquids. In no case, the eggs was located and eliminated with the mandibles, as it was observed for *S. littoralis*.