

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

in
Entomologia Agraria

Ciclo: XXII

Settore scientifico disciplinare di afferenza: AGR/11

**STUDIO DELLE COMUNICAZIONI INTRASPECIFICHE
IN *ANARSIA LINEATELLA* ZELLER**

Dottoranda

DOTT.SSA MANUELA CIGOLINI

Coordinatore Dottorato

PROF. PIERO BARONIO

Relatori

PROF. FABIO MOLINARI

DOTT.SSA MARIA LUISA DINDO

Esame finale anno 2010

SOMMARIO

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	III
CAPITOLO I.	1
INTRODUZIONE	2
1. <i>ANARSIA LINEATELLA</i> ZELLER	3
GLI ADULTI	4
LE UOVA	6
LE LARVE	7
LE CRISALIDI	8
BIOLOGIA	8
DANNI	10
1.1. FEROMONI E COMUNICAZIONE TRA GLI INSETTI	11
1.1.A DISPERSIONE DEI FEROMONI SESSUALI NELL'AMBIENTE	14
1.1.B IL FEROMONE SESSUALE DI <i>ANARSIA LINEATELLA</i>	16
OBIETTIVI GENERALI	18
CAPITOLO II.	20
2. L'ALLEVAMENTO DI <i>ANARSIA LINEATELLA</i>	21
PREMESSA	21
GLI AMBIENTI DI ALLEVAMENTO	22
LE LARVE	24
LE CRISALIDI	27
GLI ADULTI	27
LE UOVA	30
CAPITOLO III.	33
3. STUDI SUL COMPORTAMENTO RIPRODUTTIVO DI <i>A. LINEATELLA</i> ZELLER	34
PREMESSA	34
SCOPO DEL LAVORO	35
3.1. VALUTAZIONE DELL'ATTRATTIVITÀ DELLE FEMMINE DI <i>A. LINEATELLA</i> E DEL FEROMONE SESSUALE DI SINTESI	36
3.2. EFFETTO DELL'ETÀ DI ACCOPPIAMENTO SULLA FECONDITÀ	47
3.3. VALUTAZIONE DEGLI ACCOPPIAMENTI CON LA TECNICA DELLA DISSEZIONE	53

CAPITOLO IV.	57
4. STUDIO SULL'EFFICACIA DEL METODO DELLA CONFUSIONE SESSUALE CON L'UTILIZZO DI DIFFERENTI MISCELE FEROMONI CHE DI SINTESI	58
PREMESSA	58
SCOPO DEL LAVORO	59
4.1. PROVE CON L'UTILIZZO DI MISCELE CONTENENTI DIFFERENTI PERCENTUALI DI ALCOL	60
4.2. PROVE CON MISCELE FEROMONICHE DIFFERENTI E DENSITÀ DIVERSE DI POPOLAZIONE	70
CAPITOLO V.	77
5. VERIFICA IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI MISCELE FEROMONICHE DI SINTESI PER LA LOTTA CONTRO <i>A. LINEATELLA</i> E <i>C. MOLESTA</i>	78
PREMESSA	78
SCOPO DEL LAVORO	79
5.1. VERIFICA IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI EROGATORI COMMERCIALI E SPERIMENTALI PER LA CONFUSIONE SESSUALE DI <i>ANARSIA LINEATELLA</i> E <i>CYDIA MOLESTA</i> E DI UN DISPENSER SPERIMENTALE PER LA CONFUSIONE SESSUALE DI ENRAMBE LE SPECIE	80
CAPITOLO VI.	91
6. MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI PROVA PER LA VALUTAZIONE DEGLI ACCOPPIAMENTI IN CAMPO	92
PREMESSA	92
SCOPO DEL LAVORO	93
6.1. BIOSAGGI DI LABORATORIO	94
6.2. PROVE DI CAMPO	97
CONCLUSIONI GENERALI	110
BIBLIOGRAFIA	113

RIASSUNTO

Sebbene *Anarsia lineatella* sia un fitofago ormai da anni introdotto e diffuso in Italia, ancora poco si conosce circa le sue abitudini riproduttive. In considerazione della elevata dannosità di *A. lineatella* nei pescheti del nord Italia e delle scarse conoscenze sulla sua biologia, si è evidenziata la necessità di approfondire la conoscenza di questo fitofago.

Pertanto gli scopi di questa ricerca hanno riguardato l'approfondimento delle conoscenze sui sistemi di comunicazione intraspecifici utilizzati da *A. lineatella*; la valutazione dell'efficacia di diverse miscele di feromone sintetico, in laboratorio utilizzando anche densità diverse di popolazioni di anarsia e in campo utilizzando gabbie di accoppiamento appositamente costruite, posizionate in frutteti a conduzione biologica nel nord Italia e messe a confronto con gabbie che utilizzavano come fonte attrattiva femmine vergini di tre giorni di età.

Sono state condotte prove sul comportamento di maschi di *A. lineatella* di differenti età in risposta al feromone emesso da femmine vergini di tre giorni di età e al feromone emesso da erogatori di materiale plastico contenenti differenti miscele di feromone sintetico.

Sono stati condotti studi per verificare l'influenza del contenuto di alcol ((*E*)5-10:OH) nella miscela feromonica sulla capacità di inibizione degli accoppiamenti, sottoponendo gli insetti a differenti concentrazioni di feromone in modo da verificare eventuali differenze di attività delle diverse miscele, differenze che emergerebbero con evidenza maggiore alle minori concentrazioni.

Alcune prove sono state effettuate anche con differenti densità di popolazione, poiché una maggiore densità di popolazione determina una maggiore probabilità di accoppiamento, evidenziando più chiaramente i limiti di efficacia della miscela utilizzata.

Inoltre sono state effettuate prove di campo per confrontare due modelli di erogatore per la confusione sessuale di anarsia contenenti miscele con differenti percentuali di alcol

Inoltre, poiché nei pescheti la presenza di *A. lineatella* è pressoché sempre associata a quella di *Cydia molesta* e l'applicazione del metodo della confusione deve spesso essere applicato per controllare entrambi gli insetti, può risultare vantaggioso disporre di un unico erogatore contenente entrambi i feromoni; è stato quindi valutato un erogatore contenente una miscela dei due feromoni per verificare eventuali interazioni che possano ridurre l'efficacia.

ABSTRACT

STUDY OF INTRASPECIFIC COMMUNICATION IN *ANARSIA LINEATELLA* ZELLER

Although *Anarsia lineatella* is a pest introduced and spread in Italy since many years, little is known about its reproductive behaviour. Considering that *A. lineatella* causes high damage in northern Italy peach orchards and there is insufficient knowledge on its biology, the need to deepen the knowledge of this pest has emerged.

This research has focused on: the study of intraspecific communication systems used by *A. lineatella*; the evaluation of the effectiveness of different blends of synthetic pheromone also in the presence of different population densities of anarsia; the evaluation of the effectiveness of different blends of synthetic pheromone using mating cages placed in organic orchards in northern Italy.

Bioassays were carried out on the behaviour of *A. lineatella* males of different ages in response to the pheromone emitted by three days old virgin females and to the pheromone emitted by plastic dispensers containing different mixtures of synthetic pheromone. Studies were conducted using some blends with different alcohol content ((E)5-10:OH) in order to evaluate their ability in disrupting the mating.

Some bioassays were also carried out with different densities of population, since a greater population density leads to higher probability of mating, to show clearly the efficacy of the mixtures. Field tests were also carried out to compare two mating disruption dispenser models containing mixtures with different percentages of

alcohol (for *A. lineatella*). Since the presence of *A. lineatella* is often associated with that of *Cydia molesta*, the application of a single pheromone dispenser for both insects, could be convenient, ensuring that the simultaneous presence of two pheromones does not result in interactions that reduce their effectiveness.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

Anarsia lineatella è un importante insetto dannoso negli impianti di mandorlo, pesco ed altre drupacee; è diffuso nell'Europa temperata, in particolare nella zona circummediterranea, nel Nord Africa, nel Vicino Oriente, nel Nord America e in Australia (Bailey, 1948; Summers *et al.*, 1959; Dickler, 1982; Pollini, 1998). In Italia, *A. lineatella* è presente in numerose aree, prevalentemente in quelle con clima più mite, quali quelle pedocollinari e quelle vicine al mare; compie tre generazioni. In California può arrivare a produrre quattro generazioni l'anno (Hathaway *et al.*, 1985).

Le infestazioni di *A. lineatella* sono sempre state contenute grazie ad una combinazione di trattamenti insetticidi, ad esempio all'inizio della primavera, gli attacchi sulle giovani piantine e su quelle innestate venivano contenuti effettuando trattamenti dopo la fioritura con prodotti quali *acefate* e *metamidofos*, contemporaneamente attivi anche nella lotta contro gli afidi oppure per i trattamenti in prossimità della raccolta venivano utilizzati prodotti come *carbaril*, *triclorfon* e *diazinone*. Negli ultimi anni lo sviluppo di resistenze agli insetticidi riportata ormai da molti autori (Summers *et al.*, 1959) unita alle continue limitazioni nell'uso di pesticidi ha creato la necessità di trovare con una certa urgenza strategie di lotta alternative.

Le strategie di difesa dagli attacchi di anarsia nei frutteti hanno sempre evidenziato delle difficoltà anche causa dell'introduzione accidentale del fitofago *Cydia molesta* (Busck), che con le sue numerose generazioni ha per anni soverchiato i danni prodotti da anarsia (i danni

causati da *C. molesta* sono molto simili a quelli causati da *A. lineatella* e pertanto difficilmente distinguibili tra loro).

Le ricerche degli ultimi vent'anni si sono oramai orientate verso l'utilizzo di semiochimici concentrandosi soprattutto sulla conoscenza e sull'applicazione di sostanze derivate da feromoni e da sostanze volatili prodotte dalle piante (caïromoni). Per quanto riguarda *A. lineatella* i limiti dei mezzi che mirano ad ostacolare gli accoppiamenti sono fondamentalmente da imputare ad una scarsa conoscenza del comportamento di questa specie in presenza dell'attrattivo sintetico e del complesso dei meccanismi che consentono di localizzare gli individui dell'altro sesso o i luoghi idonei per l'ovideposizione.

I continui attacchi di *A. lineatella* nei pescheti del nord Italia, hanno evidenziato la necessità di approfondire la conoscenza di questo fitofago (Carli, 2001); in particolare un'adeguato approfondimento potrebbe essere rivolto allo studio dei numerosi aspetti riguardanti i sistemi intraspecifici di comunicazione.

1. ANARSIA LINEATELLA ZELLER

Anarsia lineatella Zeller appartiene all'ordine dei Lepidotteri, sottordine degli Eteroneura, famiglia dei Gelechidi.

➤ GLI ADULTI

Gli adulti che appartengono a questa specie presentano le ali anteriori di colore grigio con presenza di macchie lineari sparse di colore castano mentre le ali posteriori sono di colore chiaro e munite di frangia. L'apertura alare è di 13-16 mm.

Hanno un capo piuttosto piccolo che presenta però due grandi occhi composti e due ocelli (fig. 1).

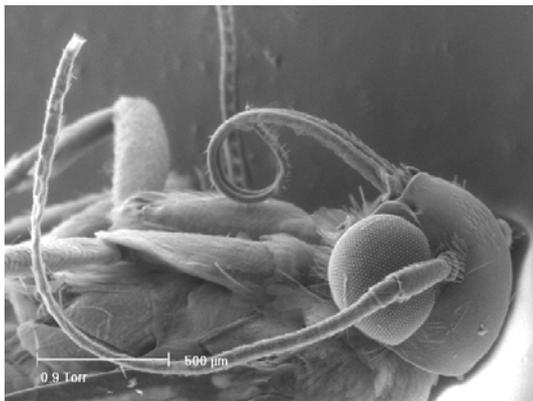


Fig. 1: Capo di adulto di *A. lineatella* (MES)

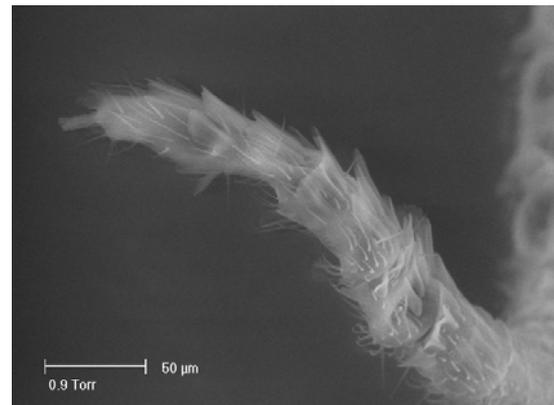


Fig. 2: Tratto terminale dell'antenna (MES)

Presentano antenne pluriarticolate che sono sede di numerosi centri di recettività grazie ai quali l'adulto percepisce odori (fig. 2).

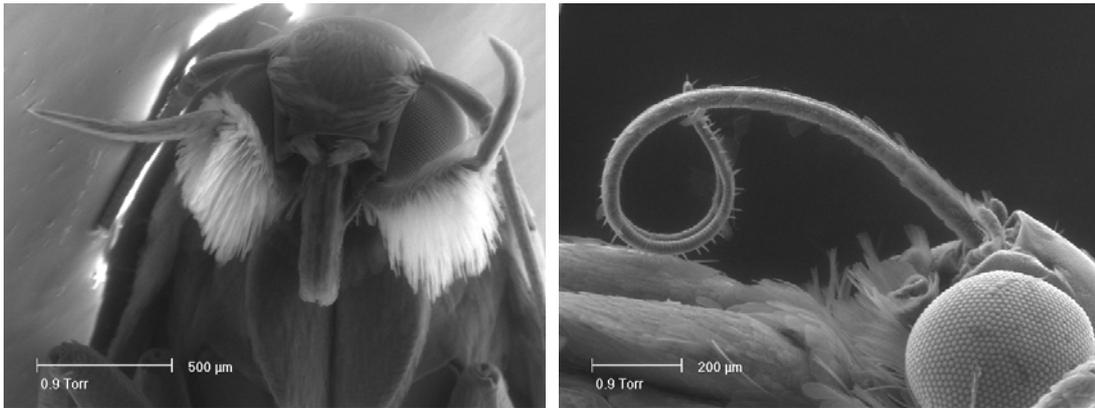


Fig. 3: Apparato boccale di *A. lineatella* (MES) Fig. 4: Spirotromba (MES)

Nelle figure 3 e 4 è visibile parte l'apparato boccale dell'adulto di *A. lineatella* ed in particolare i palpi labiali ben sviluppati e la spirotomba grazie alla quale vengono succhiati i liquidi zuccherini, generalmente questa è tenuta avvolta sotto il capo e viene svolta solo nell'atto della suzione.

Le zampe dell'adulto sono sottili e servono per lo più come strumento di semplice presa al substrato: trattandosi di insetto volatore infatti gli spostamenti avvengono mediante il volo.

Il maschio è facilmente riconoscibile dalla femmina grazie all'osservazione dell'addome, più precisamente della parte terminale dello stesso dove sono presenti i genitali. Nel maschio l'addome è più affusolato e sono ben visibili i genitali (fig. 5); nella femmina l'addome è tozzo e si distingue bene l'apertura genitale tra l'ottavo e il nono urite (fig. 6).



Fig. 5: Maschio di *A. lineatella*



Fig. 6: Femmina di *A. lineatella*

➤ LE UOVA

Le uova hanno forma ovale, sono inizialmente di colore bianco traslucido e tendono a diventare giallo-arancio a maturità. Hanno dimensione di 0,5 x 0,3 mm.

Dalle fotografie effettuate al microscopio elettronico a scansione (MES) si può osservare la superficie esterna dell'uovo (*corion*) che presenta delle sculture con microscopiche cavità o creste (fig. 7); sono inoltre visibili gli aeropili che permettono gli scambi respiratori di ossigeno e anidride carbonica con la minima perdita di acqua.

Il *corion* presenta nella sua parte anteriore il micropilo (fig. 8), deputato all'ingresso dello sperma durante la fecondazione; nell'uovo di *A. lineatella* questa apertura presenta la classica forma a fiore.

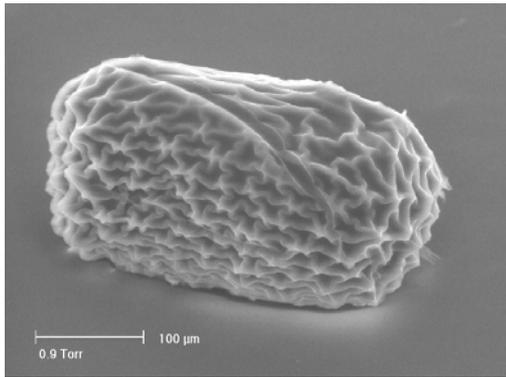


Fig. 7: Uovo di *A. lineatella* fotografato trasversalmente (MES)

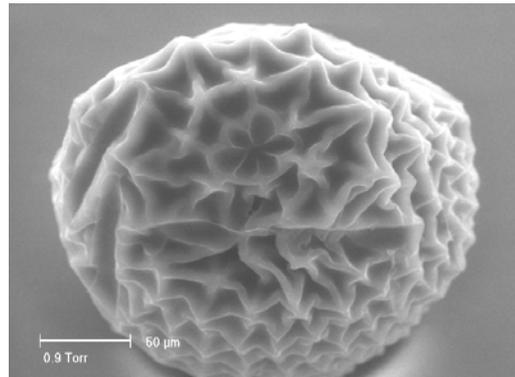


Fig. 8: Uovo di *A. lineatella* osservato dall'estremità micro pilare (MES)

➤ LE LARVE

Le larve di *A. lineatella* (fig. 9) hanno colore castano con gli spazi intersegmentali più chiari, visibili soprattutto durante il movimento della larva stessa. Il capo, la placca toracica, lo scudo anale e le zampe sono di colore bruno.

L'estremità caudale è fornita di un pettine sopranale con quattro processi spinosi (fig. 10). La larva a maturità presenta una lunghezza di circa 12-15 mm.



Fig. 9: Larva matura di *A. lineatella*



Fig. 10: Pettine sopranale (larva matura)

➤ LE CRISALIDI

Le crisalidi sono di colore castano-rossastro con *cremaster* fornito di setole ingrossate e uncinata, spesso protette all'interno di un rado bozzolotto biancastro. Hanno una lunghezza di circa 4-6 mm.

BIOLOGIA

A. lineatella sverna come larva matura di seconda età. Durante l'inverno si ripara all'interno di un ibernacolo scavato all'interno di una gemma a frutto o nel fellogeno e nel felloderma delle depressioni corticali dei rami. L'ibernacolo comunica con l'ambiente esterno a mezzo di un caminetto di seta e rosura che la larva rinforza gradualmente e che viene completato all'inizio dell'inverno.

L'attività delle larve viene gradualmente ripresa alla fine di febbraio allargando il ricovero per poi fuoriuscire intorno alla metà di marzo, in prossimità della fioritura o immediatamente dopo. Per quasi tutto il mese di aprile le larve si alimentano danneggiando le rosette fogliari, i fiori e i germogli; una volta raggiunta la maturità si incrisalidano fra la vegetazione danneggiata e disseccata per poi dare vita agli adulti dopo 8-15 giorni.

L'adulto di anarsia vive circa un mese, il volo inizia in genere a metà maggio e termina nella prima decade di giugno. Le femmine depongono mediamente un centinaio di uova (da dati reperibili in allevamento si può affermare che in condizioni controllate una femmina può arrivare a produrre anche più di 200 uova) in modo isolato o a piccoli gruppi sui germogli, sulle foglie o sui frutti. Le larve nascono dopo un periodo di 4-8 giorni e completano il loro sviluppo in circa tre settimane scavando delle

gallerie all'interno dei giovani germogli in accrescimento ed attaccando i frutti per poi incrisalidarsi e dare origine agli adulti dopo circa una settimana.

Il volo dagli adulti di seconda comparsa interessa circa un mese e si colloca tra la prima decade di luglio e la metà di agosto. Le larve della seconda generazione nascono dopo 4 giorni di incubazione e attaccano soprattutto i frutti raggiungendo la maturità in una ventina di giorni o, a volte dopo aver sospeso l'attività e trascorso il periodo di forte caldo estivo entro un ricovero simile a quello invernale.

Il terzo volo avviene dalla fine di agosto a tutto settembre e oltre; dalle uova deposte sulla corteccia dei rami nascono le larve che si costruiscono un ibernacolo e compiono una prima muta per poi trascorrere l'inverno (fig. 11).

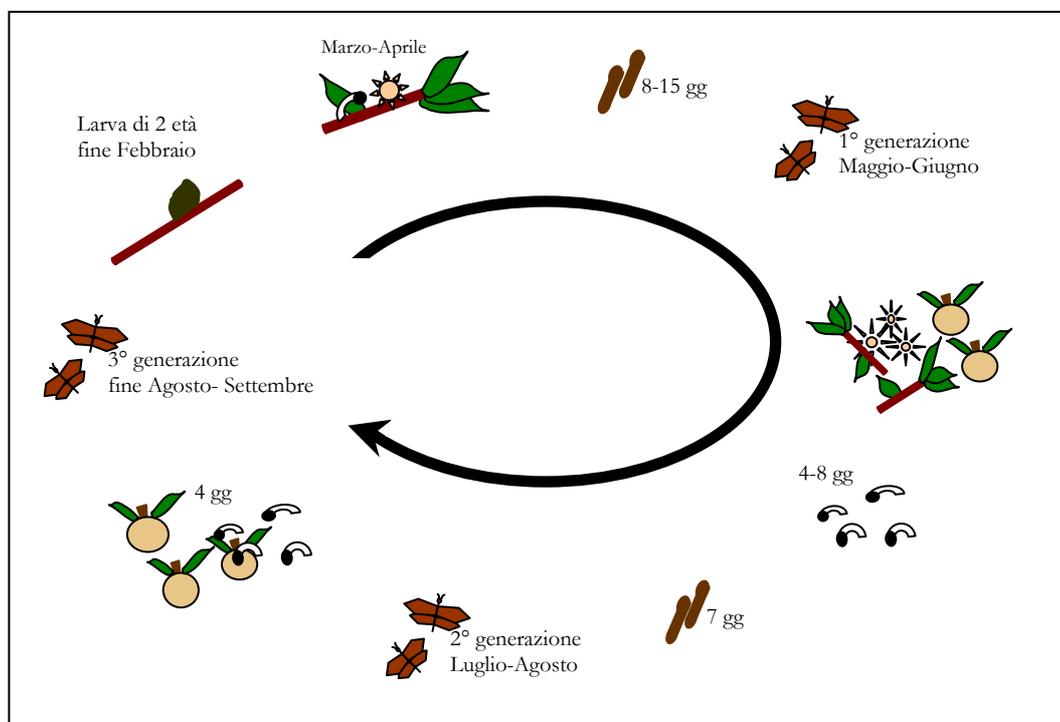


Fig. 11: Ciclo biologico di *A. lineatella*

DANNI

All'inizio della primavera il danno è causato dalle larve che scavano gallerie centripete alla base delle rosette fogliari provocandone l'avvizzimento e inoltre penetrano anche nei fiori facendoli disseccare (Hathaway *et al.*, 1985). A tarda primavera, invece, penetra nei germogli in accrescimento scavando delle gallerie discendenti e facendo disseccare i germogli stessi. Generalmente le larve delle generazioni estive determinano il danno maggiore sul frutto (albicocche, pesche e susine) scavando gallerie nella polpa attorno al peduncolo. Le varietà di pesco precoci, che maturano entro il mese di luglio, riescono a sfuggire pressoché completamente agli attacchi sul frutto. Molto pericolosi sono gli attacchi autunnali nelle piante in vivaio poiché le larve si localizzano sotto gli innesti ad occhio facendoli disseccare (Pollini, 1998).

1.2. FEROMONI E COMUNICAZIONE TRA GLI INSETTI

La comunicazione fra insetti avviene grazie a diversi meccanismi che possono comprendere stimoli visivi, sonori (come ad esempio in grilli e cicale) e feromoni (dal greco *phero* = trasporto e *ormao* = stimolo) (Karlson *et al.*, 1959, 1959a), cioè quelle sostanze che un organismo emette al suo esterno e che, ricevute da altri individui della stessa specie, determinano in essi risposte, precise e ripetibili. I feromoni possono anche essere definiti “semiochimici” (dal greco *semeion* = messaggio), intendendo con questo termine tutti questi segnali di tipo chimico che servono per regolare la comunicazione fra individui e per indurre determinate reazioni nei confronti dell’ambiente.

I semiochimici più diffusi in natura e i più studiati sono sicuramente i feromoni per quello che riguarda la comunicazione fra individui della stessa specie, mentre tra quelli che riguardano le comunicazioni in specie differenti, si possono annoverare gli “allomoni” (che favoriscono l’individuo che li emette), i “cairomoni” (che favoriscono l’individuo che li riceve: sono ad esempio utilizzati dai parassitoidi per individuare gli ospiti o recepiti da insetti ma emessi da specie vegetali) e i “sinomoni” (messaggeri interspecifici che sono vantaggiosi sia per la specie che li emette sia per quella che li riceve).

Esistono inoltre gli “apneumoni” che sono sostanze volatili emesse da materiale non vivente e usate come messaggeri chimici da specie sociali, predatrici o parassite (Nordlund e Lewis, 1976); ciò che invece assicura l’isolamento riproduttivo tra specie anche molto vicine sono sostanze volatili “antiferomoni” che inibiscono l’approccio ai maschi etero

specifici; ed infine i “paraferomoni” (Chambers, 1977) sono composti chimici non feromonici che possono sollecitare i recettori feromonici per somiglianza di struttura chimica con i veri messaggeri specifici o per motivi ancora non ben conosciuti, queste sostanze sono di solito 100 0 1000 volte meno potenti dei veri feromoni.

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

Una sostanza feromonica può avere anche più di un tipo di effetto ed agire nello stesso tempo da messaggero *intra* e *inter-specifico*. Così un attrattivo sessuale di una specie (feromone) può essere utilizzato da specie predatrici o parassite della stessa, al fine di individuarla e colpirla (caiomone).

Nei processi di comunicazione chimica tra gli insetti esiste un organo *emittente* che, sotto l’influenza di stimoli interni ed esterni produce e diffonde una o più sostanze che svolgono effetto di *segnale*. Questo segnale, attraverso opportuni mezzi di diffusione quali aria o acqua, viene percepito dagli organi di senso (recettori) di un organismo *ricevente*.

Alla percezione di una sostanza chimica quale un feromone, può seguire una risposta comportamentale immediata (*effetto releaser*) o un complesso di risposte fisiologiche a cui in un secondo momento possono conseguire risposte comportamentali (*effetto primer*). Sul soggetto ricevente

i feromoni possono agire attraverso l'ingestione, l'assorbimento o lo stimolo olfattivo.

I feromoni possono essere raggruppati secondo Shorey (1977) in cinque categorie in funzioni delle varie risposte comportamentali:

- A) feromoni di aggregazione
- B) feromoni di dispersione
- C) feromoni di aggressione
- D) feromoni di riconoscimento
- E) feromoni sessuali

I lavori effettuati in questi anni di sperimentazione su *A. lineatella* hanno riguardato in modo particolare le risposte dei maschi ai feromoni sessuali e l'inibizione degli accoppiamenti da parte di differenti miscele pertanto nelle pagine seguenti ci soffermeremo a parlare dei feromoni sessuali tralasciando tutte le altre categorie.

➤ FEROMONI SESSUALI

Quello che viene comunemente indicato con il termine “feromone sessuale” è in realtà una complessa miscela di composti chimici (a volte solo due ma spesso più di dieci (Chapman, 1998)), denominata anche *bouquet*, caratteristica per ogni specie. In questo *bouquet* di sostanze è presente una molecola principale che è responsabile del potere attrattivo, unitamente ad alcune altre molecole accessorie, sovente degli isomeri della prima, che contribuiscono a “completare” la miscela: ci sono sostanze che coadiuvano la molecola principale ad esempio aumentandone l'efficacia, oppure possono essere presenti anche componenti con effetto inibitorio

verso specie affini a quella che li emette, oppure sostanze ad effetto eccitante o arrestante che agiscono a breve distanza favorendo l'accoppiamento una volta richiamato a sé il partner (Eliyahu *et al.*, 2004).

I feromoni sessuali sono in molte specie di insetti rilasciati dalle femmine per attrarre, anche da notevoli distanze, i maschi conspecifici (Abed *et al.*, 1993).

L'emissione e la ricezione dei feromoni sessuali sono periodicamente influenzati da condizioni intrinseche o fisiologiche (es. età, tipo di bioritmo giornaliero o stagionale, monogamia o poligamia, ecc.) ed estrinseche o ambientali (temperatura, velocità del mezzo disperdente, intensità luminosa e vegetazione).

Gli attrattivi sessuali volatili di numerose specie di insetti sono stati identificati chimicamente e talvolta sintetizzati, fornendo così un interessante strumento per il controllo delle infestazioni; infatti quantità ridotte di queste sostanze possono essere applicate ottenendo buoni risultati con varie modalità, come ad esempio per la cattura massale, per il monitoraggio, per il metodo della confusione sessuale ecc..

1.2.A DISPERSIONE DEI FEROMONI SESSUALI NELL'AMBIENTE

Lo spazio immediatamente vicino alla sorgente che emette feromone sessuale viene definito "spazio attivo" o "zona segnale" e presenta una concentrazione gassosa attiva talmente alta, che risulta essere superiore a quella richiesta per indurre una risposta comportamentale nell'individuo ricevente (Wilson, 1970).

Questo spazio sembra avere forma sferica in assenza di aria e forma ellissoidale in presenza di aria ventilata; in quest'ultimo caso l'ellissoide si estende nella direzione del vento per una lunghezza che si riduce con l'aumentare della velocità del vento stesso. Lo spazio attivo assume la forma teorica di una semisfera o semiellissoide, se l'emissione avviene su una superficie piana. Osservazioni di campo condotte con l'ausilio di generatori di fumo hanno dimostrato che alcune specie di insetti si orientano più agevolmente in presenza di sottili filetti odorosi definiti "plumes" emergenti da trappole di tipo triangolare poste in atmosfera leggermente ventilata. In questi casi con movimenti anemotattici a zig-zag, l'insetto raggiunge più facilmente la sorgente odorosa rispetto al caso in cui l'atmosfera risulti essere leggermente permeata (Lewis e MacKaulay, 1976) (fig. 12).

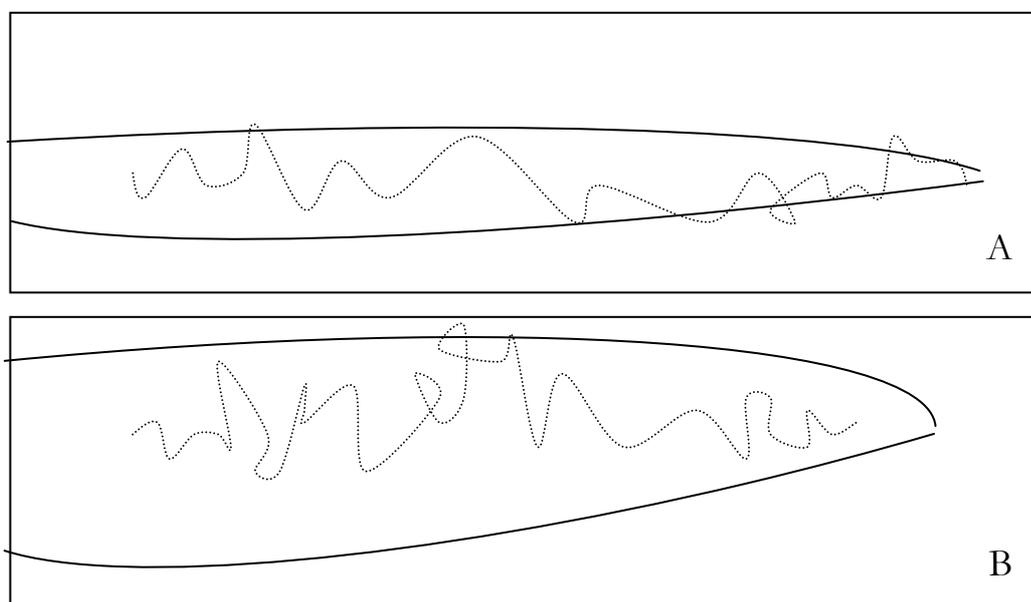


Fig. 12: Schemi di percorsi aerei di maschi in presenza di filetti odorosi in leggero vento (A) e in aria ferma (B)

Esperienze di laboratorio dimostrano inoltre che i maschi alcuni Lepidotteri si orientano bene in presenza di filetti odorosi in aria immobile.

L'andamento in natura dei filetti odorosi è fortemente influenzato da turbolenze atmosferiche o canalizzazioni di aria in rapporto agli spazi occupati da oggetti di varie dimensioni; la disposizione dei filari in rapporto al vento dominante può influenzare la capacità di cattura (Valli, 1978).

1.2.B IL FEROMONE SESSUALE DI *ANARSIA LINEATELLA*

Il feromone di *A. lineatella* è stato identificato per la prima volta da Roelfos *et al.*, nel 1975 attraverso un'analisi dell'estratto ghiandolare dell'addome ricavato da femmine trattate per 2 o 3 giorni con cloruro di metilene. La risposta dei maschi agli estratti ghiandolari è stata registrata grazie all'utilizzo dell'analisi elettroantennografica (Roelofs & Comeau, 1971).

Dagli studi condotti da Roelofs *et al.* (1975), su due popolazioni differenti di *Anarsia* (un ceppo proveniva dalla California e uno dallo stato di Washington) è emerso che i componenti principale del feromone sessuale fossero il *trans*-5-decenil acetato ((*E*)5-10:Ac) e il *trans*-5-decenolo ((*E*)5-10:OH). Tra le due popolazioni utilizzate nelle sue prove ci sono state effettivamente delle differenze ben distinguibili nelle risposte dei maschi; le trappole innescate con una quantità approssivamente equivalente dei due composti hanno catturato i maschi provenienti dal ceppo della California mentre i maschi della popolazione proveniente dal ceppo di

Washington è stata preferenzialmente attratta dalle trappole innescate con *E5-10:OH* come singolo componente. Roelofs *et al.*, 1975 hanno inoltre menzionato che le loro prove di campo sono state ostacolate da tracce di un forte antagonista comportamentale presente nelle loro formulazioni sintetiche che però non è stato identificato.

Da successive analisi sviluppate da Millar e Rice, 1992 sui componenti del feromone sessuale di *Anarsia* ricavato da estratti di ghiandole addominali, sono emersi, oltre ai già citati componenti principali, molti altri componenti minori presenti in tracce (meno del 2% dei maggiori componenti) quali: decil acetato (*10:Ac*), *Z4-* e *E4-*decenil acetato (*Z4* e *E4* – *10:Ac*), *Z3,E5-*decadienil acetato (*Z3,E5-10:Ac*) e *E3,E5-*decadienil acetato (*E3,E5-10:Ac*). In base ai loro studi, nessuno dei componenti identificati ha aumentato l'attrattività della miscela standard (*E*)-5-decenolo e (*E*)-5-decenil acetato(19:81) usata nei campi testimoni.

Dall'analisi degli effluvi prodotti da femmine vergini sono però emersi due componenti analoghi (*E*)-6-decenil acetato e (*E*)-7-decenil acetato identificati come antagonisti comportamentali e forti soppressori delle catture nelle trappole prova (Millar e Rice, 1992).

OBIETTIVI GENERALI

Sulla base di quanto detto fino ad ora, delle notizie reperibili in letteratura, dalle esperienze maturate da osservazioni di campo anche confrontandosi con le diverse realtà in cui viene applicato il metodo della confusione per la lotta contro anarsia, ma soprattutto in funzione di poter approfondire vari aspetti che ancora non sono chiari sul comportamento riproduttivo di *A. lineatella*, gli obiettivi generali di questa tesi di Dottorato sono stati:

- 1) Approfondire le conoscenze sui sistemi di comunicazione intraspecifici utilizzati da *Anarsia lineatella* Zeller; in particolare sono state analizzate le risposte dei maschi vergini al feromone naturale emesso da femmine vergini e ad alcuni analoghi sintetici mediante prove comportamentali in *wind-tunnel* e prove relative all'effetto dell'età di accoppiamento sulla fecondità
- 2) Valutare in laboratorio la capacità, da parte di diverse miscele di feromone sintetico, di inibire gli accoppiamenti utilizzando contenitori di volume noto e densità di popolazioni differenti dell'insetto.
- 3) Valutare l'efficacia in campo di diverse miscele di feromone sintetico utilizzando gabbie di accoppiamento appositamente costruite, posizionate in frutteti a conduzione biologica nel nord Italia e messe a confronto con gabbie che utilizzavano come fonte attrattiva femmine vergini di tre giorni di età.

- 4) Mettere a punto un metodo di prova per determinare gli avvenuti accoppiamenti in campo

CAPITOLO II

2. L'ALLEVAMENTO DI *ANARSIA LINEATELLA*

PREMESSA

Tutte le prove sperimentali di laboratorio e campo effettuate nei tre anni di ricerca sono state supportate da un solido allevamento di *Anarsia lineatella* fatta crescere inizialmente sull'ospite naturale (pesco) e negli anni lentamente addomesticata su dieta artificiale.

➤ GLI AMBIENTI DI ALLEVAMENTO

L'allevamento di *A. lineatella* viene effettuato sia in cella climatizzata che in frigotermostati modificati; questa modalità di allevamento in “doppio” consente di avere a disposizione insetti in tempi diversi (il ciclo di *Anarsia* a 26° C è più veloce, da larva ad adulto in circa 25 giorni) e permette inoltre di preservare il materiale biologico nel caso in cui la cella o il termostato subiscano danni strutturali.

La cella climatizzata (fig. 1) è stata impostata ad una temperatura di 23° C, umidità 60±10% e fotoperiodo L:D=16:8; necessita di manutenzione ordinaria annuale generalmente effettuata nel mese di gennaio e occorre tener presente che nei mesi più caldi la cella è sottoposta ad uno sforzo maggiore quindi, per tenerla monitorata ed evitare innalzamenti di temperatura o bruschi sbalzi di umidità si posiziona al suo interno un data-logger che viene poi controllato settimanalmente (fig. 2).



Fig. 1: Elemento climatico della cella di allevamento



Fig. 2: Data logger

I frigotermostati consentono un'incubazione da +15 a +45 °C, illuminazione interna mediante 2 lampade GroLux inserite sulla porta con cicli programmabili L/D tramite timer, capacità 70 litri. Per l'allevamento in questione sono stati settati ad una temperatura di 26° C, fotoperiodo L:D=16:8 (fig. 3) mentre l'umidità viene mantenuta costante (60 %) grazie all'introduzione di acqua in vaschette poste nella parte inferiore del frigotermostato.



Fig.3: Frigotermostato usato per l'allevamento degli insetti adulti di *A. lineatella*

all'interno.

In caso di calo di corrente è sempre necessario controllare che le impostazioni di temperatura e fotoperiodo non abbiano subito variazioni, mensilmente ogni frigotermostato viene svuotato e disinfettato, onde evitare il proliferare di acari e muffe.

Per controllare il corretto funzionamento dei frigotermostati è necessario controllare settimanalmente i data-logger posizionati

➤ LE LARVE

L'allevamento delle larve di *Anarsia lineatella* si effettua in contenitori di materiale plastico bianco "Bioassay Tray"



Fig. 4: Pozzetti per larve neonate di *A lineatella*

che si presentano come vassoi da 128 pozzetti di 1,6 cm di diametro e 1,8 cm di altezza. (fig. 4).

Prima dell'uso questi contenitori vengono riposti in cella frigorifera per contenere la presenza di acari e prevenire la formazione di muffe che potrebbero compromettere l'allevamento di larve in una fase così delicata. All'interno di ogni pozzetto viene posizionato il substrato artificiale, anch'esso preventivamente conservato in freezer, mediante l'utilizzo di una siringa da pasticciere con beccuccio di plastica tagliato nella parte finale (fig. 5).



Fig. 5: Riempimento dei pozzetti col substrato artificiale



Fig. 6: Posizionamento delle larve neonate nei pozzetti

Per la dieta artificiale si utilizza un prodotto proveniente dagli USA della ditta Stonefly Industries, chiamato “Heliothis Premix” (insect food) a base di germe di grano e soia, si presenta in polvere e prima dell’uso viene miscelato con acqua distillata in un rapporto di 1:3.

Le larve neonate di *A. lineatella* vengono poste nei pozzetti col substrato artificiale mediante l’ausilio di un pennello (misura 0). Appare evidente come tale operazione richieda notevole cura ed attenzione da parte dell’operatore. Un’eccessiva pressione nel porre le larve neonate sul substrato potrebbe causare la morte delle stesse (fig.6).

I pozzetti così preparati vengono poi ricoperti mediante l’utilizzo di una specifica pellicola adesiva, posizionati all’interno di vassoi e messi in cella fino allo sfarfallamento degli adulti (fig. 7).

Per mantenere l’allevamento di *A. lineatella* costante nel tempo consentendo comunque di effettuare prove di laboratorio e di campo utilizzando per ogni prova un notevole numero di insetti, vengono riempiti giornalmente almeno otto contenitori (cioè 128 pozzetti).



Fig. 7: Allevamento delle larve neonate di *A. lineatella*

Siccome la mortalità delle larve risulta essere elevata vengono poste tre larve in ogni pozzetto per un totale di almeno 384 larve al giorno (nei periodi in cui ci sono prove in atto il numero dei pozzetti al giorno viene aumentato).

Nonostante l'attenzione posta durante la preparazione dei pozzetti, soprattutto in termini di pulizia e sterilità dell'ambiente di lavoro, durante il periodo di crescita delle larve può verificarsi lo sviluppo di muffe all'interno dei pozzetti stessi. Risulta quindi necessario un frequente controllo al fine di poter eliminare tempestivamente gli eventuali pozzetti contaminati prima che le muffe si diffondano causando la morte delle larve, soprattutto se esse sono in uno stadio ancora giovanile.

L'asportazione dei pozzetti contaminati da muffe (fig. 8) viene effettuata a caldo con l'ausilio di una fustella di ottone avente diametro di 21 mm scaldata su fiamma (fig. 9). Asportando la muffa in questo modo la pellicola di copertura dei pozzetti adiacenti a quello contaminato si salda evitando che le spore si possano diffondere anche in questi ultimi, cosa che invece accade tagliando semplicemente i pozzetti con una forbice o con un *cutter*.



Fig. 8: Presenza di muffa nei pozzetti



Fig. 9: Strumento per l'asportazione della muffa dai pozzetti

➤ LE CRISALIDI

Le crisalidi compaiono nei pozzetti destinati alle larve dopo circa 30-35 giorni dalla deposizione delle larve neonate sulla dieta artificiale. Ciò significa che i pozzetti contengono *A. lineatella* dallo stadio di larva fino alla comparsa degli adulti. Questo è il motivo per il quale i pozzetti devono essere mantenuti il più possibile in un ambiente sano e pulito e necessitano di numerosi controlli.

Sono stati effettuati studi sul sessaggio di *A. lineatella* già allo stadio di crisalide ma, nonostante i numerosi tentativi svolti, il sessaggio corretto rimane ancora quello effettuato sull'insetto allo stadio adulto.

➤ GLI ADULTI

Gli adulti di *A. lineatella* vengono allevati all'interno di bottiglie di plastica trasparenti da 1,5 l (la scelta dell'utilizzo di questi contenitori deriva dal fatto che sono comodi da usare e facilmente reperibili). Il numero di individui comprensivo di maschi e femmine introdotti

all'interno di queste bottiglie è di circa 25 adulti, un numero superiore potrebbe creare problemi di competizione e stress nell'allevamento a discapito della deposizione delle uova.

Da diverse prove effettuate è infatti emerso che, anche aumentando il numero di individui per bottiglia il numero delle uova deposte non subisce alcun aumento.

E' stata quindi stabilita la "soglia critica" di 25 individui per bottiglia con un rapporto maschi-femmine di 1:1 o sbilanciato a favore delle femmine (fig. 10).



Fig. 10: Allevamento di adulti di *A. lineatella* in cella climatizzata

RACCOLTA DEGLI ADULTI:

I pozzetti contenenti gli adulti sfarfallati vengono prelevati dalle celle e dai termostati; con un *cutter* viene tagliata la pellicola adesiva che copre il pozzetto interessato, in modo da poterla sollevare

e prelevare l'adulto catturandolo con un barattolo di plastica trasparente capovolto (fig. 11), il pozzetto viene successivamente richiuso per evitare la fuoriuscita di nuovi eventuali adulti. Questa operazione risulta abbastanza semplice infatti l'insetto adulto tende a volare verso l'alto ed entra facilmente nel barattolo una volta sollevata la pellicola (fig. 12). Tuttavia bisogna porre attenzione a non lasciare vie di fuga durante l'atto di sollevamento della pellicola stessa: ciò potrebbe causare la perdita

dell'insetto. A volte, viene scritta sulla pellicola adesiva la data del prelievo dell'insetto questo accorgimento consente di monitorare la crescita delle larve e poter controllare il numero degli sfarfallamenti.



Fig. 11: Adulti nei barattoli di plastica Fig. 12: Raccolta degli adulti dai pozzetti trasparente

Il sessaggio degli insetti avviene quando si necessitano di individui per effettuare prove di laboratorio o di campo; in questi casi, i barattoli contenenti gli insetti raccolti vengono tappati in modo da poterli maneggiati con facilità e si effettua il sessaggio dei maschi e delle femmine con l'ausilio dello stereo microscopio o con una lente d'ingrandimento.

Gli insetti raccolti dai pozzetti vengono posti nelle bottiglie di plastica preventivamente adattate a quest'uso: dalle bottiglie viene tolto il fondo che successivamente viene tappato con una garza sterile fissata con un elastico. Quest'ultimo serve anche per il bloccaggio della striscia di feltro bianca (panno Lenci) da inserire all'interno della bottiglia, ove le femmine deporranno le uova (le strisce prima di essere utilizzate devono essere conservate nel congelatore per subire un trattamento antisettico ed antiacaro).

Per inserire gli insetti all'interno delle bottiglie, viene praticata nella plastica una "finestra" di circa 2 cm x 2 cm il barattolo di plastica viene appoggiato con la parte aperta su questo foro e con un colpo l'insetto viene fatto cadere nella bottiglia (fig. 13). Dopo aver introdotto i 25 individui nelle bottiglie il foro viene tappato con un batuffolo di cotone (fig. 14) imbevuto con della dieta liquida per insetti adulti costituita da acqua, zucchero, miele, acido ascorbico e metilparabenzoato. Naturalmente per le prove vengono scartati gli insetti nati con difetti quali l'incapacità di volare, quelli con un apparato genitale non facilmente riconoscibile e gli insetti nati in coppia nello stesso pozzetto se di sesso diverso perché nelle prove si usano insetti vergini.



Fig. 13: Inserimento degli adulti nelle bottiglie



Fig. 14: Bottiglia completa di *Anarsia* per l'allevamento

➤ LE UOVA

La striscia di feltro bianco posizionata all'interno delle bottiglie funge da supporto per la deposizione delle uova; le femmine di *A. lineatella*, al contrario di quelle di *Cydia molesta* e *Cydia pomonella* che

prediligono superfici lisce per la deposizione delle uova, trovano nella striscia di feltro il luogo adatto per ovideporre.

Le uova appena deposte sono di colore bianco (quindi non visibili ad occhio nudo se non su strisce di feltro di colore scuro, generalmente usate nelle prove) per poi passare successivamente a gialle, arancioni, rosse ed infine a maturità completa presenteranno la cosiddetta “testa nera”, fase finale prima della schiusa.



Fig. 15: Raccolta delle strisce con le uova dall'allevamento

Dalle bottiglie destinate all'allevamento si effettua due volte a settimana (martedì e venerdì) la raccolta delle uova, questo avviene sostituendo le strisce all'interno delle bottiglie stesse; su queste strisce non si noteranno le uova deposte di recente

perché bianche ma saranno ben visibili le uova arancioni più mature (fig. 15).

Le strisce sostituite si conservano per la fase di incubazione in un luogo chiuso e protetto da acari; in genere si usano contenitori per alimenti “usa e getta” nei quali si ripongono 3 o 4 strisce ed un piccolo serbatoio di acqua per mantenere umidità all'interno di questa “incubatrice”(fig. 16 e fig. 17).



Fig. 16: Vaschetta contenente uova di *A. lineatella*



Fig. 17: Allevamento larve *A. lineatella* in cella climatizzata

Durante questi tre anni di sperimentazione relativi al dottorato di ricerca, l'allevamento di *Anarsia* è stato fortemente ampliato, questo per far fronte alla elevata quantità di insetti che dovevano essere sottratti all'allevamento stesso per poter sostenere sia le prove di laboratorio che quelle di campo. Per fare qualche esempio, nel 2007 gli adulti raccolti dall'allevamento sono stati circa 25.600, per passare a 40.350 nel 2008 e 46.060 nell'ultimo anno quando il numero di prove sperimentali è notevolmente aumentato.

Considerando che le larve neonate hanno una mortalità elevata (anche del 50%), per ottenere tale numeri di insetti adulti in laboratorio sono state introdotte nei pozzetti un numero di larve almeno pari al doppio degli adulti ottenuti.

CAPITOLO III

3. STUDI SUL COMPORTAMENTO RIPRODUTTIVO DI *ANARSIA LINEATELLA* ZELLER

PREMESSA

Sebbene *Anarsia lineatella* sia un fitofago ormai da anni introdotto e diffuso in Italia, ancora poco si conosce circa le sue abitudini riproduttive. In considerazione della elevata dannosità di *A. lineatella* nei pescheti del nord Italia e delle scarse conoscenze sulla sua biologia, si è evidenziata la necessità di approfondire la conoscenza di questo fitofago.

Negli ultimi anni l'utilizzo di semiochimici, sia feromoni sia sostanze volatili (cairomoni), è fortemente cresciuto nella difesa delle colture da lepidotteri; per quanto riguarda *A. lineatella*, i limiti dei mezzi che mirano ad ostacolare gli accoppiamenti sono fondamentalmente da imputare ad una scarsa conoscenza del comportamento di questa specie in presenza dell'attrattivo sintetico e del complesso dei meccanismi che consentono di localizzare gli individui dell'altro sesso o i luoghi idonei per l'ovideposizione. In particolare rimangono da approfondire numerosi aspetti riguardanti i sistemi intraspecifici di comunicazione.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze sul comportamento riproduttivo di *A. lineatella* ed in particolare:

- a) valutare nel tunnel del vento le risposte di maschi al richiamo delle femmine e del feromone sessuale di sintesi utilizzato per il monitoraggio
- b) valutare eventuali effetti dell'età di accoppiamento sulla fecondità

3.1. VALUTAZIONE DELL'ATTRATTIVITÀ DELLE FEMMINE DI A. LINEATELLA E DEL FEROMONE SESSUALE DI SINTESI

Sono state condotte prove sul comportamento di maschi di *A. lineatella* di uno, due, tre e quattro giorni di età in risposta al feromone emesso da femmine vergini di tre giorni di età (età in cui inizia con regolarità la produzione ed emissione del feromone sessuale) e al feromone emesso da erogatori di materiale plastico contenenti differenti miscele di feromone sintetico.

Come già detto nei precedenti capitoli, il feromone naturale di *A. lineatella* è fondamentalmente composto da una miscela di *trans*-5-decenil acetato ((*E*)5-10:Ac) e il *trans*-5-decenolo ((*E*)5-10:OH) (Roelofs *et al.*, 1975), in cui il rapporto acetato:alcol è di 85(Ac):15(OH); le risposte dei maschi al feromone sintetico sono state registrate utilizzando alcuni dei comuni erogatori impiegati per il monitoraggio che contengono la miscela con rapporto acetato:alcol di 95(Ac):5(OH).

Gli insetti, prima di essere utilizzati per le prove di laboratorio in tunnel del vento, sono stati pre-condizionati in camere climatiche con fotoperiodo di L:D = 15:9 modificando l'ora del crepuscolo in modo tale da poter condurre giornalmente due prove: una prima prova al mattino, utilizzando un primo gruppo di maschi condizionati in modo tale da far coincidere il crepuscolo a circa metà mattina e una seconda prova al pomeriggio utilizzando un secondo gruppo di maschi condizionati in modo tale da far coincidere il crepuscolo con le prime ore del pomeriggio. Gli insetti sono rimasti nelle camere climatiche dallo stadio larvale fino alla comparsa degli adulti, dopodiché questi ultimi sono stati prelevati e

circa 30 minuti dopo il crepuscolo sono stati utilizzati per le prove in *wind tunnel*.

➤ **MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:**

Le prove si sono svolte in ambiente controllato con temperatura compresa tra i 22 – 24 °C e umidità relativa attorno al 60%; l'aria nel tunnel del vento è stata immessa ad una velocità di 0,37 m/s e sono state applicate sopra il tunnel tre lampade inattiniche (bulbo fotografico) a luce rossa in modo da ottenere una luminosità di 6 lux.

Per determinare le caratteristiche del flusso dell'aria all'interno del tunnel del vento, sono state condotte delle prove posizionando un bastoncino d'incenso a circa 30 cm dall'ingresso dell'aria ad una altezza di circa 21 cm dal fondo del tunnel, considerando il percorso del fumo come indicativo dell'andamento della “piuma” feromonica; variando la velocità delle ventole, si è ottenuta una “piuma” che si manteneva compatta per tutta la lunghezza del tunnel (fig. 8); per verificare che eventuali variazioni del flusso d'aria all'interno del tunnel del vento potessero modificare in qualche modo l'andamento della “piuma” (emessa sia dalle femmine che dall'erogatore) e di conseguenza le eventuali risposte dei maschi, si è utilizzato un anemometro per misurare la velocità dell'aria in diversi punti del tunnel del vento (ingresso, a 100 cm, a 150 cm, a fondo tunnel e adiacente alle pareti laterali del tunnel) (fig. 9).



Fig. 8: Simulazione della piuma feromonica con fumo d'incenso

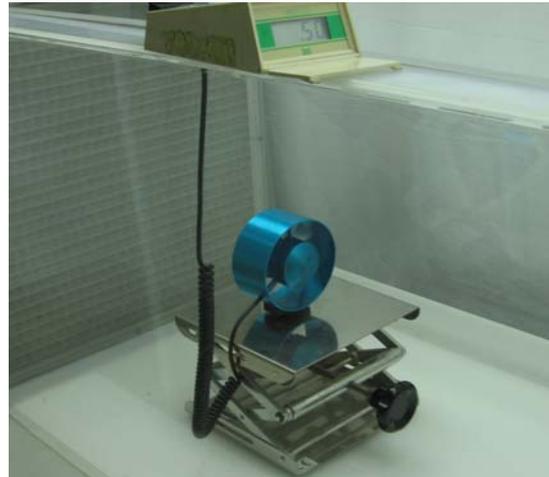


Fig. 9: Anemometro usato per la misurazione della velocità dell'aria nel tunnel del vento

I maschi e le femmine sono stati posti singolarmente in cilindri di *plexiglas* trasparente chiusi alle estremità con un foglio di rete bianca a maglia fine per impedire la fuoriuscita degli insetti; per i maschi il cilindro di plastica presentava uno speciale dispositivo che permetteva di aprire manualmente il contenitore quando mostrava segni di attivazione.

Le singole prove hanno avuto una durata complessiva di 5 minuti; se nei primi 2 minuti i maschi non mostravano segni di attivazione, la prova si riteneva conclusa, diversamente dopo l'attivazione venivano liberati e se ne osservava il comportamento.

Le diverse fasi registrate durante la prova in tunnel del vento sono state (fig. 10):

- attivazione
- inizio volo
- volo orientato fino a 50 cm
- volo orientato fino a 100 cm
- tocco della fonte

- atterraggio sulla fonte

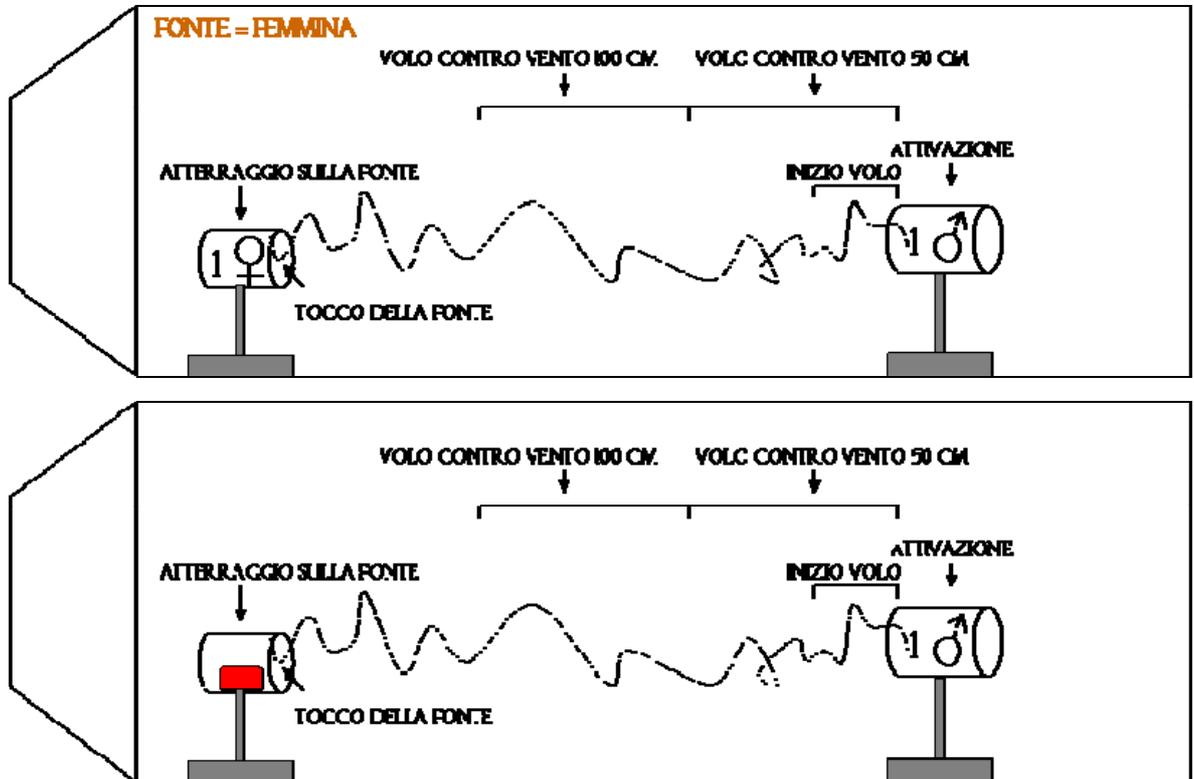
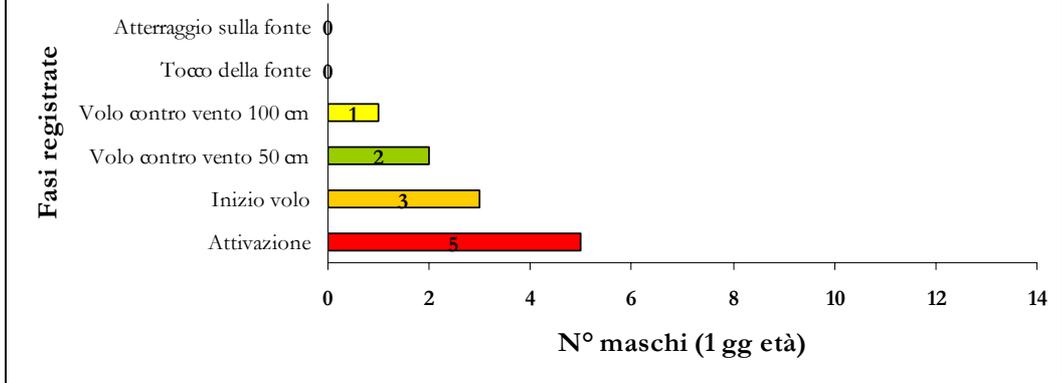


Fig. 10: Fasi registrate nelle prove di attrattività con femmine vergini e feromone sintetico

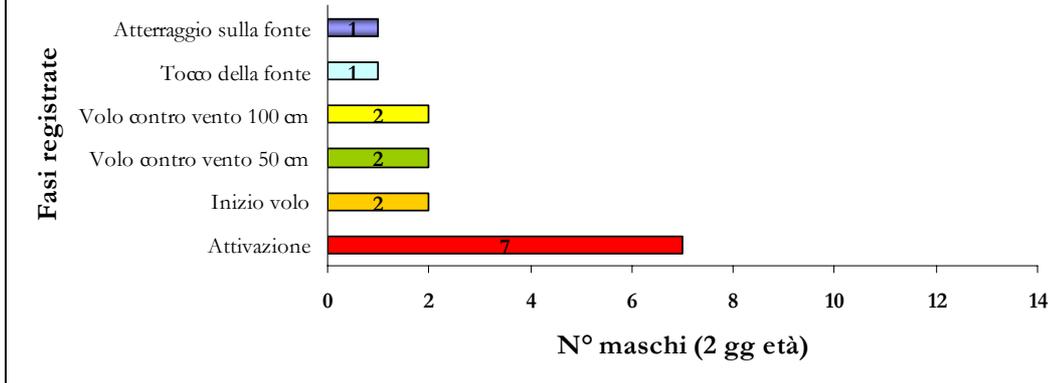
RISULTATI

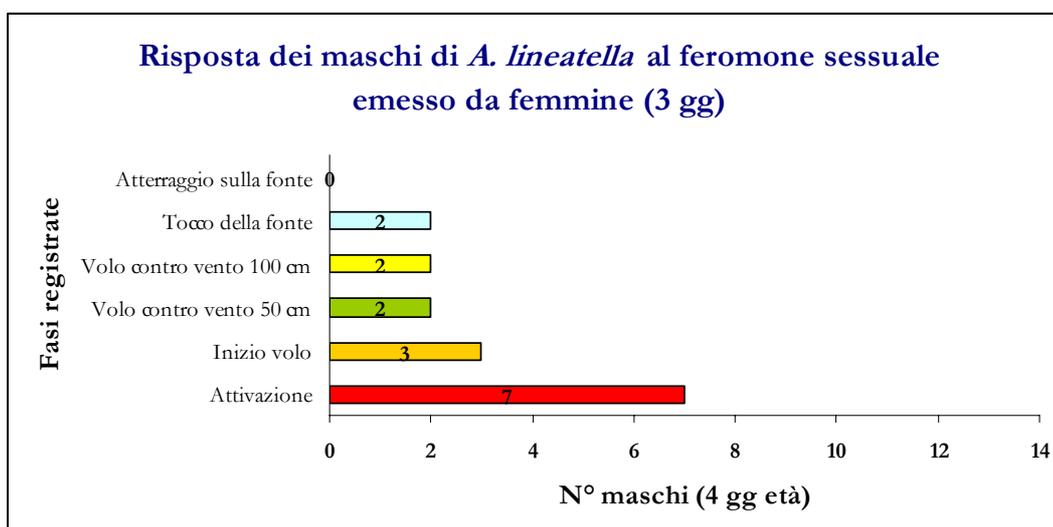
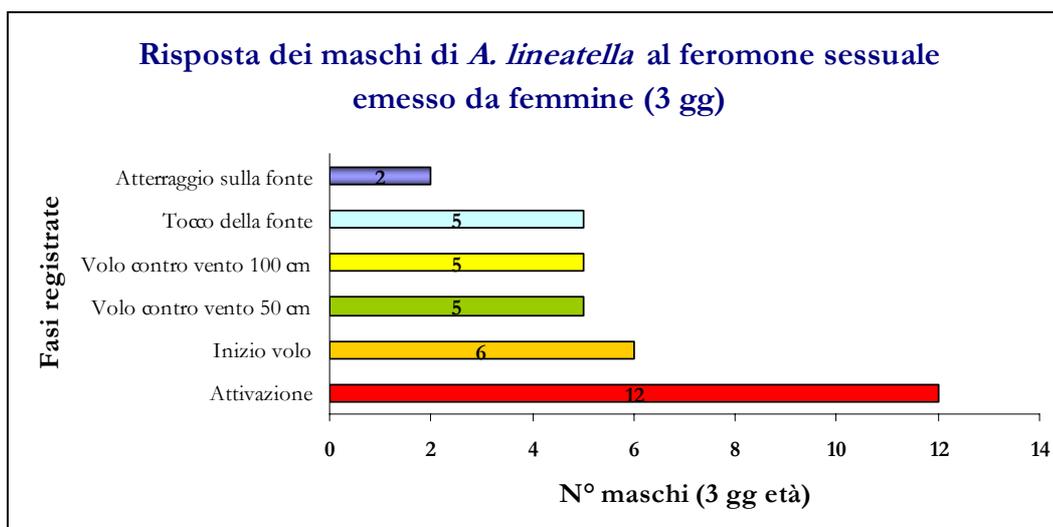
Le risposte ottenute da maschi di 1, 2, 3 e 4 giorni di età al feromone naturale emesso da femmine vergini di 3 giorni di età sono mostrate nei grafici di seguito (graf. 1):

Risposta dei maschi di *A. lineatella* al feromone sessuale emesso da femmine (3 gg)



Risposta dei maschi di *A. lineatella* al feromone sessuale emesso da femmine (3 gg)





Graf. 1: Risposte dei maschi al feromone naturale

Dall'analisi di questi dati si può osservare come dei 9 maschi vergini di 1 giorno di età utilizzati solo il 56 % si è attivato, il 33 % ha iniziato il volo, il 22 % ha effettuato il volo orientato contro vento a 50 cm, l'11 % ha proseguito il volo orientato fino a 100 cm ma nessuno di questi maschi ha raggiunto la fonte.

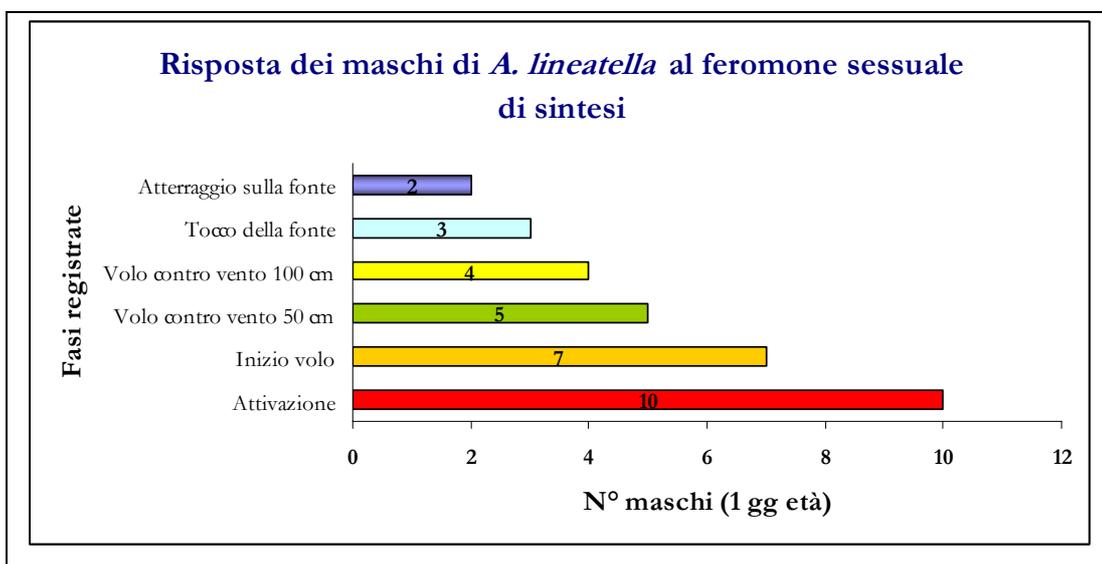
Degli 8 maschi vergini di 2 giorni di età l'88 % si è attivato, di questi il 25 % ha iniziato il volo, ha effettuato il volo orientato contro vento a 50 e

100 cm, ma poi solo il 13 % ha toccato ed è successivamente atterrato sulla fonte.

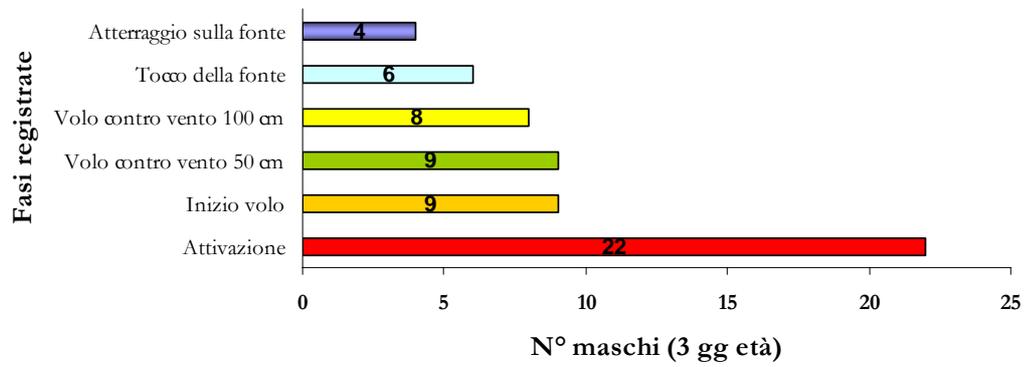
Dei 14 maschi di 3 giorni di età l'86 % si è attivato, di questi il 43 % ha iniziato il volo ma solo il 36 % ha effettuato il volo orientato contro vento a 50 e 100 cm toccando al fonte e solo il 14 % è atterrato alla fine sulla fonte.

Infine, il 78 % dei 9 maschi di 4 giorni di età si è attivato, di questi il 33 % ha iniziato il volo, il 22 % ha volato contro vento per 50 e 100 cm toccando la fonte ma nessuno ha effettuato l'atterraggio sulla fonte.

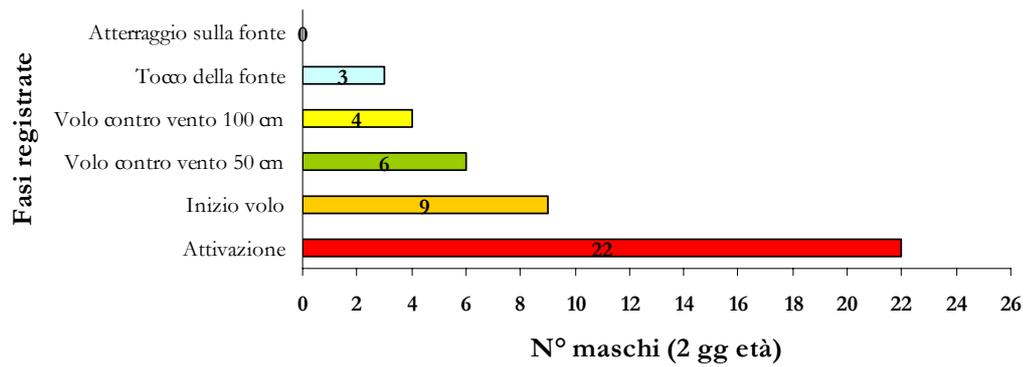
Le risposte ottenute da maschi di 1, 2, 3 e 4 giorni di età al feromone sessuale sintetico emesso da erogatori plastici sono mostrate nei grafici di seguito (graf. 2):

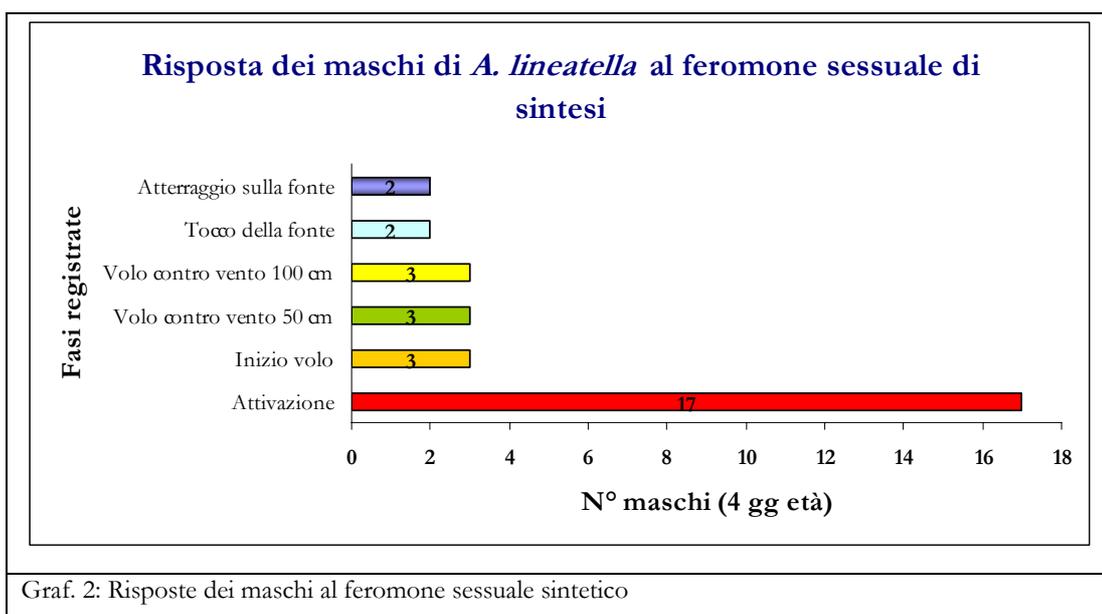


Risposta dei maschi di *A. lineatella* al feromone sessuale di sintesi



Risposta dei maschi di *A. lineatella* al feromone sessuale di sintesi





Come si può osservare dai grafici la percentuale di attivazione dei 12 maschi di un giorno di età nei confronti del feromone sintetico è stata dell'83 %, di questi il 58 % ha iniziato il volo, il 42 % ha effettuato il volo a 50 cm ma solo il 33 % si è spinto fino a 100 cm e il 25 % ha toccato la fonte. Il 17 % è arrivato a destinazione atterrando sulla fonte.

Dei 26 maschi di 2 giorni di età utilizzati l'85 % si è attivato, di questi il 35 % ha iniziato il volo riducendo al 23 % il numero di maschi che hanno effettuato il volo contro vento a 50 cm, il 15 % ha continuato il volo fino a 100 cm ma solo il 12 % dei maschi ha toccato la fonte. Nessun maschio di 2 giorni di età ha effettuato l'atterraggio sulla fonte.

Tutti i maschi di 3 giorni di età sono attivati dal feromone sessuale di sintesi ma solo il 41 % ha iniziato il volo ed ha effettuato il volo contro vento fino a 50 cm. La percentuale si è successivamente ridotta a 36 % di maschi che hanno effettuato il volo a 100 cm, il 27 % ha toccato la fonte e solo il 18 % ha terminato il percorso atterrando sulla fonte.

Con i maschi di 4 giorni di età (20 maschi usati per la prova) l'85 % si è attivato ma di questi solo il 15 % ha iniziato il volo e lo ha proseguito a 50 e 100 cm. Il 10 % ha effettuato il tocco e l'atterraggio sulla fonte.

DISCUSSIONI

Le prove effettuate in laboratorio hanno evidenziato che i maschi di *A. lineatella* vengono attivati dal feromone sessuale, sia quello prodotto ed emesso dalle femmine sia quello erogato dai *dispensers* plastici; di questi maschi però, a conferma di quanto riportato in letteratura per altre specie di lepidotteri, solo una piccolissima percentuale ha effettuato il volo orientato e si è spinta fino alla fonte atterrando sopra.

Molti dei maschi usati nelle prove hanno mostrato segni di attivazione, ma poi non hanno volato e si sono posati sul fondo del tunnel del vento, altri invece hanno iniziato a volare ma una volta usciti dalla "piuma" prodotta dal feromone (sia naturale che sintetico) non sono più stati capaci di orientarsi mentre alcuni maschi hanno volato verso la fonte ma poi hanno scelto altre destinazioni.

Bisogna inoltre discriminare nell'utilizzo delle due fonti di feromone:

- si è riscontrata una certa difficoltà nell'utilizzo delle femmine come fonte attrattiva probabilmente dovuta al fatto che la femmina non è in grado di emettere il feromone sessuale con modalità regolare e continua, pertanto è risultato difficile in alcuni casi registrare le risposte da parte dei maschi. In questi casi infatti, la mancata attivazione del maschio poteva essere dovuta

alla non emissione del feromone da parte della femmina e non ad una cattiva capacità di percezione sensoriale da parte del maschio.

A conferma di quanto appena detto sono state eseguite prove con gli stessi maschi che non avevano permesso di registrare alcun dato con l'utilizzo delle femmine come fonte attrattiva, messi a contatto con il feromone sessuale di sintesi; il risultato di queste prove è stata l'attivazione dei maschi e per alcuni di essi anche il volo orientato verso la fonte.

- l'utilizzo del feromone sessuale di sintesi come fonte attrattiva ha permesso invece di ottenere risposte più regolari da parte dei maschi; questo è stato possibile grazie al fatto che l'erogazione del feromone sintetico avviene in modo più continuo e costante.

I migliori risultati registrati come risposta comportamentale (cioè la registrazione di tutte le sei fasi) si sono ottenuti utilizzando feromone sintetico come fonte attrattiva e maschi vergini di tre giorni di età.

3.2. EFFETTO DELL'ETÀ DI ACCOPPIAMENTO SULLA FECONDITÀ

Il metodo della confusione consiste nella distribuzione in campo di feromoni sintetici che, pur agendo in modi differenti a seconda delle formulazioni, hanno come scopo dichiarato l'inibizione degli accoppiamenti. I risultati in termini di riduzione di danno possono essere estremamente positivi, ciononostante anche in campi in cui non vengono registrati danni, possono essere trovati numeri non trascurabili di femmine fecondate. Il fatto che, nonostante l'accoppiamento, non vi sia un attacco larvale correlabile, viene attribuito al fatto che alcuni maschi riuscirebbero a trovare una femmina, ma solo dopo lunghe ricerche, anche di più giorni. Si può presumere che questi accoppiamenti siano scarsamente fertili, ma non ci sono dati certi. Allo scopo di poter meglio valutare tale fenomeno sono state condotte prove sulla fertilità di *A. lineatella* predisponendo prove di laboratorio che prevedevano il contatto per 24 ore di maschi e femmine di età diverse.

Lo studio sul comportamento riproduttivo di *A. lineatella* è stato effettuato impostando le prove su due blocchi sperimentali: nel primo blocco, le femmine vergini di tre giorni di età sono state messe a contatto con i maschi vergini di età differenti (da 1 a 7 giorni, 10 e 15 giorni di età), mentre nel secondo blocco maschi vergini di tre giorni di età sono stati messi a contatto con femmine vergini di età differenti (da 1 a 7 giorni, 10 e 15 giorni di età).

Gli insetti utilizzati nelle prove sono stati condizionati alla temperatura, fotoperiodo e umidità tipiche dell'allevamento come già spiegato nel capitolo II.

➤ **MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:**

Le prove sono state eseguite in cella climatizzata (quella già in uso per l'allevamento) ad una temperatura di 23° C e 65 % di umidità ed un fotoperiodo L:D=15:9.

I maschi e le femmine raccolti giornalmente dell'allevamento venivano separati e tenuti in disparte fino al raggiungimento dell'età idonea alla conduzione delle prove. I contenitori utilizzati per le prove erano bottiglie di plastica della capacità di 1,5 litri (fig. 11), in cui gli insetti inseriti all'interno rimanevano a contatto tra loro per un tempo massimo di 24 ore. Trascorso questo tempo i maschi venivano separati dalle femmine per poter essere riutilizzati in allevamento mentre le femmine venivano messe a deporre singolarmente in provette di vetro con striscia di feltro blu e sostanze nutritive per adulti. Trascorsi 8 giorni le strisce di ogni provetta venivano controllate per osservare l'ovideposizione (fig.12) e dopo altri 4 giorni si controllava la fecondità osservando le larve nate. Dopo due giorni consecutivi in cui non è più stata registrata la presenza di larve neonate le prove si sono ritenute concluse.

Sono state eseguite tre repliche per prova con una densità di insetti pari a 10 maschi e 10 femmine di tutte le età in ogni bottiglia.



Fig. 11: Bottiglie usate per la prova



Fig. 12: Uova deposte su strisce di feltro

RISULTATI

I dati sono stati registrati come numero medio di uova deposte e schiuse, percentuale di femmine deponenti e fecondità di *A. lineatella* come rapporto tra larve e uova deposte.

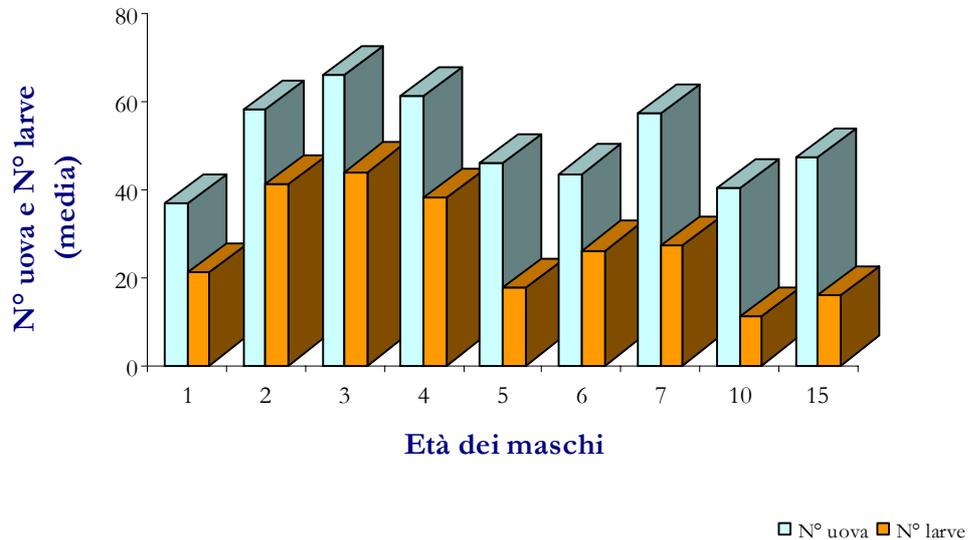
Tenendo fissa l'età delle femmine a 3 giorni e variando invece l'età dei maschi si può osservare un incremento nella deposizione delle uova da 1 a 3 giorni, momento in cui si ottiene il picco dell'ovideposizione (si passa infatti da circa 37 a 66 come media di uova deposte) per poi assistere ad una diminuzione delle uova deposte fino a 6 giorni (il numero medio di uova deposte scende a 44). Al settimo e al quindicesimo giorno si raggiungono altri due picchi di deposizione (57 e 47 come media di uova deposte).

Un andamento analogo si può osservare esaminando il numero di larve nate, infatti la quantità di larve maggiore si ottiene utilizzando maschi di tre giorni di età (il numero medio di larve nate è 44).

Aumentando l'età dei maschi a 7 e 15 giorni nonostante il picco di deposizione delle uova sia alto, il numero medio di larve ottenute è estremamente basso (27 e 16 rispettivamente).

I risultati delle prove sono mostrati nel grafico 3.

Fecondità di *A. lineatella* (femmine di 3gg)



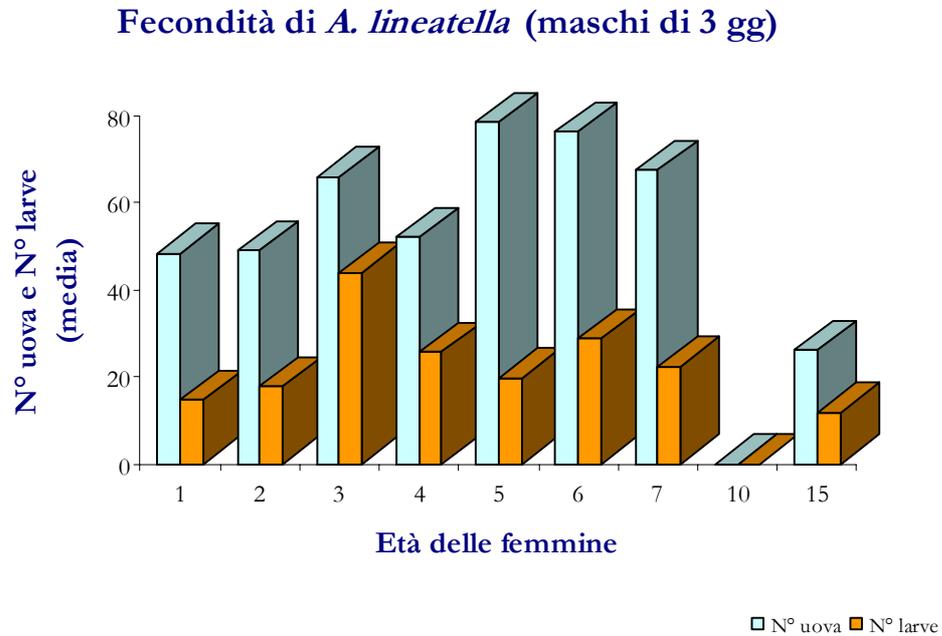
Graf. 3: Fecondità delle uova variando l'età dei maschi

Mantenendo invece fissa a 3 giorni l'età dei maschi e variando quella delle femmine si può osservare un primo picco di deposizione utilizzando femmine di tre giorni di età, ed altri tre picchi di deposizione delle uova impiegando femmine di 5, 6 e 7 giorni di età (rispettivamente il numero medio di uova nei quattro picchi è di 66, 79, 76 e 67).

Analogamente a quanto riscontrato nelle prove precedenti, l'impiego di femmine di tre giorni di età ha permesso di ottenere il maggior numero di larve nate (44) mentre nei picchi di deposizione riscontrati con età più grandi il numero medio di larve ottenute è estremamente diminuito; 19,7 larve nate con l'uso di femmine di 5 giorni, 29 larve nate con femmine di 6 giorni di età e 21 larve nate con femmine di 7 giorni di età.

Si può inoltre osservare come femmine di 10 giorni non hanno deposto nessun uovo.

I risultati delle prove sono mostrati nel grafico 4.



Graf. 4: Fecondità delle uova variando l'età delle femmine

DISCUSSIONE

Ciò che è scaturito da queste prove è che variando l'età dei maschi e mantenendo fissa a tre giorni l'età delle femmine, il numero più alto di uova deposte e di uova schiuse si ottiene quando le femmine vengono accoppiate con maschi di due, tre e quattro giorni di età. Aumentando l'età dei maschi, la deposizione delle uova può sia diminuire che crescere, ma ciò che si riduce drasticamente è la schiusa delle uova stesse (a sette giorni di età dei maschi infatti c'è un picco di deposizione ma la schiusa delle uova supera di poco il 10%).

Mantenendo invece fissa l'età dei maschi e variando quella delle femmine il numero più alto di uova deposte e uova schiuse si ottiene quando i

maschi vengono accoppiati con femmine di tre e quattro giorni di età; dal quinto giorno in poi si assiste ad un incremento di deposizione nelle uova ma con una percentuale di schiusa decisamente minore.

Si potrebbe quindi supporre che il ritardo negli accoppiamenti segnalato da molti autori in letteratura associato all'utilizzo della confusione sessuale come mezzo di controllo per *A. lineatella*, non dovrebbe in alcun modo compromettere la validità del metodo, questo per due motivi:

- 1) la produzione non viene compromessa soprattutto se si utilizzano varietà precoci
- 2) l'eventuale danno sui germogli rimane comunque contenuto a causa dello scarso numero di larve nate dalle uova derivanti dagli accoppiamenti ritardati (come si è potuto osservare dalle prove di laboratorio le femmine vecchie depongono poche uova fecondate).

3.3. VALUTAZIONE DEGLI ACCOPPIAMENTI CON LA TECNICA DELLA DISSEZIONE

La verifica dell'avvenuto accoppiamento in femmine di *A. lineatella* nelle prove svolte ha richiesto tempi di attesa lunghi (almeno 8 giorni per la deposizione delle uova dopo la separazione degli insetti mantenendo le femmine in ambiente controllato e almeno altri 7 giorni per l'osservazione della comparsa delle larve).

Per cercare di velocizzare l'osservazione dell'avvenuto accoppiamento si è quindi cercato di applicare la tecnica della dissezione delle femmine, per altro utilizzata comunemente con successo per *C. molesta* e *C. pomonella*.

➤ MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:

Sono stati prelevati dall'allevamento individui maschi e femmine di *A. lineatella* di differente età; dopo diversi periodi questi insetti sono stati messi a contatto per 24, 48 e 72 ore; separati i maschi e rimessi in allevamento le femmine sono state prelevate e sezionate al fine di poterne osservare l'avvenuto accoppiamento.

Sono state osservate femmine vergini di 1, 2, 3 e 5 giorni di età e femmine accoppiate di 1, 2 e 3 giorni di età.

Tutte le femmine sono state trattate con una dose di CO₂ al fine di poterle dissezionare ed osservare allo stereomicroscopio.

Dopo aver immerso gli insetti in una soluzione di alcol etilico a 60° è stata operata l'asportazione del capo e del torace e l'apertura dell'addome per poterne osservare il materiale interno.

L'apertura dell'addome è avvenuta in glicerina operando con delle piccole forbici ed uno spillo per mantenere franca la parte iniziale dell'addome stesso.

E' stato separato tutto il materiale fino al riconoscimento, all'interno della femmina, della borsa copulatrice che si trova verosimilmente nella parte terminale dell'addome ove è presente l'apparato riproduttore.

RISULTATI

Nei numerosi tentativi di dissezione delle femmine di anarsia solo in due casi è stato possibile rinvenire la spermatofora integra (fig. 8).

La spermatofora presente nella borsa copulatrice di *C. pomonella* è facilmente riconoscibile, la fig. 9 mostra come le membrane che compongono la *bursa* di questo lepidottero siano traslucide e si denota la loro turgidità data appunto dal rigonfiamento rappresentato dalla spermatofora ancora piena al suo interno. Nella parte centrale della *bursa* è ben delineato il *signum* di colore arancio.



Fig. 8: Borsa copulatrice di *A. lineatella* e spermatofora



Fig. 9: Borsa copulatrice di *C. pomonella* con spermatofora all'interno

Sono state effettuate dissezioni di femmine vergini e femmine accoppiate di diversi giorni di età al fine di poterne osservare eventuali differenze di conformazione e colore della borsa copulatrice. Nonostante siano state osservate in alcuni casi alcune piccole differenze tra le borse di femmine vergini e accoppiate, allo stato attuale non risulta possibile rilevare con certezza l'avvenuto accoppiamento attraverso la tecnica della dissezione.

Come mostrato nelle figure 10 e 11, sia la borsa copulatrice di *A. lineatella* vergine che quella di *A. lineatella* accoppiata presentano verosimilmente le stesse dimensioni, presentano un avvallamento centrale nella parte anteriore dove ha sede il *signum* ed hanno una colorazione bianco giallastra.

A volte può capitare che nelle femmine vergini di 1 o 2 giorni di età la *bursa* si presenti con le membrane quasi trasparenti, ma è un dato che si è riscontrato non ripetibile nel tempo, cioè altre femmine di *A. lineatella* nelle stesse condizioni non hanno mostrato tale caratteristica.



Fig.10: Borsa copulatrice di femmina accoppiata Fig. 11: Borsa copulatrice di femmina vergine

DISCUSSIONE

In *A. lineatella* il rinvenimento della spermatofora nella *bursa* con il metodo della dissezione è molto difficoltoso, questo può dipendere dal fatto che la consistenza della spermatofora in questo insetto sia flaccida per cui, nelle difficili operazioni di dissezione che richiedono tempo e manualità la spermatofora possa rompersi nel delicato atto del taglio o che la spermatofora venga rotta della femmina subito dopo l'accoppiamento per cui risulta impossibile ritrovarla all'interno della borsa copulatrice.

Inoltre non si manifestano differenze significative né di colore né di forma in borse copulatrici di femmine vergini e femmine presumibilmente accoppiate.

Si può quindi affermare che la dissezione delle femmine di *A. lineatella* non permette di ottenere risultati certi dell'avvenuto accoppiamento; l'unico metodo sicuro per valutare lo stato di accoppiamento rimane quello di separare maschi e femmine dopo il presunto accoppiamento, attendere la deposizione delle uova e verificarne la schiusa dopo un determinato periodo di tempo.

CAPITOLO IV

4. STUDIO SULL'EFFICACIA DEL METODO DELLA CONFUSIONE SESSUALE CON L'UTILIZZO DI DIFFERENTI MISCELE FEROMONICHE DI SINTESI

PREMESSA

In base a osservazioni di campo è emerso che il diverso contenuto di alcol ((*E*)5-10:OH) delle miscele feromoniche può influire sulla capacità delle stesse di inibire gli accoppiamenti di *A. lineatella*; pertanto sono state condotte diverse sperimentazioni in laboratorio per verificare questa indicazione.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di verificare l'influenza del contenuto di alcol ((*E*)5-10:OH) sulla capacità di inibizione degli accoppiamenti. Sono state condotte quindi prove sottoponendo gli insetti a differenti concentrazioni di feromone in modo da verificare eventuali differenze di attività delle diverse miscele, differenze che emergerebbero con evidenza maggiore alle minori concentrazioni.

Alcune prove sono state effettuate anche con differenti densità di popolazione, poiché una maggiore densità di popolazione determina una maggiore probabilità di accoppiamento, evidenziando più chiaramente i limiti di efficacia della miscela utilizzata.

4.1. PROVE CON L'UTILIZZO DI MISCELE CONTENENTI DIFFERENTI PERCENTUALI DI ALCOL

Sono state condotte diverse sperimentazioni per verificare l'efficacia di tre diverse miscele di feromone sintetico contenenti differenti percentuali di alcol nell'impedire gli accoppiamenti di *Anarsia lineatella*.; la prima miscela, utilizzata comunemente anche nei prodotti commerciali per la confusione, conteneva l'1% di E5-10OH definita anche *low alcohol* (denominata in seguito 1-OH), e le altre due miscele contenevano rispettivamente il 5% (5-OH) e il 15% (15-OH) di E5-10OH. La miscela contenente il 15 % di alcol è definita anche *natural blend* perché contiene approssimativamente la stessa percentuale di alcol presente nel feromone sessuale prodotto dalle femmine di *A. lineatella* descritto da Roelofs *et al.* nel 1975.

➤ **MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:**

Tre maschi e tre femmine vergini di *A. lineatella* sono stati collocati per un periodo di 48 ore all'interno di contenitori di plastica trasparente da 1,5 litri appositamente costruiti per queste sperimentazioni.

In ogni prova sono stati utilizzati 10 contenitori (con 6 insetti ciascuno, tutti di 3 giorni di età) per un totale di 60 insetti per prodotto e per replica. I contenitori sono stati posti in tunnel del vento, con una corrente pari a 0,20 m/s e per tutto il periodo di prova sono stati mantenuti ad una temperatura variabile tra 20 °C e 24 °C e un fotoperiodo L:D = 15:9.

Trascorse le 48 ore, i maschi sono stati separati dalle femmine e queste ultime sono state poste singolarmente a ovideporre in cella a 23 °C e 65% UR in provette di vetro; dopo una settimana si è controllata la ovideposizione allo stereo microscopio e dopo altri 4 giorni è iniziato il controllo delle nascite.

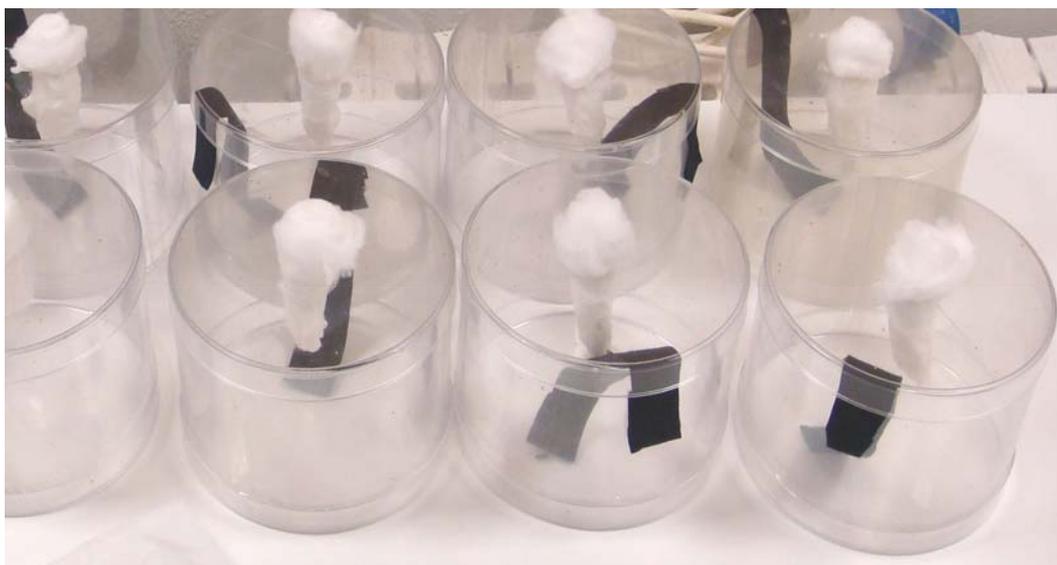


Fig. 1: Contenitori trasparenti utilizzati nelle prove

All'interno di ciascun contenitore è stata introdotta una striscia di feltro per l'ovideposizione; è stato utilizzato feltro blu per facilitare l'osservazione allo stereoscopio delle uova deposte, ed è stata posta dell'ovatta imbevuta di sostanze zuccherine per il nutrimento degli adulti (fig. 1).

Con queste modalità di prova sono stati ottenuti risultati sui testimoni non trattati con feromoni mentre per la valutazione dell'inibizione dell'ovideposizione sono stati utilizzati i tre prodotti 1-OH, 5-OH e 15-OH.

Le prove di valutazione dell'inibizione degli accoppiamenti si sono svolte come nel caso dei testimoni in gabbie appositamente costruite contenenti sia la striscia di feltro blu sia l'ovatta per il nutrimento degli adulti e in aggiunta, una striscia di carta assorbente imbevuta di 1 μ l di feromone diluito in esano lasciata nella gabbia per un'ora e mezza (procedura effettuata anche il giorno successivo per mantenere nelle 48 ore una adeguata concentrazione di feromone nella scatola) (fig. 2). Anche in questo caso, trascorse le 48 ore, sono stati rimossi i maschi e le scatole



Fig. 2: Contenitori per le prove di inibizione degli accoppiamenti

con le femmine sono state poste in cella con le stesse condizioni di umidità, temperatura e fotoperiodo dei testimoni.

Per ciascun prodotto sono state effettuate tre diluizioni in esano (1:10, 1:100, 1:1000) e per ogni gruppo di diluizione è stata

sempre effettuata la prova testimone. L'obiettivo era quello di verificare se le miscele erano in grado di determinare la completa inibizione degli accoppiamenti e quali miscele riuscivano a esercitare la maggiore inibizione anche alle concentrazioni più basse (1:100, 1:1000).

Sono state condotte 2 repliche per la diluizione 1:10 e tre repliche per le altre due diluizioni.

Le miscele utilizzate nelle prove erano all'interno di erogatori di materiale plastico a forma di capillari; questi sono stati tagliati ed è stata estratta la soluzione al fine di poterla utilizzare nelle prove di laboratorio.

Il prodotto estratto è stato mantenuto in frigorifero a 4 °C e posto a temperatura ambiente per almeno due ore prima di ciascuna prova

Poiché il comportamento riproduttivo di *Anarsia lineatella* è molto variabile, sono state effettuate prove preliminari per determinare il tempo di contatto tra maschi e femmine e il numero di individui necessari per ottenere un'ovideposizione abbastanza regolare nel testimone anche in funzione dei risultati ottenuti con le prove dell'effetto dell'età di accoppiamento sulla fecondità descritte nel precedente capitolo.

La valutazione dell'efficacia dei prodotti saggiati è avvenuta sia calcolando il numero di uova deposte sulle strisce di feltro sia calcolando la percentuale di femmine deponenti; sono state quindi osservate tutte le strisce allo stereoscopio, contate tutte le uova presenti e verificata la fertilità controllando nel tempo la schiusa delle uova stesse.

RISULTATI

I risultati ottenuti nelle prove con diluizione 1:10, 1:100 e 1:1000 sono mostrati nei grafici 1, 2 e 3 rispettivamente.

I dati nei grafici sono riportati come numero di uova deposte e mostrano inoltre il numero di femmine che hanno ovideposto (numero di riquadri evidenziati in rosso su ogni colonna relativa ai prodotti e al testimone); a questo proposito nel testimone il 60 % delle femmine ha ovideposto in quasi tutte le repliche.

In tutti i casi con diluizione 1:10, pari a 0,1 µl di feromone, gli accoppiamenti sono stati impediti.

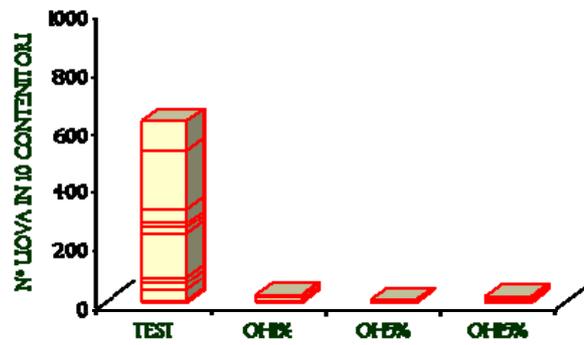
Nelle prove con le diluizioni inferiori, gli accoppiamenti e le ovideposizioni sono stati complessivamente sempre inferiori al testimone, ma con risultati molto più variabili.

Nella diluizione 1:100 pari a 0,01 μ l di feromone, nonostante si sia comunque rilevata una diminuzione dell'ovideposizione rispetto ai testimoni, si può osservare come le miscele 1-OH e 15-OH abbiano prodotto risultati discordanti nelle diverse repliche mentre il 5-OH pare che a questa diluizione riesca ancora a mantenere la sua efficacia.

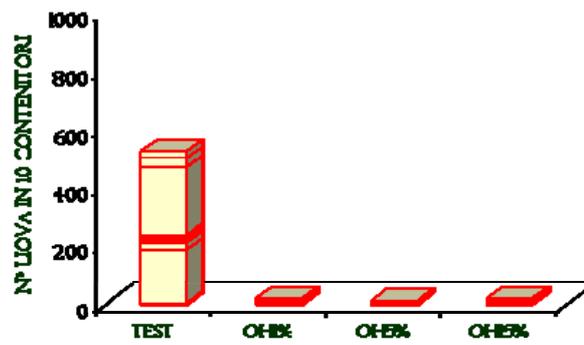
Nelle prove con diluizione 1:1000 pari a 0,001 μ l di feromone è ancora più evidente l'incapacità delle miscele di mantenere la stabilità nell'inibizione degli accoppiamenti.

Si può infatti osservare come il 5-OH nella prima replica risulti essere meno efficace mostrando una ovideposizione molto simile a quella prodotta nel testimone

PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE H0 (REPLICA 1)

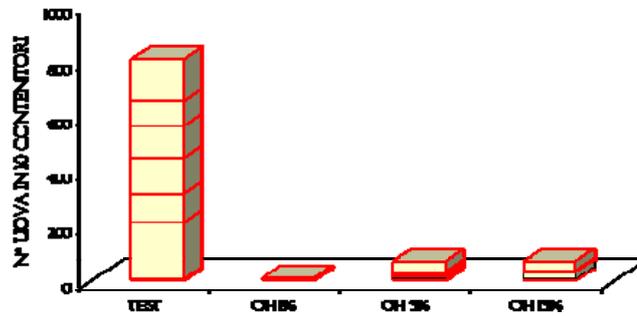


PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE H0 (REPLICA 2)

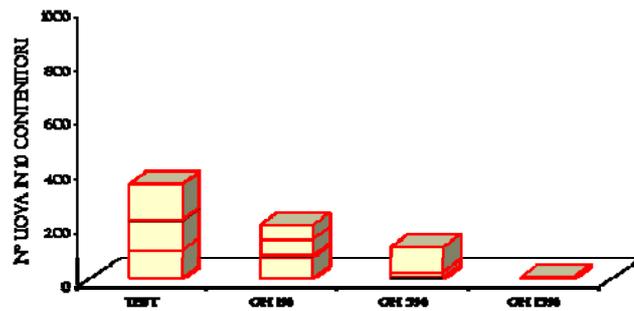


Graf. 1: Risultati della diluizione 1:10

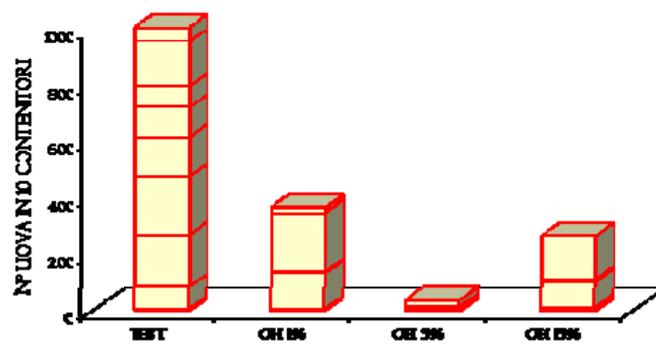
**PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE 1:100 (REPLICA 1)**



**PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE 1:100 (REPLICA 2)**

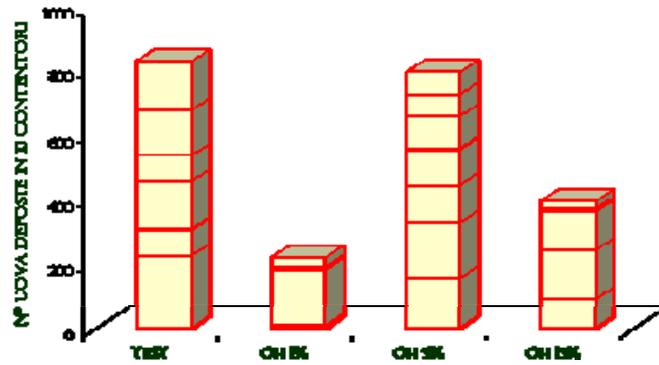


**PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE 1:100 (REPLICA 3)**

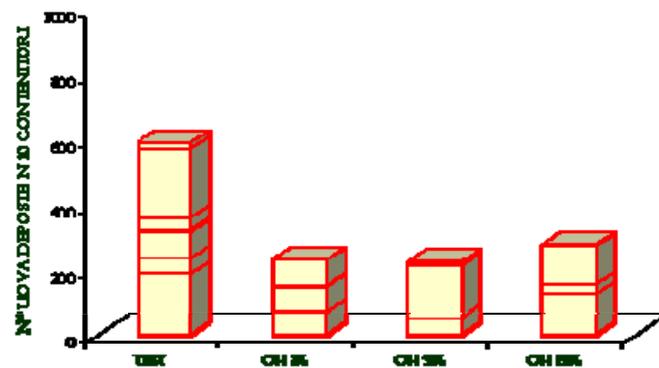


Graf. 2: Risultati della diluizione 1:100

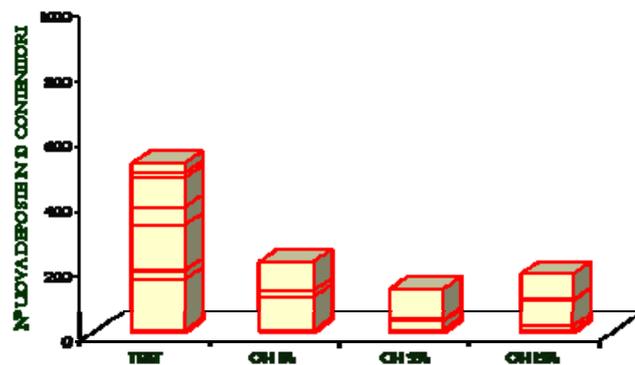
PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE 1:1000 (REPLICA 1)



PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE 1:1000 (REPLICA 2)



PROVE DI OVIDEPOSIZIONE IN A LINEATELLA
DILUIZIONE 1:1000 (REPLICA 3)



Graf. 3: Risultati della diluizione 1:1000

DISCUSSIONE

Nonostante l'elevato numero di insetti in uno spazio ristretto, che determina un'elevata probabilità di incontro tra i sessi, e nonostante la prova sia stata protratta per 48 ore, la presenza di feromone ha comunque sempre determinato un ostacolo per gli accoppiamenti. Nelle tesi in cui è stato somministrato 0,1 μ l di feromone, la riduzione degli accoppiamenti è sempre stata drastica. Con le dosi più basse (0,01 μ l e 0,001 μ l) i risultati ottenuti nelle varie repliche hanno mostrato una crescente variabilità.

La riduzione del numero di uova deposte può dipendere sia da una bassa deposizione in molti contenitori, sia da una sporadica deposizione in solo alcuni contenitori. In termini pratici l'obiettivo che ci si prefigge quando si applica il metodo della confusione è comunque la riduzione della discendenza, è quindi più confortante un test in cui l'ovideposizione è completamente inibita in una elevata percentuale di casi (nel caso delle prove in tunnel del vento l'inibizione in più contenitori).

Complessivamente, si osserva che tutte le miscele determinano una diminuzione dell'ovideposizione e in base a questa evidenza si può affermare che le prove effettuate siano affidabili dimostrando che il feromone sintetico sia in grado di indurre affaticamento sensoriale, riducendo la capacità riproduttiva di *A. lineatella*.

Nel confronto con i risultati di precedenti sperimentazioni di campo, è importante sottolineare che in tunnel del vento la percentuale reale di alcol può ritenersi uguale alla percentuale nominale, a differenza delle prove di campo, in cui la diffusione mediata dall'erogatore rilascia una miscela con minore percentuale di alcol.

Inoltre la riduzione della capacità riproduttiva in laboratorio possono essere attribuibile quasi esclusivamente ad un affaticamento sensoriale, mentre in campo possono intervenire altri meccanismi, quali ad es. *False Trail Following*, per i quali la composizione del *blend* rilasciato dagli erogatori può avere significati differenti; è infatti noto che per ottenere l'attrazione è spesso necessaria una miscela più vicina a quella naturale rispetto a quella necessaria per ottenere un affaticamento sensoriale, che può essere ottenuto anche con il solo componente principale.

4.2. PROVE CON MISCELE FEROMONICHE DIFFERENTI E DENSITA' DIVERSE DI POPOLAZIONE

Sono state svolte prove di confronto tra sette differenti miscele di feromone sintetico al fine di valutarne l'efficacia nell'inibire gli accoppiamenti di *A. lineatella*.

L'efficienza delle diverse miscele è stata valutata anche utilizzando due differenti densità di popolazione.

➤ MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:

Adulti di *A. lineatella* di tre giorni di età sono stati posti all'interno di bottiglie di plastica di un volume pari a 1,5 litri; per ciascuna prova sono state utilizzate quattro bottiglie che sono state poste all'interno di contenitori di plastica trasparente delle dimensioni di 30x40x50 cm (fig. 1a) appositamente modificate con l'aggiunta di piccole ventole per l'entrata e l'uscita di un flusso d'aria in modo tale da evitare ristagni di feromone all'interno della scatola stessa (fig. 1b).



Fig. 1a: Contenitore di plastica trasparente



Fig. 1b: Particolare della ventola installata

La corrente d'aria nella scatola era pari a 20 cm/s, la temperatura variabile tra 20 e 23 ° C e il fotoperiodo di L:D=15:9.

Al fine di valutare l'efficacia dei prodotti in condizioni di differente densità di popolazione, sono state effettuate prove con cinque e dieci coppie di adulti di *Anarsia lineatella*.

All'interno di ciascuna bottiglia sono state posizionate una striscia di feltro per l'ovideposizione (è stato utilizzato feltro blu per facilitare l'osservazione allo stereoscopio delle uova deposte) e dell'ovatta imbevuta di sostanze zuccherine per il nutrimento degli adulti.

Le bottiglie sono state lasciate nelle scatole per un periodo di tempo di 48 ore, dopo di che le femmine sono state poste singolarmente in provette di vetro del volume di 200 ml circa, chiuse con un tulle e contenenti dell'ovatta imbevuta di sostanze zuccherine per il nutrimento delle femmine (Fig.2).

In ogni provetta è stata posta una striscia di feltro blu per il conteggio delle uova deposte.



Fig. 2: Ovideposizione delle femmine in provette

ottenere un riferimento (testimone) per le prove da effettuarsi con le diverse miscele feromoniche.

Le femmine sono state lasciate in cella a 23°C e 65% UR per una settimana prima della lettura del conteggio delle uova allo stereomicroscopio.

Questa procedura è stata applicata in assenza di feromone sintetico per

Le prove di valutazione dell'efficacia dei sette prodotti si sono svolte come nel caso dei testimoni in bottiglie da 1,5 litri contenenti sia la striscia di feltro blu sia l'ovatta per il nutrimento degli adulti e in aggiunta, una striscia di carta assorbente imbevuta di 1 µl di feromone diluito in esano lasciata nella bottiglia per un'ora e mezza (procedura effettuata anche il giorno successivo per mantenere nelle 48 ore una adeguata concentrazione di feromone). Anche in questo caso, trascorse le 48 ore, sono stati rimossi i maschi mentre le femmine sono state messe in cella in provette di vetro con le stesse condizioni di umidità, temperatura e fotoperiodo del testimone non trattato.

Per ciascun prodotto sono state effettuate tre diluizioni in esano (1:10, 1:100, 1:1000) e per ogni gruppo di diluizione è stata sempre effettuata la prova testimone.

Le diverse miscele, racchiuse in piccoli contenitori di vetro sigillati e siglati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla G, sono state mantenute in frigorifero a 4°C e poste successivamente a temperatura ambiente per circa due ore prima delle prove.

Tipo	A	B	C	D	E	F	G
E5-10:Ac	95	90	95	95	95	95	85
E5-10:OH	5	10	5	5	5	5	15
E3E5+ZE3Z5-10:Ac			2	5			
E/Z7-10:Ac					2	5	

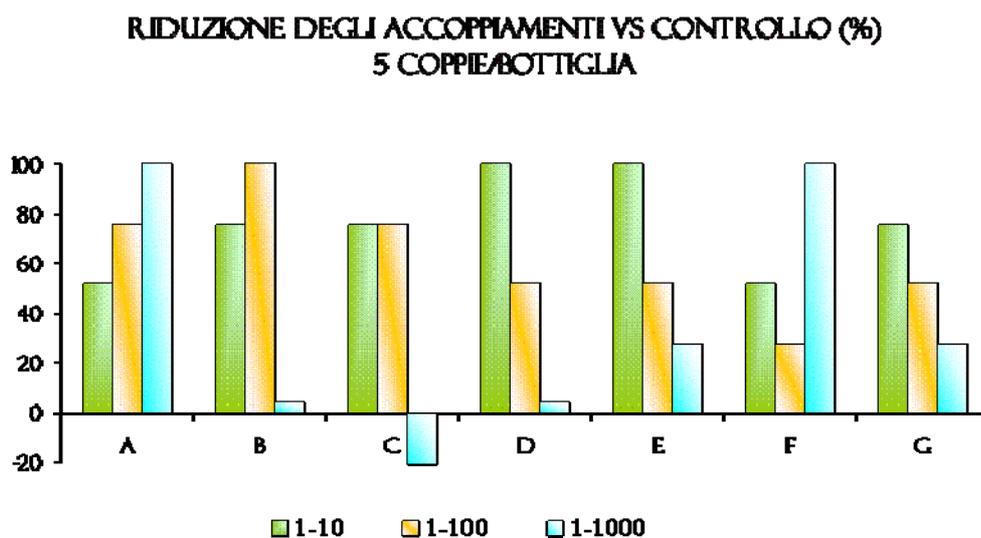
Tab. 1: Componenti delle miscele testate

Le composizioni delle varie miscele sono riportate nella tabella 1; nelle miscele sono stati introdotti anche i componenti che Millar e Rice nel 1992 avevano identificato come antagonisti e forti soppressori delle catture nei maschi di anarsia):

RISULTATI

La valutazione dell'efficacia dei prodotti considerati è avvenuta contando il numero di uova deposte osservando tutte le strisce di feltro allo stereo microscopio; per tutti i prodotti utilizzati e per il testimone è stata inoltre verificata la fertilità delle uova controllandone nel tempo la schiusura.

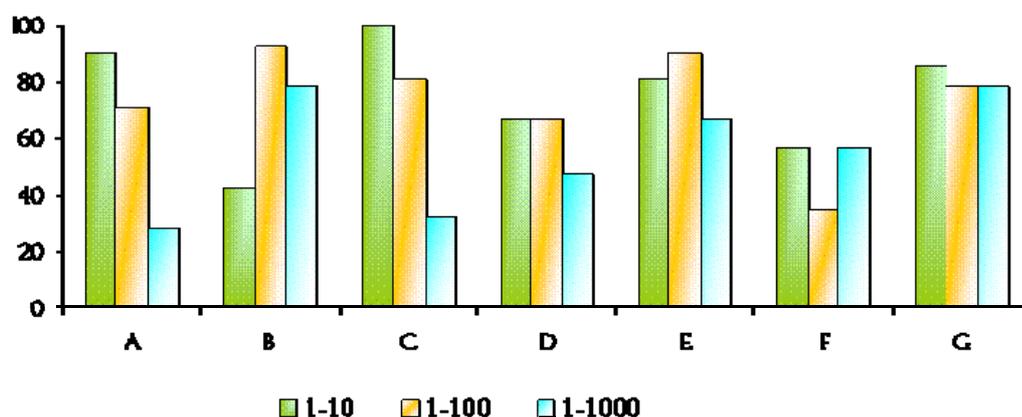
I risultati ottenuti dalle prove sono stati espressi in termini di riduzione degli accoppiamenti rispetto al controllo non trattato come mostrato nei grafici 1 e 2.



Graf. 1: Inibizione degli accoppiamenti con densità di popolazione 5 coppie/bottiglia

Le prove condotte con una densità di popolazione pari a 5 maschi e 5 femmine in bottiglia hanno manifestato scarsa ovideposizione nel testimone in tutte le repliche effettuate, è stato pertanto difficile valutare l'efficacia delle differenti miscele a diversa diluizione dovendole confrontare con testimoni aventi un numero così basso di uova deposte. Come si può osservare dal grafico 1, da queste prove sono stati ottenuti risultati eterogenei nelle tre diluizioni e per tutti i prodotti; nella miscela **A** contenente il 5 % di E5-10OH con la diluizione 1:1000 si è ottenuta la maggiore riduzione degli accoppiamenti (100%) rispetto alle altre due diluizioni, risultato un po' anomalo visti i dati ottenuti dalle prove precedenti. Anche la miscela **F** contenente E5-10:Ac, E5-10:OH e E/Z7-10:Ac (componente antagonista secondo Millar e Rice, 1992) in rapporto 95:5:5 ha mostrato risultati simili alla miscela **A**. Le miscele **B** (E5-10:Ac; E5-10:OH con rapporto 90:10), **D** (E3E5+ZE3Z5-10:Ac; E5-10:OH; E5-10:Ac con rapporto 95:5:5), **E** (E5-10:Ac; E/Z7-10:Ac; E5-10:OH con rapporto 95:5:2) e **G** (E5-10:Ac; E5-10:OH con rapporto 85:15) hanno mostrato risultati con andamenti simili dove la maggior inibizione si è ottenuta con la diluizione 1:10 e poi diminuita con le diluizioni più basse; nella miscela **B** la diluizione 1:100 ha inibito di più della diluizione 1:10 (si è infatti passati da una riduzione dell'80% della diluizione 1:10 al 100% della diluizione 1:1000 sempre rispetto al testimone). Infine, i risultati ottenuti con la miscela **C** (E5-10:Ac; E5-10:OH; E3E5+ZE3Z5-10:Ac con rapporto 95:5:2) hanno mostrato una riduzione uguale della miscela alle diluizioni 1:10 e 1:100 (80%) ma alla diluizione più bassa si è registrato un 20% di deposizione in più rispetto al testimone non trattato.

RIRUZIONE DEGLI ACCOPPIAMENTI VS CONTROLLO (%) 10 COPPIE/BOTTIGLIA



Graf. 2: Inibizione degli accoppiamenti con densità di popolazione 10 coppie/bottiglia

Le prove condotte con 10 maschi e 10 femmine per bottiglia hanno prodotto alta ovideposizione nel testimone in tutte le repliche effettuate: in questo modo si sono ottenuti risultati più omogenei per tutti i prodotti alle tre diluizioni. Le miscele **A** (E5-10:Ac; E5-10:OH con rapporto 95:5), **C** (E5-10:Ac; E5-10:OH; E3E5+ZE3Z5-10:Ac con rapporto 95:5:2), **D** (E3E5+ZE3Z5-10:Ac; E5-10:OH; E5-10:Ac con rapporto 95:5:5) e **G** (E5-10:Ac; E5-10:OH con rapporto 85:15) hanno fatto registrare la maggiore inibizione degli accoppiamenti con diluizione della miscela 1:10 in esano e minore inibizione con le diluizioni più basse; nelle miscele **B** (E5-10:Ac; E5-10:OH con rapporto 90:10) ed **E** (E5-10:Ac; E/Z7-10:Ac; E5-10:OH con rapporto 95:5:2) la maggior inibizione rispetto al testimone si è ottenuta con la diluizione 1:100 mentre nella miscela **F** (E5-10:Ac; E5-10:OH; E/Z7-10:Ac con rapporto 95:5:5) le diluizioni 1:10 e 1:1000 hanno mostrato la stessa inibizione degli accoppiamenti (60%).

DISCUSSIONE

Analogamente ai risultati ottenuti nelle prove descritte nel paragrafo 4.1., anche con questa sperimentazione si è dimostrata la minore capacità delle miscele di inibire gli accoppiamenti a basse concentrazioni di feromone. Questi dati sono sicuramente più chiari utilizzando una densità di popolazione pari a 10 maschi/gabbia dove le risposte registrate sono risultate più omogenee per tutti i prodotti testati alla diminuzione della concentrazione di feromoni.

La densità di popolazione svolge un ruolo molto importante soprattutto per quanto riguarda gli accoppiamenti registrati nei testimoni; con 5 coppie per bottiglia la deposizione nel testimone è risultata bassa rispetto all'utilizzo di 10 coppie. Probabilmente la maggior deposizione nel testimone con 10 maschi/gabbia è dovuta ad una maggiore possibilità di incontri casuali in un volume piccolo.

Le miscele **E** ed **F** contenenti piccole quantità dei composti che Millar e Rice hanno definito antagonisti e forti soppressori delle catture dei maschi di *A. lineatella*, non hanno mostrato differenze significative in termini di riduzione degli accoppiamenti rispetto alle altre miscele testate.

CAPITOLO V

5. VERIFICA IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI MISCELE FEROMONICHE DI SINTESI PER LA LOTTA CONTRO *A. LINEATELLA* E *C. MOLESTA*

PREMESSA

In base a precedenti valutazioni sulla diversa efficienza delle miscele feromoniche di sintesi a differente percentuale di alcol nell'inibire gli accoppiamenti in *A. lineatella*, sono state effettuate prove di campo per confrontare **due modelli** di erogatore per la confusione sessuale di anarsia contenenti miscele con differenti percentuali di alcol.

Poiché nei pescheti la presenza di *A. lineatella* è pressoché sempre associata a quella di *C. molesta* e l'applicazione del metodo della confusione deve spesso essere applicato per controllare entrambi gli insetti, può risultare vantaggioso disporre di un unico erogatore contenente entrambi i feromoni; è però importante verificare che la presenza contemporanea dei due feromoni non determini interazioni che riducano l'efficacia.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di:

- valutare in campo l'efficacia di due miscele di sintesi per la confusione sessuale di *A. lineatella* (PTB) a differente contenuto di alcol (Ac:OH=99:1 e Ac:OH=95:5)
- valutare se un unico *dispenser* contenente una miscela dei due feromoni sintetici di *A. lineatella* (PTB) e *C. molesta* (OFM) possa avere la stessa efficacia dei due *dispensers* contenenti ciascuno un solo feromone.

5.1. VERIFICA IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI EROGATORI COMMERCIALI E SPERIMENTALI PER LA CONFUSIONE SESSUALE DI *ANARSIA LINEATELLA*, DI *CYDIA MOLESTA* E UN DISPENSER SPERIMENTALE LA CONFUSIONE SESSUALE DI ENTRAMBE LE SPECIE

Negli anni 2007 e 2008, in diversi pescheti localizzati nella provincia di Forlì/Cesena è stata verificata l'efficacia dei prodotti per la confusione sessuale di *Anarsia lineatella* e *Cydia molesta*; in particolare, nell'anno 2007 sono stati testati i prodotti Isonet A (fig.2) e Isonet A-OH (fig.1) contenenti la miscela feromonica E5-10Ac ed E5-10OH di *A. lineatella* con rapporto differente di acetato-alcol e precisamente: Ac:OH=99:1 per il prodotto commerciale Isonet A e Ac:OH=95:5 per il prodotto sperimentale Isonet A-OH, e il prodotto sperimentale Isomate A/OFM contenente in un unico *dispenser* le miscele E5-10Ac ed E5-10OH e (Z-E)8-12Ac e Z8-12OH (fig. 3) per la confusione sessuale di *A. lineatella* e *C. molesta*.



Fig. 1: Diffusore Isonet A-OH



Fig. 2: Diffusori Isonet A e Isomate OFM rosso

Nella stagione 2008 sono stati testati i prodotti commerciali Isonet A per la confusione sessuale *Anarsia lineatella* e Isomate OFM rosso (fig. 2) per la confusione sessuale di *Cydia molesta* e ancora del prodotto sperimentale combinato Isomate A/OFM per la confusione sessuale di entrambe le specie. Tutte le miscele sono state prodotte della ditta giapponese Shin-Etsu Chemical Co. Ltd e importate in Italia da CBC (EUROPE) Ltd.



Fig. 3: Diffusore Isomate A/OFM

Tutti i prodotti si presentavano come diffusori capillari di materiale plastico ad applicazione manuale.

Il dosaggio utilizzato è stato quello indicato dalla ditta produttrice e cioè di 1.000 diffusori/ha per Isonet A, Isonet A-OH e Isomate A/OFM e di 600 diffusori/ha

per Isomate OFM rosso.

Come è noto, il metodo della confusione sessuale si basa sulla diffusione nell'ambiente frutteto del feromone sintetico analogo a quello dell'insetto *target* in maniera da creare un ambiente nel quale gli accoppiamenti vengono ridotti o ritardati diminuendo la capacità riproduttiva del fitofago.

Per verificare l'inibizione degli accoppiamenti evitando le incognite legate alla popolazione naturalmente presente nel frutteto, sempre difficilmente quantificabile, si è scelto di utilizzare "gabbie di

accoppiamento” (fig. 5), in cui viene controllato l’effetto del feromone applicato in campo sul potere attrattivo di femmine nei confronti di un numero noto di maschi (Kock *et al.* 2007).

Le gabbie per la verifica dell’inibizione degli accoppiamenti di *C. molesta* e *A. lineatella*, costituite da una intelaiatura di alluminio di 1,5 m di lato e da una rete a maglia fitta, sono state posizionate all’interno di ciascun parcellone, compreso il testimone, ad inizio stagione e lasciate fino ad esaurimento della prove, per un totale complessivo di 6 gabbie, 3 per ciascun insetto.

In ciascuna gabbia è stata inserita una trappola di monitoraggio a pagoda dove l’attrattivo non era costituito dall’erogatore impregnato di feromone sintetico, ma da due femmine vergini poste all’interno di un contenitore di rete metallica a maglie strette in maniera da lasciarle libere di muoversi e di emettere il feromone, così da riprodurre le condizioni naturali di richiamo (fig. 6).



Fig. 5: Gabbia di accoppiamento



Fig. 6: Trappola di monitoraggio

Contemporaneamente, all'interno delle gabbie è stato liberato un numero di maschi vergini di 3 giorni di età (numero variabile nei due anni di sperimentazione) allo scopo di simulare una condizione di elevata popolazione dell'insetto.

Le catture sono state registrate dopo un periodo di 3-4 notti sia negli appezzamenti di prova sia nel testimone.

La prova è stata ripetuta periodicamente fino al termine del volo naturale di *Anarsia lineatella*.

➤ **ANNO 2007:**

MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:

Nell'anno 2007 in un pescheto di 11,5 ha di superficie a conduzione biologica suddiviso in 2 parcelloni sono state predisposte due gabbie di accoppiamento, una per la sperimentazione di Isonet A ed una per la sperimentazione di Isonet AOH. In ciascuna di queste gabbie è stata collocata una trappola in cui sono state poste 2 femmine vergini di *A. lineatella*. Per queste prove la sono state testate due differenti densità di popolazione: 5 (5 prove) e 10 (8 prove) maschi vergini/gabbia.

In un secondo pescheto di 3 ha è stato applicato il prodotto Isonet A/OFM per questa sperimentazione sono state predisposte due gabbie di accoppiamento, una per *A. lineatella* e una per *C. molesta*. In ciascuna di queste gabbie è stata collocata una trappola in cui sono state poste le rispettive due femmine vergini dell'insetto *target*. La densità di popolazione utilizzata nelle prove è stata di 10 maschi vergini/gabbia (5 prove effettuate) per ciascuna specie.

Nelle vicinanze, a circa 500 m, è stato individuato un appezzamento di pesco a conduzione “convenzionale” dove la difesa dai fitofagi è stata condotta mediante metodi di lotta tradizionali, nel quale sono state predisposte due gabbie di accoppiamento una per *C. molesta* e una per *A. lineatella* utilizzate come testimoni di riferimento.

L'applicazione dei *dispensers* è stata effettuata il giorno 02.05.07 per Isonet A e Isonet A-OH e il giorno 29.03.07 per Isomate A/OFM, per il controllo di quest'ultimo insetto, nei due parcelloni con Isonet A e Isonet A-OH è stato applicato in data 22.03.07 il diffusore Isomate OFM rosso commercializzato dalla medesima ditta.

RISULTATI

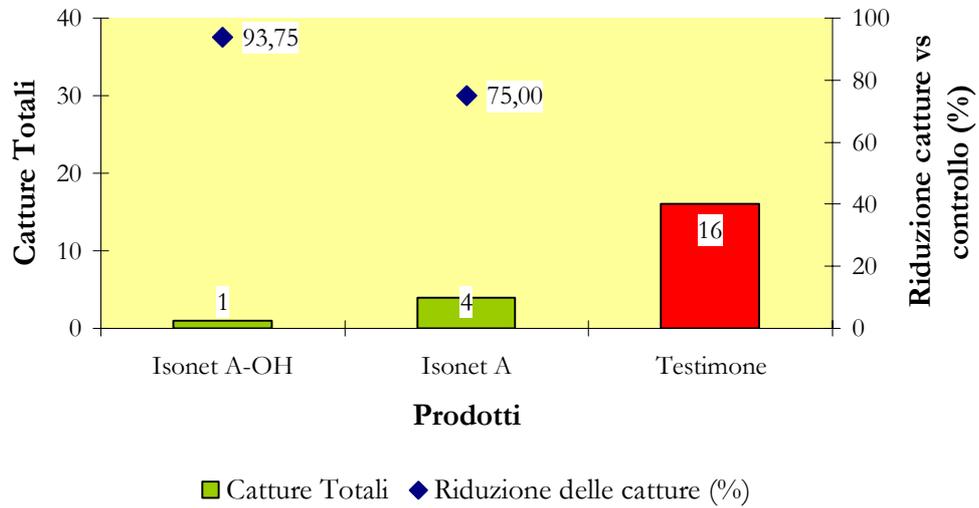
Per tutti i prodotti testati i risultati delle prove sono stati valutati come riduzione delle catture stagionali in termini percentuali rispetto alle catture ottenute nell'appezzamento testimone.

Isonet A e Isonet A-OH

Come mostrato dai grafici 1 e 2, il prodotto che ha ottenuto la migliore efficacia è stato Isonet A-OH, sia considerando separatamente ciascun livello di popolazione in prova (5 e 10 maschi/gabbia) sia in termini cumulativi generali (entrambe le densità di popolazione).

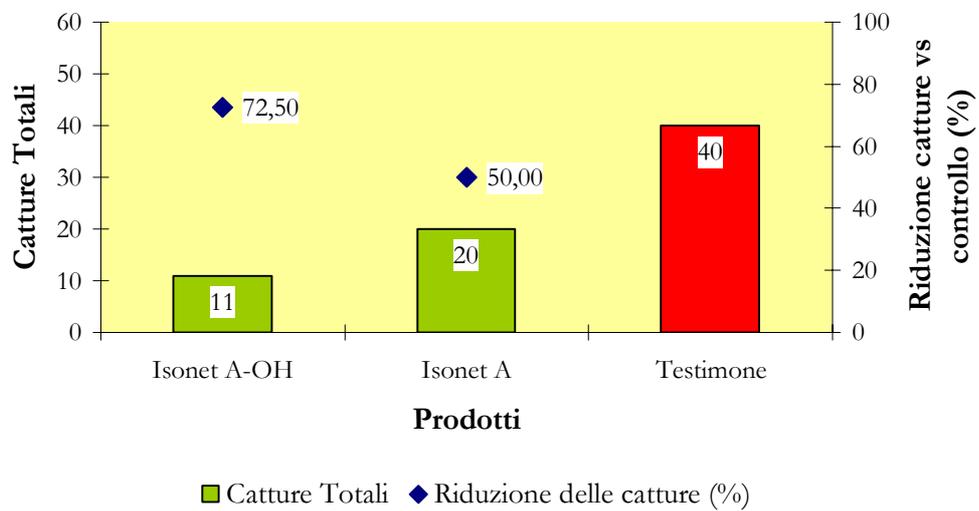
Con l'utilizzo di 5 maschi/gabbia, il numero di catture rinvenute nell'appezzamento testimone è stato di 16 maschi catturati; con l'utilizzo del prodotto Isonet A le catture sono scese a 1 (93,75 % di riduzione rispetto al testimone) e con l'utilizzo di Isonet A-OH i maschi catturati sono stati 4 (75,00 % di riduzione rispetto al testimone).

Prove di campo *A. lineatella* 2007 (5 maschi/gabbia)



Graf. 1: Riduzioni delle catture con 5 maschi/gabbia

Prove di campo *A. lineatella* 2007 (10 maschi/gabbia)



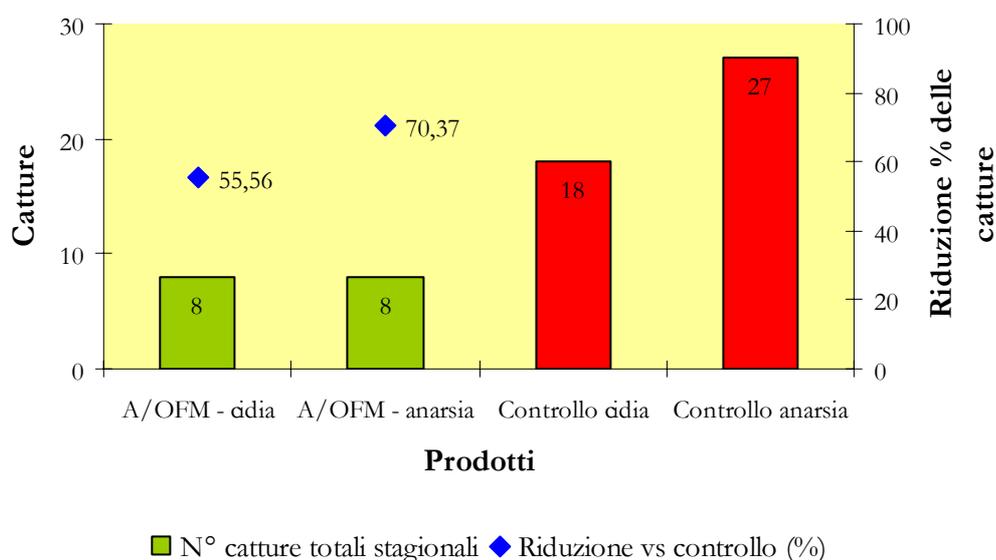
Graf. 2: Riduzioni delle catture con 10 maschi/gabbia

Con l'utilizzo di 10 maschi/gabbia, il numero di catture rinvenute nell'appezzamento testimone è stato di 40 maschi catturati; con l'utilizzo del prodotto Isonet A le catture sono scese a 20 (72,50 % di riduzione rispetto al testimone) e con l'utilizzo di Isonet A-OH i maschi catturati sono stati 11 (50,00 % di riduzione rispetto al testimone)

Isonet A/OFM

Valutando i risultati finali stagionali si può osservare come sia per *C. molesta* che per *A. lineatella* il prodotto utilizzato Isonet A/OFM determini una riduzione di catture cospicua in termini percentuali (graf. n°3). Nelle gabbie testimone sono stati catturati 18 maschi di *C. molesta* e 27 maschi di *A. lineatella*; con l'utilizzo del prodotto Isonet A/OFM le catture sono state di 8 maschi sia per *C. molesta* sia per *A. lineatella*, con una riduzione di cattura rispettivamente di 55,56% e 70,73%.

Prove di campo *A. lineatella* - *C. molesta* 2007



Graf. 3: Riduzioni delle catture con la miscela A/OFM

➤ ANNO 2008

MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:

Nell'anno 2008 la sperimentazione è stata condotta negli stessi appezzamenti dell'anno precedente; nel pescheto di 11,5 ha sono stati posizionati i due prodotti commerciali Isomate OFM rosso e Isonet A; in questo appezzamento sono state predisposte due gabbie di accoppiamento, una per il controllo delle catture in *A. lineatella* e una per il controllo delle catture di *C. molesta*; Nel un secondo pescheto di 3 ha è stato nuovamente applicato il prodotto Isonet A/OFM e sono state predisposte due gabbie di accoppiamento, una per *A. lineatella* e una per *C. molesta*. La densità di popolazione utilizzata nelle prove è stata di 10 maschi vergini/gabbia (5 prove effettuate) per ciascuna specie. L'applicazione dei *dispensers* è stata eseguita il giorno 19.03.08 per Isomate OFM rosso e Isonet A/OFM e il giorno 24.04.08 per Isomate A.

Sempre a circa 500 m è stato individuato l'appezzamento di pesco a conduzione "convenzionale", nel quale sono state predisposte due gabbie di accoppiamento una per *C. molesta* e una per *A. lineatella* utilizzate come testimoni di riferimento.

RISULTATI

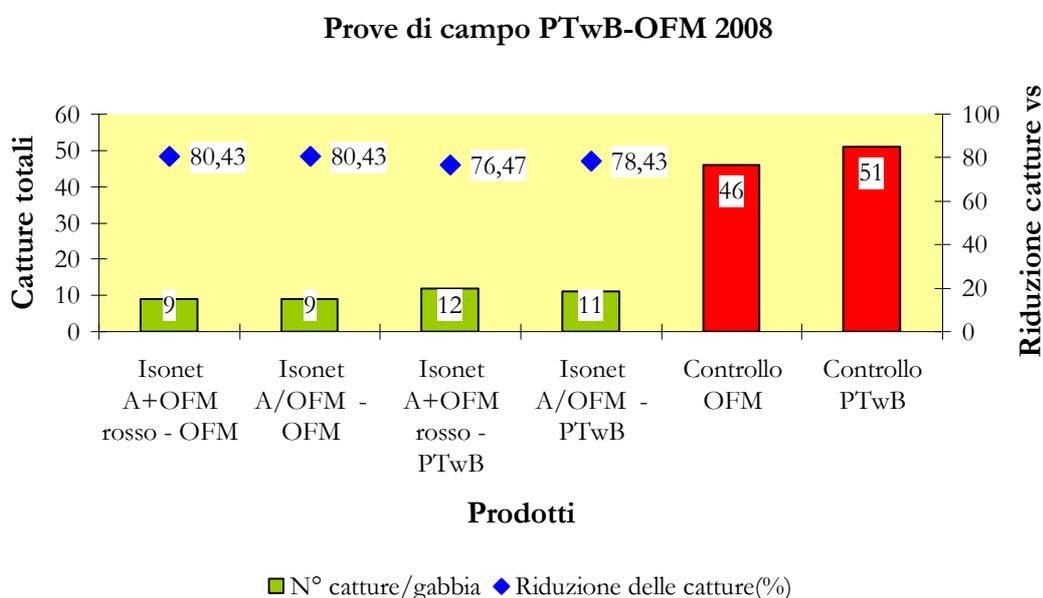
Anche in questa sperimentazione, per tutti i prodotti testati i risultati delle prove sono stati valutati come riduzione delle catture stagionali in termini percentuali rispetto all'appezzamento testimone.

Isomate OFM rosso e Isonet A

Come mostrato nel grafico 4 per ciascun insetto *target* nell'apprezzamento testimone si sono ottenute catture pari a 51 maschi per *A. lineatella* e 46 maschi per *C. molesta*; con l'utilizzo del prodotto Isonet A i valori di cattura dei maschi di anarsia è sceso a 12 (76,47 % di riduzione rispetto al testimone) mentre con l'uso del prodotto Isomate OFM rosso le catture dei maschi di cidia sono state di 9 insetti (80,43 % di riduzione rispetto al testimone).

Isonet A/OFM

I risultati ottenuti con l'uso combinato delle due miscele per il controllo di cidia e anarsia hanno mostrato catture dei maschi del tutto simili ai risultati ottenuti con l'impiego delle singole miscele; i valori in termini di riduzione delle catture sono risultati pari all'80,43% per *C. molesta* e del 78,43% per *A. lineatella*. (graf. 4).



Graf. 4: Riduzioni delle catture di *A. lineatella* e *C. molesta*

DISCUSSIONE

Dalle prove effettuate nel 2007 per la confusione sessuale di *A. lineatella* si può osservare che entrambi i prodotti Isonet A e Isonet A-OH hanno determinato cospicue riduzioni delle catture dei maschi rispetto al testimone; il prodotto sperimentale Isonet A-OH ha fatto registrare i risultati migliori, con una riduzione nelle catture del 93,8% (5 maschi/gabbia) e del 72,5% (10 maschi/gabbia), contro il 75,0% (5 maschi/gabbia) e del 50,0% (10 maschi/gabbia).

Entrambi i *dispensers* hanno dato migliori risultati con 5 maschi/gabbia: questo è un risultato atteso, poiché con una minore densità di popolazione è più facile inibire il ritrovamento di una sorgente attrattiva.

Per quanto riguarda invece l'uso del prodotto sperimentale Isomate A/OFM con le miscele associate in un unico *dispenser* nella lotta combinata per cidia e anarsia, emerge sia dalle prove del 2007, sia da quella del 2008, che il dispenser contenente entrambi i feromoni non ha mostrato alcuna differenza rispetto ai due erogatori contenenti i singoli feromoni.

Infatti i risultati hanno mostrato che per *C. molesta* la riduzione delle catture col prodotto associato è stata uguale alla riduzione delle catture ottenute con il singolo prodotto 80,43% mentre per *A. lineatella* la riduzione delle catture con le miscele associate ha permesso di registrare una riduzione delle catture leggermente superiore a quella ottenuta con il singolo prodotto (78,43 anziché 76,47%).

Dal punto di vista dell'efficacia non esiste alcuna controindicazione a utilizzare un unico *dispenser* nella lotta contro *C. molesta* e *A. lineatella*; l'impiego di un solo dispenser permetterebbe una significativa riduzione dei costi di materiale e soprattutto di applicazione.

Nell'applicazione pratica, però, la collocazione in campo dell'erogatore singolo dovrà essere effettuata in funzione della specie che per prima inizia a volare e garantire che entrambi i feromoni possano essere erogati per tutta la durata dei voli di entrambe le specie.

CAPITOLO VI

6. MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI PROVA PER LA VALUTAZIONE DEGLI ACCOPPIAMENTI IN CAMPO

PREMESSA

Il sistema delle gabbie di accoppiamento presenta l'indubbio vantaggio di poter verificare gli effetti di dispensers applicati in campo su una popolazione nota, riducendo in modo consistente la variabilità dovuta alla disomogenea distribuzione spaziale e temporale della popolazione presente naturalmente nel frutteto. Il sistema descritto in precedenza, basato sul posizionamento nella gabbia di una trappola innescata con 2 femmine vergini, consente di rilevare la riduzione delle catture nelle gabbie posizionate in campi in cui è stato distribuito feromone rispetto a campi testimone; i rilievi sulle catture non richiedono una formazione dell'operatore particolarmente specializzata e sono estremamente rapidi.

E' naturale, però, che per scopi sperimentali possa risultare più significativo un sistema che permetta di valutare gli effettivi accoppiamenti: esistono diversi sistemi descritti in letteratura, ognuno dei quali presenta pregi e limiti, che devono essere valutati in relazione prima di tutto alla specie coinvolta nelle prove e alle specifiche esigenze.

Tra gli aspetti principali vi sono sicuramente la necessità di recuperare il maggior numero possibile delle femmine per poter verificare gli accoppiamenti e contemporaneamente è importante che le femmine siano poste in condizioni tali da permettere loro di richiamare i maschi e accoppiarsi con essi senza significativo impedimento rispetto alle condizioni naturali.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato la messa a punto di un sistema per la verifica degli accoppiamenti utilizzando le gabbie precedentemente descritte.

Condurre questo tipo di prove all'interno di gabbie di accoppiamento può sembrare ad un primo esame meno problematico rispetto a prove svolte all'aperto.

In realtà sono stati numerosi i problemi operativi incontrati.

In fase di impostazione sono state effettuate prove preliminari per definire le modalità di gestione degli insetti: i maschi e le femmine dovevano essere messi in condizioni tali da non ostacolare in modo significativo il comportamento, per permettere la maggiore libertà possibile per l'accoppiamento; inoltre gli insetti, soprattutto le femmine, devono essere facilmente recuperabili al termine della prova.

Sono stati perciò condotti biosaggi di laboratorio in tunnel del vento, valutando differenti metodi di gestione delle femmine all'interno delle gabbie di accoppiamento verificando per le diverse modalità:

1. la percentuale di femmine fecondate
2. la facilità di recupero degli insetti

In funzione dei risultati ottenuti in laboratorio si sono quindi svolte prove di campo utilizzando gabbie di accoppiamento, al fine di poter valutare gli accoppiamenti anche in funzione di differenti miscele feromoniche di sintesi.

6.1. BIOSAGGI DI LABORATORIO

MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:

I biosaggi di laboratorio in tunnel del vento sono stati condotti per valutare differenti metodi di introduzione delle femmine all'interno delle gabbie di accoppiamento al fine di poterle recuperare facilmente e verificarne accoppiamento.

Per le prove sono state utilizzate:

- a**-femmine libere
- b**-femmine con un'ala anteriore legata
- c**-femmine con filo lungo 20 cm incollato al pronoto

d-femmine con filo lungo 30 cm incollato al pronoto

e-femmine con ala anteriore tagliata poste in “*Mating-table*”.

Per tutte le prove, (tranne per le femmine libere usate quindi tal quali) le femmine di *A. lineatella* di 3 giorni di età sono state anestetizzate per alcuni secondi con CO₂ dopodiché per il metodo **b**) un’ala anteriore è stata legata a un supporto di legno tramite un sottile filo di cotone (fig. 1); per le prove **c**) e **d**) il filo di cotone, anziché legato all’ala anteriore, è stato incollato al pronoto (fig. 2 e 3) con della colla a presa rapida, previa asportazione delle squame con l’uso di un piccolo batuffolo di cotone leggermente inumidito di acetone; per la prova **e**) le femmine vergini di *A. lineatella* dopo essere state anestetizzate con CO₂ sono state sottoposte a taglio di un’ala anteriore mediante piccole forbici ed utilizzate per il “*mating-table*” (fig. 4)



Fig. 1: Femmina con ala anteriore legata metodo **d**)



Fig. 2: Femmina con ala anteriore incollata, metodo **c**)

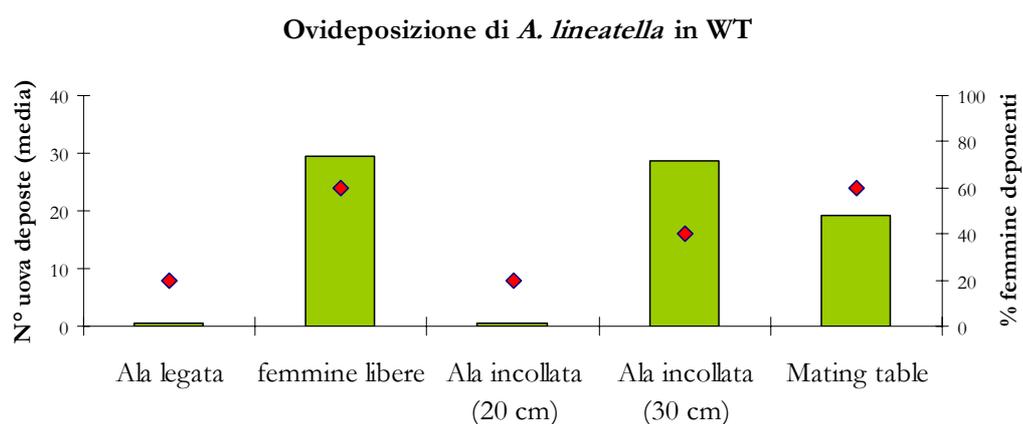
Il “*mating-table*” (tavola di accoppiamento) (Snow J et al 1976; Kehat M, et al 1988; Hight S, et al 2003) è una tecnica che consiste nel confinare le femmine, cui è stata tagliata un’ala per impedire il volo, all’interno di vassoi di materiale plastico aventi dimensioni di 50 cm x 70,

applicando sulle pareti laterali dei vassoi (alte circa 9 cm) del talco in polvere o della paraffina liquida per evitare la fuga degli insetti.

Le prove effettuate in tunnel del vento hanno avuto una durata di 48 ore, fotoperiodo L:D = 15:9, temperatura 23-26 °C e U.R. 60-70%. Tutte le prove sono state effettuate in assenza di feromone e per ciascuna prova sono state utilizzate cinque femmine vergini e dieci maschi vergini.

RISULTATI E DISCUSSIONI

I risultati delle prove svolte in tunnel del vento sono riportati nel grafico 1:



Graf. 1: Prove svolte in tunnel del vento

Con il metodo “*mating-table*” (e) il 60% delle femmine utilizzate si sono accoppiate ed hanno deposto come media 19,2 uova; anche liberando le cinque femmine vergini nel tunnel del vento (a) la % di femmine deponenti è stata 60, con una media di uova deposte di 29,6. A ad una sostanziale parità di funzionalità, il recupero delle femmine all’interno del tunnel del vento con il metodo (a) non è stato semplice, e si è pertanto

deciso di utilizzare il *mating-table* (e) che, ha permesso un veloce recupero delle femmine rimaste all'interno del vassoio anche se ha comportato tempi più lunghi di preparazione dovuti all'anestesia delle femmine con CO₂ e taglio dell'ala.

Le altre modalità saggiate non hanno prodotto risultati soddisfacenti: incollando un sottile filo di cotone al pronoto delle femmine la percentuale di femmine deponenti si è abbassata a 40 con una media di 28,8 uova deposte mantenendo una lunghezza del filo di 30 cm (d), mentre con una lunghezza del filo di 20 cm (c) la percentuale di femmine deponenti è scesa a 20 con una media di uova deposte pari a 0,4. Risultato simile a questo si è ottenuto legando il filo di cotone ad un'ala anteriore (b) anziché incollandolo al pronoto (20% di femmine deponenti con una media di 0,6 uova per femmina).

Entrambe le metodologie, ala legata (b) e protorace incollato (c e d), hanno richiesto tempi di esecuzione molto lunghi e buona manualità da parte degli operatori.

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti dalle prove preliminari in tunnel del vento si può osservare come il metodo delle *mating-tables* abbia fornito buoni risultati sia in termini di percentuale di femmine deponenti che in termini di numero medio di uova deposte. Inoltre questo metodo ha permesso un veloce e facile recupero delle femmine per l'osservazione dell'accoppiamento perché confinate in un'area ristretta.

6.2. PROVE DI CAMPO

MODALITÀ DI CONDUZIONE DELLE PROVE:

Le prove si sono svolte presso l'Azienda Agricola "Campo dei frutti" in località Borghetto (PC). Tale azienda attua come strategia di difesa la lotta integrata avanzata su diverse colture quali melo, pero, pesco, albicocco, susino, nocciolo, ciliegio e altro, per un totale di circa 3000 piante e 140 differenti varietà distribuite su un appezzamento di oltre 8 ettari.



Fig. 5 – Disposizione delle 6 gabbie di accoppiamento.

Sei gabbie come quelle descritte in seguito sono state collocate tra i filari di pesco secondo la disposizione riportata in figura 5.

La distanza fra le gabbie era di circa 18-20 metri. Successivamente per evitare la possibilità che la vicinanza delle gabbie con erogatore potesse influenzare la deposizione di uova nella gabbia testimone, questa è stata allontanata a circa 50 m.

La durata prevista per le prove di campo è stata di due notti; gli insetti venivano introdotti nelle gabbie nelle ore serali del primo giorno e recuperati nelle prime ore del mattino del terzo giorno: in tal modo si limitava la permanenza degli insetti nelle gabbie durante le ore calde.

➤ **DESCRIZIONE GABBIE:**

Le gabbie sono state costruite utilizzando un fondo di legno (compensato marino) avente dimensione 110 x 110 cm sul quale sono state fissate le quattro pareti laterali ed il “tetto” della gabbia. Tutte le pareti, compreso il tetto, avevano dimensione di 100 x 100 cm, con un’intelaiatura in legno di sezione 3,5 x 3,5 cm sulla quale è stata montata una rete a maglia fine di colore bianco. Uno dei lati è stato predisposto apribile al fine di poter introdurre e recuperare agevolmente gli insetti; inoltre è stato praticato un foro di circa 3 cm di diametro in un angolo del tetto per l’inserimento dei maschi; tale foro veniva chiuso con un batuffolo di cotone imbevuto di sostanze zuccherine per il nutrimento degli insetti. Al centro del tetto, inoltre, è stato installato un piccolo supporto per l’aggancio del dispenser all’interno della gabbia.

Dopo le prime due prove preliminari effettuate in campo, poiché si sono registrate temperature piuttosto elevate all’interno della gabbia, si è resa necessaria l’applicazione di una copertura per ombreggiarla. La copertura di ogni gabbia è stata costruita con 2 pannelli di polistirene espanso accostati, aventi dimensioni 60 x 125 cm ciascuno. I pannelli sono stati fissati al telaio della gabbia e mantenuti discostati per permettere un adeguato ricircolo di aria.

Attorno alle gabbie per circa 2/3 dell’altezza è stato applicato del film plastico trasparente per evitare la dispersione del feromone dall’interno; alcune prove preliminari sono state condotte anche senza tale copertura.

Le prove sono state effettuate con diverse modalità nel corso della stagione, il numero di insetti utilizzati per gabbia è stato di cinque femmine e dieci maschi eccezion fatta per la prova 8 in cui il numero di

maschi introdotto e stato raddoppiato; sono state effettuate in tutto otto prove, più le due preliminari. I dettagli sono riportati qui di seguito:

MODALITÀ 1: Con questa modalità è stata effettuata solo una prima prova preliminare introducendo nelle gabbie 10 maschi e 5 femmine con ala anteriore legata (modalità **b** precedentemente descritta).

MODALITÀ 2: Con questa modalità è stata effettuata la seconda prova preliminare introducendo nella gabbia 10 maschi e 5 femmine con ala anteriore legata (modalità **d** precedentemente descritta).

MODALITÀ 3: Con questa modalità sono state condotte tutte le altre prove di campo utilizzando il metodo delle “mating-tables”. Inizialmente le prove sono state svolte cospargendo le pareti dei vassoi con Teflon liquido (PTFE) mediante un pennello; in un secondo momento si è utilizzato invece talco in polvere. Al centro del vassoio è stato inserito un cilindro di rete a maglia fine alto circa 22 cm, per permettere alle femmine di arrampicarsi ed emettere il feromone sessuale. Nelle prime prove il vassoio è stato posto sul fondo della gabbia. Poiché è stato osservato che i maschi introdotti nelle gabbie tendevano a restare nella parte superiore della gabbia, il vassoio è stato rialzato di circa 25 cm appoggiandolo ad un vaso capovolto.

Nella tabella di seguito sono riportate le varie modalità con cui sono state svolte le prove:

prova	data	♀♀		erogazione		mating-table		disposizione mating-table	
		legate / incollate	ala tagliata	1/4	totale	teflon	talco	fondo gabbia	rialzata
prelimin. 1	23/06/2009	•							
prelimin. 2	24/06/2009	•							
prova 1	07/07/2009		•	•		•		•	
prova 2	13/07/2009		•	•		•		•	
prova 3	20/07/2009		•	•			•	•	
prova 4	27/07/2009		•		•		•	•	
prova 5	04/08/2009		•		•		•		•
prova 6	11/08/2009		•		•		•		•
prova 7	17/08/2009		•		•		•		•
prova 8	24/08/2009		•		•		•		•

Tab. 1: Modalità delle prove di campo

Per monitorare i parametri microclimatici ambientali all'interno di 2 gabbie di accoppiamento scelte a caso (su 6 utilizzate per ciascuna prova), sono stati introdotti dei data-loggers, appesi al centro della gabbia a circa metà altezza.

➤ **IMPIEGO DEI FEROMONI:**

Le diverse miscele del feromone sessuale di sintesi erano contenute in diffusori capillari di materiale plastico ad applicazione manuale siglate con numeri da 1 a 8 (tabella 2).

Tipo	1	2	3	4	5	6	7	8
E5-10:Ac	90	85	95	81	82	99	86	86
E5-10:OH	10	15	5	9	9	1	4	9
E3E5+ZE3Z5- 10:Ac	*	*	*	9	9	*	9	4.5
E3E5+ZE3Z5- 10:OH				1	0.1	*	1	0.5

Tab. 2: Composizione dei prodotti

I prodotti sono stati mantenuti in frigorifero a 4 °C in attesa delle prove. Il protocollo di utilizzo dei feromoni prevedeva diversi livelli di copertura dei *dispensers* per ottenere diverse quantità di feromone erogato. In tal modo sarebbe stato possibile stabilire la quantità idonea di feromone per ottenere la totale inibizione degli accoppiamenti. La copertura è stata effettuata arrotolando un foglio di alluminio attorno ai *dispensers*; in tal modo la parte erogante risultava essere solamente quella scoperta. Le modalità di copertura utilizzate sono state le seguenti: erogatore coperto per $\frac{3}{4}$ della lunghezza ed erogatore completamente scoperto. Gli erogatori disposti orizzontalmente sono stati appesi all'interno delle gabbie, al centro, ad un'altezza pari a circa la metà delle gabbie (alcuni centimetri al di sotto della copertura di film plastico). L'erogatore di ogni blend è sempre stato nella medesima gabbia.

➤ **VERIFICA DEGLI ACCOPPIAMENTI:**

Per verificare gli avvenuti accoppiamenti, al termine di ciascuna prova le femmine di *A. lineatella* raccolte dalle gabbie sono state poste singolarmente in provette di vetro aventi volume di circa 100 ml, provviste di striscia di feltro blu e ovatta imbevuta di nutrimento per adulti, chiuse con tulle. Le femmine sono state lasciate a deporre per 7 giorni in cella ad una temperatura di circa 23 °C, U.R. 65% e fotoperiodo L:D=15:9. Il conteggio del numero delle uova eventualmente deposte è avvenuto controllando ciascuna striscia di feltro blu allo stereomicroscopio.

RISULTATI E DISCUSSIONE

➤ **PROVA PRELIMINARE 1:**

Le femmine usate in queste prove avevano incollato al pronoto del filo di cotone oppure di nylon. In entrambi i casi, a differenza di quanto accaduto nelle prove preliminari in tunnel del vento, numerosi individui si sono scollati dall'estremità del filo, probabilmente nel tentativo di rifugiarsi in zone ombreggiate della gabbia. Infatti, in assenza di tetto di copertura e impedendo alle femmine di spostarsi liberamente all'interno della gabbia, le condizioni microclimatiche possono non essere compatibili con la sopravvivenza degli insetti.

In ognuna delle due gabbie con copertura di poliestere 3 delle 5 femmine non sono più state ritrovate, e le femmine recuperate non hanno deposto alcun uovo nel corso dei 7 giorni successivi, indicando che probabilmente non c'è stato accoppiamento. Nella gabbia senza copertura laterale in poliestere, invece, una sola femmina non è stata ritrovata e delle 4 recuperate solamente una ha deposto (80 uova).

La durata di questa prova è stata di 24 ore.

➤ **PROVA PRELIMINARE 2:**

In questo caso le femmine utilizzate sono state legate ad un'ala anteriore mediante un sottile filo di materiale sintetico. Sono state impiegate 2 gabbie, una con copertura in poliestere e una senza.

Nella gabbia senza poliestere non è stato possibile recuperare nessuna femmina per gli stessi motivi ipotizzati precedentemente, mentre

nella gabbia con film plastico solo 3 femmine sono state recuperate e 1 di esse ha deposto 5 uova.

La durata di tale prova è stata di 48 ore.

In base ai risultati ottenuti da queste due prove preliminari, come già accennato in precedenza, si è pensato di aggiungere un tetto di copertura alle gabbie, per creare zone di ombra e conseguentemente abbassare la temperatura. Inoltre è stata abbandonata l'idea di legare o incollare le femmine, ma di utilizzare la tecnica delle *mating-tables* che, come visto nelle prove in tunnel del vento, garantisce risultati migliori.

Di seguito è riportata la cronologia di tutte le modifiche apportate nel corso della sperimentazione, mentre, per tutte le prove, i risultati di ovideposizione dopo 7 giorni sono riassunti nel grafico 2.

➤ **PROVA 1:**

Al termine di questa prova solo il 10% delle femmine si trovava ancora nelle *mating-tables* (teflonate); nonostante questo inconveniente sono state recuperate tutte le 30 femmine all'interno delle 6 gabbie, (di una sono state ritrovate le spoglie); la maggior parte delle femmine si trovava posizionata nella parte alta della gabbia, al di sopra della copertura di poliestere.

➤ **PROVA 2:**

Analogamente a quanto avvenuto nella prova 1, tutte le femmine sono state ritrovate al di fuori della *mating-table* con pareti teflonate, nella parte superiore della gabbia.

➤ **PROVA 3:**

Per ovviare al problema della fuga delle femmine all'esterno della *mating-table*, si è utilizzata della polvere di talco cosparsa sulle pareti laterali al posto del teflon per confinarle. Questa modifica ha fatto sì che tutte le 30 femmine siano state ritrovate all'interno del vassoio al termine della prova. Gli altri parametri sono stati mantenuti invariati.

➤ **PROVA 4:**

Le modalità di esecuzione di questa prova sono state le stesse di quella precedente, tranne per quanto riguarda la copertura dell'erogatore di feromone, che in questo caso era completamente scoperto (questa modifica è stata apportata in base ai risultati delle prime due prove per arrivare ad avere uno "zero" di deposizione nelle gabbie con feromone).

➤ **PROVA 5:**

Osservando che nelle prove in cui le femmine sono rimaste confinate nelle *mating-tables* con talco poste sul fondo delle gabbie, il numero di accoppiamenti è stato assai scarso anche nel testimone, è stato ipotizzato che ciò dipendesse dal fatto che i maschi (anch'essi ritrovati spesso nella parte alta delle gabbie) non scendessero sul fondo della gabbia non riuscendo a percepire il feromone emesso dalle femmine. Per tale ragione si è deciso di alzare le *mating-tables* di circa 25 cm dal fondo della gabbia, mantenendo l'erogatore completamente scoperto poco sopra i cilindri di rete su cui si arrampicano le femmine, il tutto leggermente al di sotto del livello del film di plastica esterno.

➤ **PROVA 6:**

Modalità corrispondenti a quelle della prova 5.

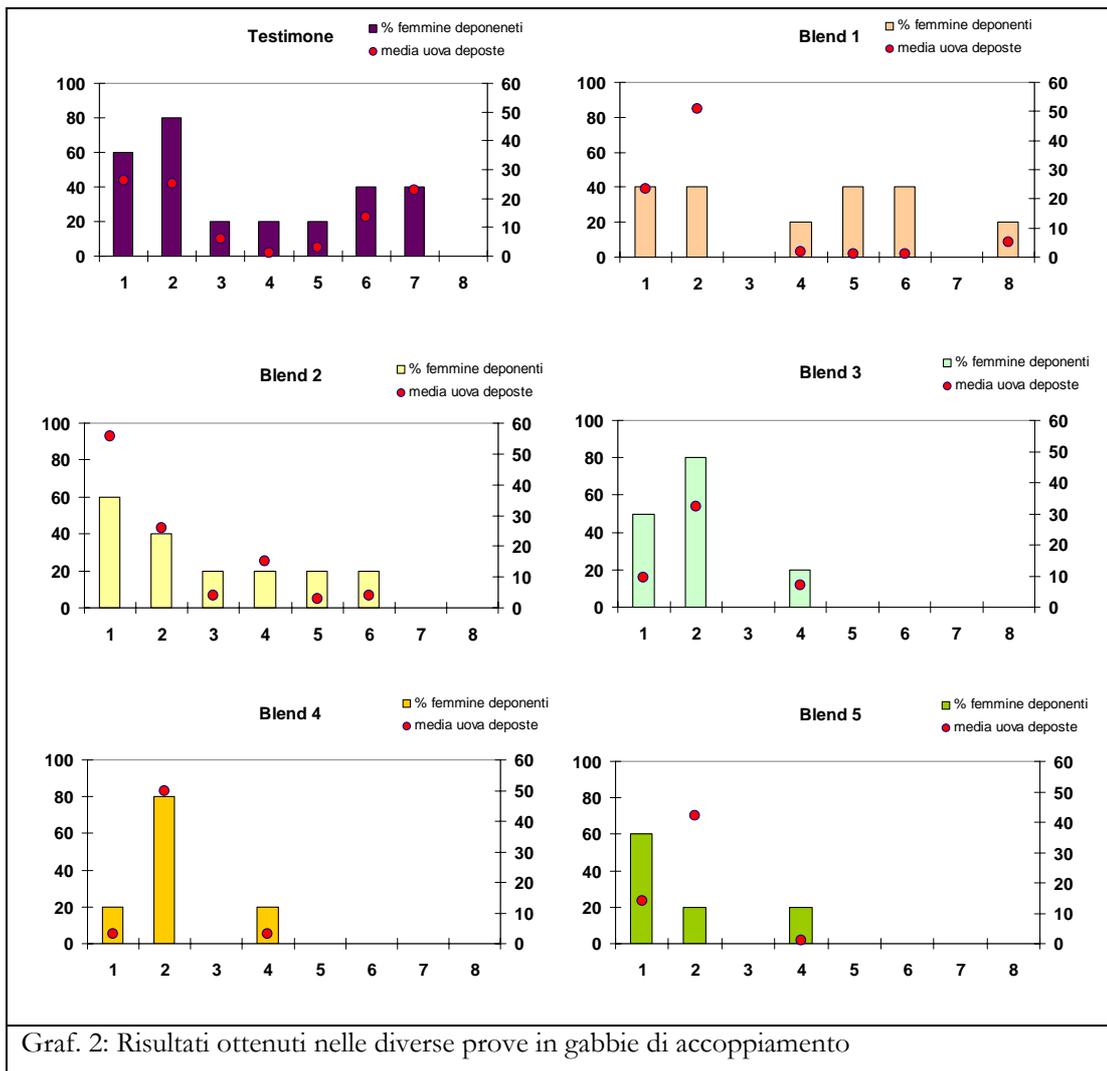
➤ **PROVA 7:**

Vista la scarsa deposizione di uova nel testimone, è stato deciso di allontanare la gabbia di controllo a circa 50 metri da quelle con erogatore, in modo da scongiurare possibili influenze. In questa prova sono state impiegate solamente 2 gabbie (testimone e *blend* 1).

➤ **PROVA 8:**

Essendo stata avanzata l'ipotesi che il numero di maschi liberati all'interno della gabbia fosse insufficiente, e che il calore accumulato durante il secondo giorno potesse influire negativamente sull'accoppiamento e sulla deposizione delle uova, la prova 8 è stata eseguita introducendo 20 maschi per gabbia e ha avuto la durata di una sola notte. In questa prova sono state impiegate 3 gabbie (testimone, *blend* 1 e *blend* 4).

Come mostrato nel grafico 2, la percentuale di femmine deponenti e la media di uova da esse deposte nel testimone sono state soddisfacenti solamente nelle prime due prove, nelle quali le femmine si sono spostate liberamente all'interno della gabbia. Nelle prove successive la percentuale di accoppiamento non ha mai superato il 40% e non è risultata significativamente superiore a quella registrata nelle gabbie con feromone, sia con la mating-table sul fondo della gabbia, sia rialzata.



Graf. 2: Risultati ottenuti nelle diverse prove in gabbie di accoppiamento

Anche l'allontanamento della gabbia testimone a 50 metri dalle altre non ha apportato nessun miglioramento.

CONCLUSIONI

Considerato che tutte le prove sono state condotte con modalità differenti introducendo di volta in volta variazioni per migliorare il protocollo e poiché, come precedentemente accennato, nel testimone le

deposizioni sono state scarse, risulta difficile valutare l'efficienza in campo dei singoli *blends* utilizzati.

Tuttavia si è osservato che con l'uso dei *blends* 3, 4 e 5 si è ottenuta, con *dispenser* completamente scoperto, una buona riduzione degli accoppiamenti.

RILEVAMENTO DATI METEO

Per verificare che l'andamento climatico all'interno delle gabbie di accoppiamento non pregiudicasse in alcun modo le prove svolte, sono stati posizionati all'interno delle stesse dei *data-loggers*.

Il grafico 3 mostra i dati medi di temperatura e umidità relativa registrati dai *data-loggers* nel corso delle prime sette prove. Si può osservare che, esclusa l'elevata umidità rilevata durante la prima prova a causa di un

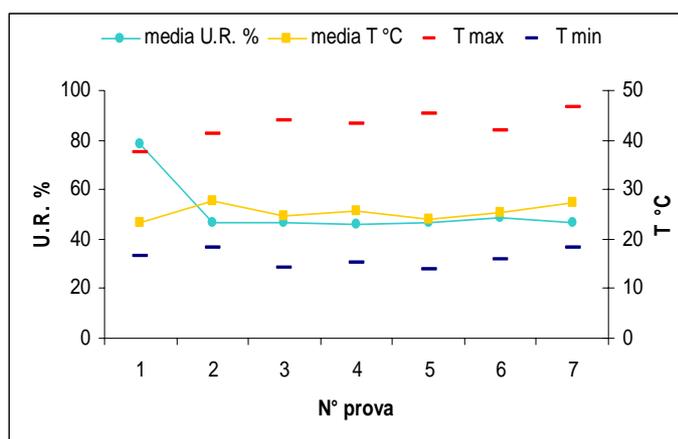


Grafico 3 – Andamento di umidità e temperature medie durante le prove.

forte temporale, l'andamento climatico è stato piuttosto costante, comprese le temperature massime e minime.

Ciò ha fatto sì che i risultati delle prove svolte non siano stati presumibilmente influenzati dalle condizioni climatiche.

Il grafico seguente mostra i valori registrati durante l'ottava prova sia all'interno che all'esterno di una gabbia di accoppiamento.

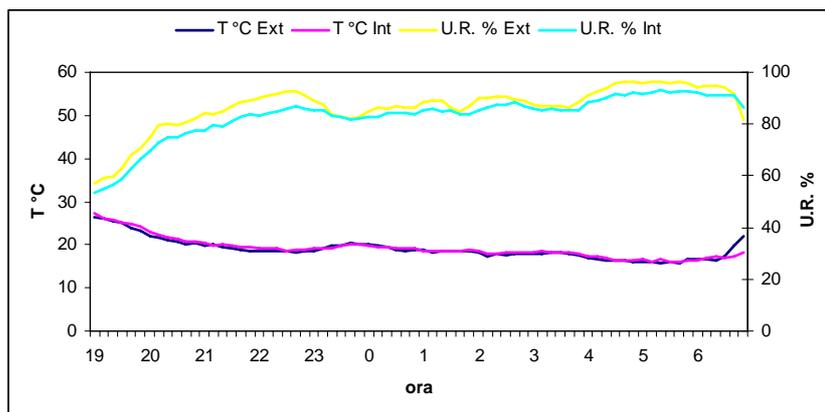


Grafico 4 – Parametri microclimatici rilevati alla prova 8.

Da questo grafico si può osservare che non ci sono state significative differenze di temperatura e umidità tra interno ed esterno della gabbia.

CONCLUSIONI GENERALI

CONCLUSIONI GENERALI

Dai risultati ottenuti nelle diverse prove effettuate in questi anni di ricerca si può affermare che:

- i maschi vergini di *A. lineatella* vengono attivati sia dal feromone emesso da femmine vergini di tre giorni di età che dal feromone sessuale sintetico erogato dai *dispensers* plastici; nelle prove svolte in tunnel del vento è emerso però che la migliore risposta del maschio al feromone sessuale si ottiene con gli erogatori contenenti feromone sintetico in quanto la dispersione del feromone sessuale sintetico da questi avviene in maniera continua e non irregolare come da parte delle femmine;
- l'utilizzo della tecnica della dissezione per determinare gli avvenuti accoppiamenti nelle femmine di *A. lineatella* non ha permesso di ottenere risultati certi, pertanto per determinare l'avvenuto accoppiamento l'unico metodo valido, anche se richiede tempi di attesa più lunghi, rimane quello di separare maschi e femmine dopo gli accoppiamenti e mantenere le femmine in ambiente controllato fino alla deposizione delle uova e alla loro schiusa;
- in base a studi condotti sul comportamento riproduttivo di maschi e femmine di *A. lineatella* è emerso che accoppiando tra loro maschi e femmine vergini di tre giorni di età e lasciandoli a contatto per un tempo di circa 24 ore in condizioni controllate, si ottengono buoni risultati di deposizione (circa il 60%) e successiva schiusura delle uova; utilizzando invece insetti di maggiori età (da 5 a 7 giorni e 14

gorni) la fecondità delle uova si è drasticamente abbassata (il numero di larve ottenuto è stato scarso) anche se gli insetti di età diverse venivano fatti accoppiare con i rispettivi *partner* di 3 giorni di età;

- per tutte le miscele contenenti differenti percentuali di alcol utilizzate nelle prove di laboratorio, l'alta concentrazione del feromone sintetico ha sempre determinato una riduzione degli accoppiamenti; alle basse concentrazioni non si sono osservate significative differenze tra le miscele. Prove di campo hanno invece dimostrato che la miscela 5-OH ha significativamente ridotto le catture dei maschi nelle gabbie di accoppiamento rispetto alla miscela commerciale 1-OH, questo a sottolineare che la differente percentuale di alcol può in qualche modo influenzare l'efficienza delle miscele utilizzate;
- l'utilizzo in campo di erogatori contenenti entrambe le miscele di feromone sessuale sintetico per il controllo di *A. lineatella* e di *C. molesta* ha dimostrato che l'uso associato di queste due miscele in un unico *dispenser* non compromette in alcun modo la risposta dei maschi dell'una o dell'altra specie *target*. Questo mostra che tutti e due i sistemi di lotta (miscele in un unico *dispenser* o miscele in due *dispensers* separati) sono un valido strumento per la difesa dai due insetti fitofagi riducendo enormemente i costi di applicazione dei *dispensers* in campo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- AHMED L., GILLOTT C., 1982a – The spermatheca of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) I Morphology, histology and histochemistry – *Int. J. Invert. Rep.*, 4: 281-295.
- AHMED L., GILLOTT C., 1982b – The spermatheca of *Melanoplus sanguinipes* (Fabr.) II Ultrastructure – *Int. J. Invert. Rep.*, 4: 297-309.
- ANDO T., KATAGIRI Y. AND UCHIYAMA M., 1985. – Mass spectra of dodecadienic compounds with a caonjugated double bond, lepidopterous sex pheromones. – *Agric. Biol. Chem.*, 49: 413-421.
- ANDO T., OGURA Y., KOYAMA M., KURANE M., UCHIYAMA M. AND SEOL K.Y., 1988. – Syntheses and NMR analyses of eight geometrical isomeres of 10, 12, 12-hexadecatrienyl acetate, sex pheromone candidates of the mulberry pyralid. – *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2459-2468.
- ANTHON E.C., SMITH E.L. AND GARRET. S., 1971. – Artificial diet and pheromone studies with peach twig borer. – *J. Econ. Entomol.*, 64: 259-262.
- ARN H., STADLER E. and RAUSCHER S., 1975. – The electroantennographic detector a selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. – *Naturforsch.*, 30c: 722-725.
- ARN H., TOTH M. AND PRIESNER E., 1986. – List of sex pheromomes of Lepidoptera and retated attractants. – *Organisation Internationale de Lutte Biologique, Section Règionale Ouest Paléartique, Paris.*
- AVILLA J., CASADO D., VARELA N., BOSCH D AND RIBA M., 2003. – Electrophysiological response of Codling Moth (*Cydia pomonella*) adults to semiochemicals. – *Integrated Plant Protection in Fruit Crops “Arthropods pests” IOBC Wprs Bulletin*, 26(11): 1-7.
- BAILEY S.F., 1948. – The pich twig borer. – *Calif Agric. Exp. Stn. Bull.* 708.

- BAKER T.C., CARDE R.T. AND MILLER J.R., 1980. – Oriental fruit moth pheromone component emission rates measured after collection by glass-surface adsorption. – *J. Chem. Ecol.*, 4: 749-758.
- BAKER T.C., GASTON L.K., MISTROT POPE M., KUENEN L.P.S. AND VETTER R.S., 1971. – A high-efficiency collection device for quantifying sex pheromone volatilized from female glands and synthetic sources. – *J. Chem. Ecol.*, 7: 961-968.
- BAKER T.C., STATEN R.T. AND FLINT H.M., 1990. – Use of pink bollworm pheromone in the southwestern United States, pp. 417-436. in R.L. Ridgway, R.M. Silverstein & M.N. Inscoe [eds.], Behaviour-modifying chemicals for insect management. Marcel Dekker, New York.
- BAKER T.C., FRANKE W., MILLAR J., LOFSTEDT C., HANSSON B., DU J.W., PHELAN P.L., VETTER R.S., YOUNGMAN R AND TODD J.L., 1991. – Identification and bioassay of sex pheromone components of the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller). – *J. Chem. Ecol.* 17: 1973-1988.
- BAUMANN H., 1974a – The isolation, partial characterization, and biosynthesis of the paragonial substances, PS-1 and PS-2 of *Drosophila funebris*. – *J. Insect Physiol.*, 20: 2181-2194.
- BAUMANN H., 1974b – Biological effects of the paragonial substances PS-1 and PS-2 of *Drosophila funebris*. – *J. Insect Physiol.*, 20: 2347-2362.
- BAUMANN H., CHEN P.S., 1973 – Geschlechtsspezifische ninhydrin-positive Substanzen in Adultmännchen von *Drosophyla funebris*. – *Rev. Suisse Zool.*, 80:685-690.
- BAUMANN H., WILSON K., CHEN P.S. AND HUMBERT R.E., 1975 – The amino acid sequence of a peptide (PS-1) from *Drosophyla funebris*; a paragonial peptide from males which reduces the receptivity of the female. – *Eur. J. Biochem.*, 52: 521-529.

- BHATNAGAR R.D.S., MUSGRAVE A.J., 1971 – Aspects of histophysiology of spermathecal gland of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera). – *Canad. J. Zool.*, 49:275-277.
- BITSCH J., 1981a – Ultrastructure de l'épithélium glandulaire du réceptacle séminal chez *Thermobia domestica* (Packard) (Thysanura : Lepismatidae). – *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 10: 247-263.
- BONHAG P.F., WICK J.R., 1953 – The functional anatomy of the male and female reproductive system of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera: Lygaeidae). – *J. Morphol.*, 93:177-283.
- CLEMENTS A.N., POTTER S.A., 1967 – The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. – *J. Insect Physiol.*, 13:1825-1836.
- COCHRAN D.G., 1979 – A genetic determination of insemination frequency and sperm precedence in German cockroach. – *Ent. Exp. Appl.*, 26(3) :259-266.
- COLHOUN E.H., 1963 –Synthesis of 5-hydroxytryptamine in the American cockroach. – *Experimentia.*, 19: 2479-10.
- COREY E.J. AND SCHMIDT G., 1979. – Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. – *Tetrahedron Lett.*: 399-402.
- CRAIG G.B.JR., 1967 – Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. – *Science*, 156: 1499-1501.
- DALLAI R., 1975 – Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. – *J. Insect Physiol.*, 21: 89-109.
- DARRELLO O. AND HATHAWAY D.O., 1981. – Peach Twig Borer: Field evaluations of contaminations of pheromone and monitoring of population. – *J. Econ. Entomol.*, 74: 344-345.
- DAVEY K.G., 1958 – The migration of spermatozoa in the female of *Rhodnius prolixus* Stal. – *J. Exp. Biol.*, 35: 694-701.

- DAVEY K.G., 1959 – Spermatophore production in *Rhodnius prolixus*. – *Quart. J. Mic. Sci.*, 100: 221-230.
- DAVEY K.G., 1960 – A pharmacologically active agent in the reproductive system of insects. – *Canad. J. Zool.*, 100: 221-230.
- DAVEY K.G., 1960a – The evolution in spermatophores in insects. – *Roy. Ent. Soc. Lond.*, A 35: 107-113.
- DAVEY K.G., 1965 – *Reproduction in the Insects* – Oliver & Boyd, Edinburg.
- DAVEY K.G., 1970 – Copulation and oogenesis in *Rhodnius prolixus*. – In *L'influence des Stimuli Externes sur le Gametogenese des Insects*. Edited by W. Labeyrie. Colloques Int. CNRS, 189: 249-256.
- DAVEY K.G., WEBSTER G.F., 1967 – The structure and secretion of the spermatheca of *Rhodnius prolixus* Stal: a histochemical study. – *Canad. J. Zool.*, 45: 653-657.
- DAY R.W. AND QUINN G.P., 1989. – Comparisons of means after an analysis of variance in ecology. – *Ecol. Monogr.*, 59: 499-463.
- DICKLER E., 1982. – Distribution of the quarantine pests *Anarsia lineatella* and *Grapholita molesta* in FRG. – *Nachrichtenblatt Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 34: 145-152.
- FELDMAN-MUHSAM B., BONET S., SALITERNIK-GIVAT S. AND EDEN C., 1973 – On the evacuation of sperm of the spermatophore of the tick *Ornithodoros savignyi*. – *J. Insect Physiol.*, 19: 951-962.
- FORMIGONI A., PATUZZO L. AND LERI G., 1977. – Esperienza quadriennale di lotta contro la Tignola orientale del pesco (*Grapholita molesta* Busck.) e l'*Anarsia* (*Anarsia lineatella* Zell.) con l'ausilio di trappole a feromoni (Oframone ed Anomone). – *Informatore fitopatologico*, VI-VII: 77-79.
- FOSTER W.A., 1974 – Surgical inhibition of ovulation and gestation in the tsetse fly *Glossina austeni* Newst. – *Bull. Ent. Res.*, 63: 483-493.

- GIGLIOLI M.E.C., MASON G.F., 1966 – The mating plug in anopheline mosquitoes. – *Proc. Roy. Ent. Soc. Lond.*, A 41: 123-129.
- GILLOTT C., FRIEDEL T., 1977 – Fecundity-enhancing and receptivity-inhibiting substances produced by male insects a review. – *Adv. Invert. Reprod.*, 1: 199-218.
- GRODNER M.L., 1975 – Aberrant spermatogenesis in hybrid progeny of subspecies of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman. (Coleoptera: Curculionidae). – *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 4: 107-114.
- GRODNER M.L., 1979 – Fine structure of spermathecal gland of the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman. Coleoptera: Curculionidae. – *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 8: 51-58.
- GRODNER M.L., STEFFENS W.L., 1978 – Evidence of a chemotactic substance in the spermathecal gland of the female boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). – *Trans. Amer. Mic. Soc.*, 97: 116-120.
- GROMKO M.H., PYLE D.W., 1978 – Sperm competition, male fitness, and repeated mating by female *Drosophila melanogaster*. – *Evolution.*, 32: 588-593.
- GUPTA B.L., SMITH D.S., 1969 – The structural organization of the spermatheca in the cockroach *Periplaneta americana*. – *Tissue Cell.*, 1: 295-324.
- HAPP G.M., HAPP C.M., 1970 – Fine structure and histochemistry of the spermathecal gland in the meal worm beetle *Tenebrio molitor*. – *Tissue Cell*, 2 : 443-446.
- HAPP G.M., HAPP C.M., 1975 – Fine structure of the spermathecal of the meal worm beetle (*Tenebrio molitor*) – *Cell. Tiss. Res.*, 162: 253-269.
- HATHAWAY D.O., TAMAKI, G., MOFFIT, H.R. AND BURDITT, A.K., 1985. – Impact of removal of males with sex pheromone-baited traps on suppression of the peach-twig borer, *Anarsia lineatella* (Zeller). – *Canadian Entomologist*, 117: 643-645.

- HART M., 2002. – The role of sonoc seales in the sexual communication of peach twig borer *Anarsia lineatella* (Lepidoptera: Gelechiidae). – *Bechelor of Science, University of Victoria, Master of Science in the Department of Biological Sciences*.
- HERN A. AND DORN S., 2004. – A female-specific attractant for the codling moth, *Cydia pomonella* (L.), from apple fruit volatiles. – *Naturwissenschaften*, 91: 77-80.
- HEVER H.R., 1934 – Study of *Zygaena*. Part III The mechanism of copulation and the passage of sperm in the female. – *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 2: 513-527.
- HIGHT S., BLOEM S., BLOEM K.A. AND CARPENTER J., 2003. – *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) observations of courtship and mating behaviors at two locations on the gulf coast of Florida. – *The Florida Entomologist*, 86(4): 400-408.
- HUEBNER E., 1982 – Spermathecal ultrastructure of the insect *Rhodnius prolixus* Stal. – *J. Morphol.*, 166: 1-25.
- HUNTER-JONES P., 1960 – Fertilization of eggs of the desert locust by spermatozoa from successive copulations. – *Nature.*, 185: 336.
- KEHAT M., ANSHELVICH L., GORDON D., HAREL M. AND DUNKELBLUM E., 1998. – Evaluation of Shin-Etsu twist-tie rope dispensers by the mating table technique for disrupting mating of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuide), and pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae). – *Bulletin of Entomologist Research*, 88:141-148.
- KHALIFA A., 1949 – Sperrmatophore production in Trichoptera and some other insects. – *Trans. Roy. Ent. Soc. Lond.*, 100: 449-479.
- LANDA V., 1960 – Use of an artificial spermatophore in the study of the activation of the spermatozoa and development of the spermatophore in the cockchafer – *Nature*, 190:935-936.

- LAUVERJAT S., 1969 – Effects de l'allatectomie sur le développement imaginal des voies gènetales femelles de *Locusta migratoria migratoroides* (Insecte : Orthoptere). – *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 268: 2109-2112.
- LEAHY M.G., CRAIG G.B., 1965 – Male accessory gland as stimulant for oviposition in mosquitoes. – *Mosq. News.*, 25: 448.
- LEOPOLD R.A., 1976 – The role of male accessory glands in insect reproduction. – *Ann. Rev. Ent.*, 21: 199-221.
- MANTON S.M. 1938 – The passage of spermatozoa into the ovary in *Peripatopsis*. – *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, B 228: 421-444.
- MILLAR J.G. AND RICE R.E., 1992. – Re-examination of the female sex pheromone of the peach twig borer: field screening of minor constituents of pheromone gland extracts and of pheromone analogs. – *Journal of Economic Entomology*, 85: 1709-1716.
- MILLAR J.G. AND RICE R.E., 1996. – 5-decen-1-yl acetate: powerful antagonist of peach twig borer (Lepidoptera: Gelechiidae) sex pheromone. – *Journal of Economic Entomology*, 89: 131-133.
- MOLINARI F., 2001. – I feromoni nella lotta ai fitofagi delle drupacee. – *Informatore Fitopatologico*, 10: 16-20.
- MOLINARI F., 2002. – Criteri per l'applicazione del metodo della confusione nella difesa del pesco – *Notiziario sulla protezione delle piante*, 14: 165-169.
- MOLINARI F. AND CRAVEDI P., 1988. – Synthetic pheromone and control of *Grapholita molesta* and *Anarsia lineatella*. Groupe de Travail "Protection Integree en Verger", Valence 31/8-2/9/1988, *Bulletin SROP* 11(7): 39-40.
- MOLINARI F AND CRAVEDI P., 1989. – Applicazione del metodo della confusione contro *Cydia molesta* Busck e prove preliminari su *Anarsia lineatella*. – *Boll. Zool. agr. Bachic. Ser.*, II(21): 163-182.

- MOLINARI F. and CRAVEDI P., 1991. – Difesa dei pescheti da *Cydia molesta* (Busck) e *Anarsia lineatella* Zeller. – *Informatore fitopatologico*, 4: 26-28.
- MOLINARI F. AND CRAVEDI P., 1991. – La difesa del pesco con il metodo della confusione. – *L'Informatore Agrario* 41(5): 26-28.
- MOLINARI F. AND CRAVEDI P., 1992. – The use of pheromones for the control of *Cydia molesta* (Busck) and *Anarsia lineatella* Zell. in Italy. – *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 27(1-4): 443-447.
- MOLINARI F. AND CRAVEDI P., 1993. – Mating disruption of *Cydia molesta* (Busck) and *Anarsia lineatella* Zeller in Italy. – OILB/SROP Groupe de Travail "Protection Integree en Verger", *Comptendu de la Reunion du Sous-groupe Pecher*, Rimini 4-5 Septembre 1992, 25-28.
- MOLINARI F., CRAVEDI P., RAMA F., REGGIORI F., DAL PANE M. AND GALASSI T., 2000. – L'uso dei feromoni secondo il metodo del "disorientamento" nella difesa del pesco da *Cydia molesta* e *Anarsia lineatella*. – *Atti delle Giornate Fitopatologiche*, vol I, 341-348.
- MOLINARI F. E CRAVEDI P., 2001. – Aggiornamento sulla difesa del pesco da anarsia. – *L'Informatore Agrario*, 31: 53-55.
- NICCOLI A., SACCHETTI P. and LUPI E., 1990. – Il metodo della confusione nel controllo di *Cydia molesta* (Busck) e *Anarsia lineatella* Zell. in un pescheto della Toscana. – *Redia*, LXXIII(2): 531-541.
- OKELO O., 1971 – Physiological control of oviposition in the female desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forst.). – *Canad. J. Zool.*, 49: 969-974.
- OMURA S., 1938 – Studies on the reproductive system of the male *Bombyx mori*. II. Post-testicular organs and post testicular behaviour of the spermatozoa. – *J. Fac. Agric. Hokkaido Imp. Univ. Sapporo.*, 40: 129-170.
- PARI P., SPADA G., GARAFFONI M., GUARDIGNI P., CANESTRALE R., MINGUZZI R., RAVIOLI M. AND CARLI G., 1990. – Il metodo della confusione sessuale nella difesa contro *Cydia molesta* Busck e

- Anarsia lineatella* Zell. nei pescheti dell'Emilia Romagna. – *Informatore Fitopatologico*, 10: 35-42.
- PARK K.C., OCHIENG S.A., ZHU J. AND BAKER T.C., 2002. – Odor discrimination using insect electroantennogram responses from an insect antennal array. – *Chem Senses*, 27: 343-352.
- PICKEL C., HASY J., BENTLEY W., OLSON W. AND GRANT J., 2002. – Pheromones control oriental fruit moth and peach twig borer in cling peaches. – *California Agriculture*, 56(5): 170-176.
- POOLE H.K., 1972 – The effect of tracheal interruption on the spermathecal wall of the queen honeybee. – *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139: 701-703.
- PRATT G.E., DAVEY K.G., 1972 – The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal). III. The effects of mating. – *J. Exp. Biol.*, 56: 223-237.
- REDDY V.P. AND GUERRERO A., 2004. – Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. – *Trends in Plant Science* 9(5): 253-261.
- RICE R.E., ATTERHOLT C.A., DELWICHE M.J. AND JONES R.A., 1977. – Efficacy of Mating disruption pheromones in paraffin emulsion dispensers. – *Technology Transfer in Monitoring Disruption IOBC Wprs Bulletin*, 20(1): 151-161.
- RIEMANN J.G., MOEN D.J. AND THORSON B.J., 1967 – Female monogamy and its control in horseflies. – *J. Insect Physiol*, 13: 407-418.
- ROELOFS W., KOCHANSKY J., ANTHON E., RICE R., AND CARDÉ R., 1975. – Sex pheromone of the peach twig borer moth (*Anarsia lineatella*). – *Environmental Entomology*, 4: 580-582.
- ROTHSCHILD G.H., 1975. – Control of oriental fruit moth (*Cydia molesta* (Busk) (Lepidoptera, Tortricidae)) with synthetic female pheromone. – *Bull. Ent. Res.*, 65: 473-490.

- ROTUNDO G. E VIGGIANI G., 1989. – Esperienze sul controllo dell'Anarsia e della Tignola orientale con il metodo della confusione sessuale. – *Inf. agr.*, 40: 67-68.
- RUEGG R., 1981 – Factors influencing reproduction in *Rhodnius prolixus*. – *Ph.D. Thesis*, York University.
- RUTHER J., REINECKE A., and HILKER M., 2002. – Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time-dependent bouquets and novel function of (Z)-3-hexen-1-ol as sexual kairomone. – *Ecological Entomology*, 27: 76-83.
- SCHALLER F., 1971 – Indirect sperm transfer by soil arthropods. – *Ann. Rev. Ent.*, 16: 407-446.
- SCHLAMP K.K., GRIES R., KHASKIN G., BROWN K., KHASKIN E., JUDD G.J. AND GRIES G., 2005. – Pheromone components from body scales of females *Anarsia lineatella* induce contacts by conspecific males. – *J. Chem. Ecol.*, 31(12): 2897-2911.
- SNODGRASS R.E., 1935 – Principles of Insect Morphology. – *McGraw-Hill*, New York.
- SNOW J., RAULSTON J.R. AND GUILLOT F.S., 1976. – Mating Tables: A method of studying the mating and the competitive behavior of Lepidoptera and Diptera in the field. – *Annals of the Entomological Society of America*, 69(4): 751-752(2).
- SUMMERS F.M., 1955. – The peach twig borer. – *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.*, 449.
- SUMMERS F.M., DONALDSON D. AND TOGASHI S., 1959. – Control of peach twig borer on almonds and peaches in California. – *J. Econ. Entomol.*, 52: 637-639.
- TREMBLAY E., 1990 – Fondamenti di entomologia generale.

- VILLAVASO E.J., 1974 – Artificial insemination of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman. – *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 67: 825-827.
- VILLAVASO E.J., 1975b –The role of spermathecal gland of the boll weevil *Anthonomus grandis*. – *J. Insect Physiol.*, 21: 1457-1462.
- WAAGE J.K., 1979 – Dual function of the damselfly penis: sperm removal and transfer. – *Science.*, 203: 916-918.
- WEIDNER H., 1934 – Beitrage sur Morphologie und Physiologie des Genitalapparates de weiblichen Lepodopteran. – *Z. Angew. Ent.*, 212: 239-290.
- WELTER S.C., PICKEL C., MILLAR J., CAVE F., VAN STEENWYK R.A. AND DUNELY J., 2005. – Pheromone mating disruption offers selective management options for key pests. – *California Agriculture*, 59(1): 16-22.
- ZALOM F.G., 1994. – Traps and lures for monitoring *Anarsia lineatella* and *Grapholita molesta* in almond and stone fruits. – *Acta Horticulture* 373: 269-276.
- ZALOM F.G., BARNETT W., RICE R.E. AND WEAKLEY C.V., 1992. – Factors associated with Flight Patterns of the Peach Twig Borer (Lepidoptera: Gelechidae) observed using pheromone traps. – *J. Econ. Entomol.*, 85(5): 1904-1908.