

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
ENTOMOLOGIA AGRARIA

Ciclo XXV

**Settore Concorsuale di afferenza:** 07/D1

**Settore Scientifico disciplinare:** AGR/11

**ALLEVAMENTO MASSALE DI *Aedes albopictus*  
(SKUSE) NELL'AMBITO DELLA TECNICA SIT  
(TECNICA DELL'INSETTO STERILE)**

**Presentata da:** Arianna Puggioli

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Maria Luisa Dindo**

**Relatore**

**Prof. Maria Luisa Dindo**

**Esame finale anno 2013**

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>1.1 La tecnica dell'insetto sterile</b>	<b>3</b>
1.1.1 La tecnica dell'insetto sterile per il controllo di malattie trasmesse da vettori	4
1.1.2 Storia della tecnica dell'insetto sterile contro le zanzare	6
<b>1.2 Allevamento e produzione massale</b>	<b>11</b>
1.2.1 Allevamento larvale	12
1.2.2 Controllo di qualità nel SIT	15
1.2.3 Dieta artificiale e allevamento di insetti come discipline di Scienza e Tecnologia	16
<b>1.3 Cenni di biologia e allevamento massale di <i>Aedes albopictus</i></b>	<b>17</b>
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Prove di valutazione della dieta larvale in piastre Petri</b>	<b>21</b>
2.1.1 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando due diete: "CAA" e "IAEA 1"	22
2.1.2 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando la dieta "IAEA 1"	24
<b>2.2 Prova di confronto tra diverse diete larvali</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Prove di valutazione di attrezzatura per l'allevamento massale di zanzare</b>	<b>28</b>
2.3.1 Utilizzo di vassoi per l'allevamento massale di <i>Ae. albopictus</i>	28
2.3.1.1 Effetto della densità larvale	28
2.3.1.2 Effetto dell'integrazione di lievito di birra nella dieta larvale	30
2.3.1.3 Effetto della temperatura	30
2.3.2 Utilizzo del carrello per allevamento massale di <i>Ae. albopictus</i>	31
2.3.2.1 Confronto tra vassoi isolati e carrello	31
2.3.2.2 Effetto della temperatura	32
<b>2.4 Prove di integrazione di carboidrati nella dieta larvale di <i>Ae. albopictus</i>: dati preliminari</b>	<b>32</b>
<b>2.5 ANALISI STATISTICHE</b>	<b>35</b>
<b>3. RISULTATI</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Prove di valutazione della dieta larvale in piastre Petri</b>	<b>36</b>
3.1.1 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando due diete: "CAA" e "IAEA 1"	36
3.1.2 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando la dieta "IAEA 1"	44
<b>3.2 Prova di confronto tra diverse diete larvali</b>	<b>48</b>

<b>3.3 Prove di valutazione di attrezzatura per l'allevamento massale di zanzare</b>	<b>50</b>
<b>3.3.1 Utilizzo di vassoi per l'allevamento massale di <i>Ae. albopictus</i></b>	<b>51</b>
3.3.1.1 Effetto della densità larvale	51
3.3.1.2 Effetto dell'integrazione di lievito di birra nella dieta larvale	52
3.3.1.3 Effetto della temperatura	53
<b>3.3.2 Utilizzo del carrello per allevamento massale di <i>Ae. albopictus</i></b>	<b>54</b>
3.3.2.1 Confronto tra vassoi isolati e carrello	54
3.3.2.2 Effetto della temperatura	55
<b>3.4 Prove di integrazione di carboidrati nella dieta larvale di <i>Ae. albopictus</i>: dati preliminari</b>	<b>56</b>
<b>4. CONSIDERAZIONI FINALI</b>	<b>57</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>63</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La tecnica dell'insetto sterile

La tecnica dell'insetto sterile (Sterile Insect Technique, SIT) è un metodo di controllo genetico specie-specifico e non inquinante per l'ambiente che consiste nell'immissione sul territorio di un grande numero di insetti sterili della specie da combattere. La sua efficacia aumenta al diminuire della dimensione della popolazione da combattere (Knipling 1955, 1979, 1998, Krawfur 1998, Dyck et al. 2005).

I maschi sterili accoppiandosi con le femmine selvatiche ne determinano la sterilità permanente e, se i maschi sono rilasciati in quantità sufficiente, per un sufficiente periodo di tempo, possono portare alla locale eliminazione o soppressione della popolazione di insetti nocivi.

L'inseminazione multipla delle femmine target (la non monogamia) non è necessariamente un fattore negativo, a condizione che i maschi sterili siano competitivi con i maschi selvatici riguardo particolari aspetti post copula quali l'inibizione della recettività sessuale delle femmine dopo l'accoppiamento e la competizione degli spermatozoi (Knipling 1955, Whitten e Mahon 2005).

L'applicazione di questa tecnica appare possibile in aree ben isolate da barriere geografiche, oppure dove la superficie trattata sia tanto vasta da ridurre il peso dell'immigrazione dall'esterno, o anche nel caso di specie con scarsa capacità di dispersione (Krawfur 1998, Keng-Hong 2000).

Programmi SIT applicati su larga scala hanno portato all'eliminazione della mosca del bestiame *Cochliomyia hominivorax* Coquerel dagli Stati Uniti, Messico e America Centrale, e anche dalla Libia, dove questa tecnica è stata utilizzata con successo per l'eliminazione di una invasione nel 1989 (Lindquist et al. 1992). Programmi SIT su larga scala sono stati promossi anche contro altre specie nocive, come la mosca mediterranea della frutta *Ceratitis capitata* Wiedemann e altri Ditteri Tefritidi negli Stati Uniti, America Centrale e Meridionale, Sud Africa, Europa e Asia; il verme rosa del cotone *Pectinophora gossypiella* Saunders negli Stati Uniti e la carpocapsa *Cydia pomonella* L. in Canada. In Italia un'applicazione pluriennale è stata effettuata da ENEA (allora CNEN), Centro Ricerche Casaccia, in collaborazione con "Joint Division FAO-IAEA", contro *C. capitata* nell'isola di Procida, Golfo di Napoli

(Cirio 1975, 1977). Le diverse decine di milioni di adulti, sterilizzati con raggi gamma e liberati nella fase centrale dell'esperimento (anni 1972-1973), hanno condotto quasi all'eradicazione della specie nell'isola, a giudicare dalle catture di maschi non irraggiati e dalla percentuale di frutta infestata (Cirio et al. 1987).

L'efficacia di questi progetti su larga scala richiede la costruzione di grandi impianti di allevamento di cui quello di El Pino, in Guatemala, il più grande del mondo, produce circa 2-4 miliardi di maschi sterili di mosca mediterranea della frutta a settimana principalmente per la California e il Guatemala.

La tecnica SIT è quindi attualmente considerata un'efficace strategia per l'eliminazione, l'eradicazione o la soppressione e per la prevenzione di aree dalla colonizzazione o ri-colonizzazione della popolazione da combattere (Dowell et al. 2000, Pereira et al. 2000, Alphey et al. 2010).

### **1.1.1 La tecnica dell'insetto sterile per il controllo di malattie trasmesse da vettori**

Il controllo dei vettori di patogeni, in particolare il controllo delle zanzare, è un problema difficile e complesso, come dimostrato dalla continua insorgenza e diffusione di malattie trasmesse da zanzare, tuttavia, a livello mondiale, è da lungo tempo considerato l'unica soluzione a disposizione per combattere alcune tra le più diffuse malattie trasmesse da zanzare, come per esempio la dengue e, con interesse sempre crescente, anche la malaria, almeno finché vaccini efficaci non saranno resi disponibili ai miliardi di persone esposte nei paesi poveri.

Come già detto, la tecnica dell'insetto sterile è risultata essere un metodo efficace nel controllo di diverse specie di insetti di interesse agrario (Dyck et al. 2005a). Studi di campo condotti negli anni '70 e '80 hanno dimostrato che la tecnica SIT poteva essere efficace pure contro le zanzare, anche con i mezzi allora a disposizione (Lofgren et al. 1974, Benedict and Robinson 2003). L'interesse nell'applicare tale tecnica anche contro i vettori è riemerso recentemente grazie anche allo sviluppo di nuove tecnologie che potrebbero apportare significativi miglioramenti alla tecnica e integrando opportunamente le attuali strategie per il controllo dei vettori. Questo tipo di approccio, come altri in uso e in via di sviluppo, non rappresenta una soluzione unica e definitiva per la risoluzione del problema, e sarà più appropriato per alcune situazioni e meno per altre. E' inoltre certamente

destinato a sollevare dubbi e domande nell'opinione pubblica e all'interno della comunità scientifica, domande a cui, in ogni modo, varrà la pena cercare di fornire risposte adeguate (Alphey et al. 2010).

Nel XX secolo i programmi per il controllo su larga scala dei vettori (tutti basati su largo uso di insetticidi) hanno ridotto drasticamente, in aree anche molto vaste, i livelli di trasmissione di patogeni. Alcuni esempi includono il controllo della febbre gialla e della malaria a Cuba e Panama grazie a un programma guidato da Gorgas e Ross (1901-1910), l'eliminazione di *Anopheles gambiae* Giles dal Brasile attorno al 1940, l'eliminazione della febbre gialla urbana dalle Americhe, l'eliminazione di *Aedes aegypti* L. in 23 paesi americani prima del 1960 (Soper e Wilson 1943, Soper 1963). In tempi più recenti, negli anni '80, Cuba è arrivata molto vicina dall'eradicare *Ae. aegypti* (Kouri et al. 1986) e anche a Singapore si è riusciti a mantenere, per oltre 30 anni, tale specie entro limiti di soglia molto bassi, sebbene l'incidenza di casi di dengue sia recentemente aumentata (Ooi et al. 2006, Egger et al. 2008). Oltre alle zanzare, il programma per il controllo dell'oncocerciasi nell'Africa occidentale (1974-2002) ha raggiunto i suoi obiettivi in 10 paesi su 11 (Amazigo e Boatman 2006). Questi programmi si basavano sull'utilizzo, su larga scala, di insetticidi ad ampio spettro d'azione, in particolare Paris Green (a base di rame e di arsenico) all'inizio del '900 e successivamente diclodifeniltricloroetano (DDT), ma più tardi anche di una vasta gamma di prodotti chimici integrati, in alcuni casi, da trattamenti farmaceutici, dal chinino nei primi tempi della malaria, all'ivermectina per l'oncocerciasi nei tempi odierni. Tali programmi sono stati altamente efficaci in passato e tutt'oggi gli stessi tipi di programmi, eseguiti su larga scala da organizzazioni internazionali per la sanità pubblica, sfruttano principi simili adottando, però, prodotti chimici meno pericolosi per l'ambiente e sfruttando le conoscenze ormai acquisite sull'insorgenza di fenomeni di resistenza. Eppure, in generale, non si sono ottenuti risultati stabili nel lungo periodo in termini di eliminazione dei vettori, di conseguenza la diffusione di malattie tende a persistere o ritorna nel momento in cui l'intensità dei programmi, dopo il successo iniziale, diminuisce. Questi sistemi costituiscono, in ogni modo, strumenti eccellenti per ridurre la popolazione e creare le condizioni ideali per l'applicazione della tecnica SIT.

Mediante la tecnica SIT si possono raggiungere la maggior parte degli obiettivi previsti dai programmi per la lotta ai vettori, senza alcuni degli svantaggi: gli insetti sterili, infatti, sono innocui per l'ambiente, non portano residui tossici e hanno un

minimo impatto su specie non target. Fenomeni di resistenza, seppure teoricamente possibili, molto raramente sono stati registrati in più di 50 anni di esperienze SIT su larga scala contro specie nocive per l'agricoltura. I programmi per l'applicazione della metodica SIT si sono dimostrati fattibili e, nonostante si renda comunque necessario un alto grado organizzativo come per i programmi di controllo convenzionali, risultano essere meno invasivi e, in linea generale, non richiedono l'accesso alle abitazioni private (Alphey et al. 2010).

Il requisito principale, per un possibile, positivo impiego della tecnica SIT contro i vettori, è la capacità di immettere in campo, su un'ampia area, un grande numero di maschi geneticamente sterili che siano sessualmente attivi. Molti sforzi devono essere fatti per cercare di eliminare il numero di femmine tra gli insetti rilasciati in campo in quanto la presenza di zanzare femmine può ridurre l'efficacia e il rendimento di tale tecnica e non ultimo può costituire un rischio di incremento di trasmissione di malattie (Benedict e Robinson 2003).

I sistemi utilizzati per allevare, sterilizzare e rilasciare in campo i maschi possono tutti avere un effetto negativo sulla fitness finale dell'insetto stesso, portando a dover lanciare in campo numeri molto maggiori di quelli previsti nel caso di più elevata qualità dei maschi. Negli ultimi anni si è andata sempre di più affermando la consapevolezza che la qualità degli insetti prodotti debba occupare un ruolo più importante nel processo di miglioramento della tecnica SIT e in qualsiasi progetto per l'applicazione del SIT contro le zanzare. Inoltre, considerando l'ampia distribuzione delle zanzare e la sovrapposizione di diversi vettori nelle stesse aree, appare ovvio che tale tecnica possa essere utilizzata per il controllo delle zanzare solo in certe specifiche condizioni, in particolare dove vi è la presenza di un solo vettore target (Benedict e Robinson 2003).

### **1.1.2 Storia della tecnica dell'insetto sterile contro le zanzare**

Un tipico progetto di applicazione della tecnica SIT contro le zanzare prevede la produzione in biofabbrica di milioni di maschi, la loro sterilizzazione e il rilascio in campo. Questi maschi hanno lo scopo di ridurre la popolazione selvatica tramite l'accoppiamento con le femmine vergini le quali, successivamente, depongono solo uova sterili. Ottimi risultati possono essere raggiunti rilasciando gli insetti sterili in

popolazioni la cui densità risulti diminuire sia stagionalmente o tramite l'uso di metodi convenzionali.

In passato sono stati effettuati lanci di maschi sterili di zanzara per diversi scopi relativi alla tecnica SIT (Figure 1.1a e 1.1b). Molti di questi avevano l'obiettivo di chiarire aspetti legati a specifici argomenti della ricerca e non hanno portato a un'immediata diminuzione della popolazione, anche se in realtà alcuni progetti di soppressione e/o eradicazione sono stati tentati. Tuttavia, in questi casi tali sperimentazioni non erano di dimensioni adeguate per essere efficaci su aree non isolate.

Il primo grande successo fu ottenuto contro *Culex quinquefasciatus* nel Myanmar (denominato poi Burma) (Laven 1967). In questo programma sono stati utilizzati maschi caratterizzati da incompatibilità citoplasmatica (CI) che, come si conosce oggi, è dovuta all'esistenza di diversi ceppi di *Wolbachia* in diverse popolazioni di zanzara. Il programma portò alla rapida eliminazione di una popolazione isolata di *Cx. quinquefasciatus*.

Altri programmi in generale hanno previsto la sterilizzazione, totale o parziale, dei maschi mediante aberrazioni cromosomiche, incompatibilità citoplasmatica, chemiosterilizzazione oppure distorsione della sex ratio dovuta a controllo dei processi meiotici.

In Francia, vicino a Montpellier, è stata eliminata una popolazione locale di *Culex pipiens* attraverso l'utilizzo di maschi resi parzialmente sterili mediante una traslocazione legata al cromosoma maschile (Laven et al. 1971).

Negli Stati Uniti, tramite maschi chemiosterilizzati, è stata eliminata con successo *Cx. quinquefasciatus* da un'isola al largo della Florida (Patterson et al. 1970).

In India, un programma molto ambizioso eseguito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) in collaborazione con il Consiglio Indiano per la Ricerca Medica (ICMR) ha previsto l'impiego di una combinazione di tutti questi approcci per il controllo di *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e *Anopheles stephensi*. Erano in corso lanci di grandi quantità di *Cx. quinquefasciatus* e si stavano programmando quelli di *Ae. aegypti*, ma il progetto non continuò e non arrivò al lancio di *An. stephensi*. Il programma WHO/ICMR rappresenta un esempio in cui studi di genetica e di ecologia erano in buon equilibrio con moderni principi di gestione (Pal 1974). Questo studio ha ottenuto importanti risultati sul piano operativo e scientifico, tuttavia



si sono osservati modesti effetti sulla sterilità delle uova deposte e sulla densità della popolazione selvatica. Il fallimento è stato attribuito all'immigrazione non prevista di femmine, già accoppiate, provenienti da aree distanti diversi chilometri all'interno dell'area di studio. Nonostante la campagna educativa avesse ottenuto pareri favorevoli da parte dell'opinione pubblica, un disastroso rapporto tra alcuni componenti dei media e componenti politici ha fatto nascere l'accusa ingiustificata di utilizzare le ricerche per fini bellici (Editorial 1975, Sehgal 1974, Jayaraman 1982).

Il primo programma ad avere successo contro zanzare appartenenti al genere *Anopheles* fu quello che portò all'eliminazione di una popolazione isolata di *Anopheles albimanus* mediante il rilascio di maschi chemiosterilizzati in un'area di 15 km<sup>2</sup> a El Salvador (Lofgren et al. 1974). Quando invece fu fatto un tentativo contro la stessa specie su larga scala, sempre a El Salvador ma sulla costa del Pacifico, la soppressione della popolazione fu ottenuta solo dopo aver ridotto l'area di prova (a 20 km<sup>2</sup>) rispetto al piano originale e, inoltre, fu introdotto un ceppo con separazione dei sessi ottenuta tramite una traslocazione legata al cromosoma Y (Dame et al. 1981). Si ottennero modesti risultati che, anche in questo caso, si ipotizzò fossero dovuti all'immigrazione nell'area di lancio di femmine precedentemente accoppiate e il progetto terminò con l'insorgere di una guerra civile.

Indipendentemente dalla specie target verso cui sono stati eseguiti questi programmi, varie cause di natura tecnica hanno contribuito al fallimento dei lanci di maschi sterili di zanzara: produttività al di sotto dei livelli aspettati dovuta all'assenza di ceppi a sesso genetico (sesso controllabile geneticamente) e a ritardi nella produzione, mancanza di adeguati livelli di fitness dei maschi e immigrazione di femmine nelle aree di lancio. Questi problemi, in ogni modo, sono da considerarsi preziosi insegnamenti per evitare di ripetere gli stessi errori in altri studi SIT contro le zanzare.

Table 1. Mosquito releases related to sterile insect technique<sup>a</sup>

Target	Year	Location	Sterility	No. released	Objective	Outcome	Refs
<i>Aedes aegypti</i>	1960–1961	Pensacola, FL, USA	Ga	4.6 million over 43 wks	Population reduction	Despite extremely overwhelming ratios of release to wild material, no effect could be concluded.	[35]
	1967	Meridian, MS, USA	Ma	17 000 fertile males over 2 wks	Morphological allele introgression	Out of 1084 eggs, two matings were to marked individuals.	[36]
	1971	Model Basti, India	Tr	30 000 translocation males over 4 wks	Persistence of translocation in wild population	Males were competitive and persistence of translocation was observed.	[37]
	1971	Shastri Nagar, India	Ma	~50 000 marked males over 4 wks	Allele introgression in wild population	Males were competitive and introgression of marker allele was observed.	[37]
	1974	Delhi, India	Ch, Tr or Sg	40 500 in 3 experiments of 6 days each	Male mating competitiveness	Males were competitive.	[38]
	1974	Mombassa, Kenya	Tr	57 000 over 10 wks	Population reduction and semi-sterility	Semi-sterility, but there was no long-term persistence of translocations nor a great effect on pupa and adult populations.	[39]
	1975	Mombassa, Kenya	Tr	31 500 over 9 wks	Population reduction and dynamics	Released males mated wild females, but eggs from these were not deposited in ovitraps, and hybrid progeny did not survive to pupa.	[40]
<i>Aedes albopictus</i>	1990–1991	E. St. Louis, IL, USA	Ma	21 000 males in 3 releases	Diapause and rare electromorph introgression	Evidence of introgression.	[41]
<i>Culex pipiens</i>	1970	Notre Dame, near Montpellier, France	Tr	100 s of thousands over 8 wks	Population reduction and semi-sterility	Persistence of translocation and population reduction were observed.	[42,43]
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1967	Okpo, Myanmar	Cl	5000 daily for 9 wks	Population elimination	Population eliminated.	[18]
	1968	Seahorse Key, FL, USA	Ch	2500 males per day for 8 wks	Population reduction	Increased sterility, but plateau in the number of egg rafts.	[44]
	1969	Seahorse Key, FL, USA	Ch	930 000 males over 12 wks	Population reduction	Population suppression and/or elimination due in part to sterile male release.	[20]
	1973	Village near Delhi, India	Cl + Tr or Ch	11 400 males in 2 experiments of 9 or 10 days	Male mating competitiveness	Males were competitive.	[45]
	1973	Village near Delhi, India	Tr + Cl	~23 million males over 14 wks	Population reduction, and sterility due to Cl and translocation	Sterility due to Cl and translocation with population reduction.	[46]
	1973	Village near Delhi, India	Ch	38 million males over 25 wks	Population reduction and sterility	Up to 90% sterile egg rafts, but no clear population suppression.	[37,47]
<i>Culex tarsalis</i>	1977	CA, USA	Tr	76 000 males over 4 wks	Population reduction	No measurable effect.	[48]
	1978	CA, USA	Tr	180 000 males over 2.5 months	Male competitiveness	Evidence of matings, but dispersal and competitiveness were low. No evidence of population reduction.	[49]
	1979	CA, USA	Ga	13 000 males in one release	Population reduction	Increased egg-batch sterility.	- <sup>b</sup>

(continued on next page)

Fig. 1.1a Lanci di zanzare relativi alla metodica SIT (da Benedict e Robinson 2003)

Table 1 (continued)

Target	Year	Location	Sterility	No. released	Objective	Outcome	Refs
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	1981	CA, USA	Ch	85 000 males over 8 wks	Population reduction and mating behavior	Assortative mating was observed and there was no population reduction.	[50]
	1982	CA, USA	Ma	159 000 males and females over 6 wks	Introgression of carmine eye color mutation	Allele frequency increased and persisted at a low level for up to 2 years after releases ended.	[51]
	1977	Punjab Province, Pakistan	Tr	167 000 over 2 wks	Male competitiveness	Males competed well for laboratory-reared females, but not wild females. Immigration prevented evidence of population reduction. Population eliminated.	[52]
<i>Anopheles albimanus</i>	1972	Lake Apastepeque, El Salvador	Ch	4.4 million males over 22 wks	Methods development and population reduction	Population eliminated.	[53,54]
	1977–1979	Pacific coast, El Salvador	Ch, Ga	100s millions males during 1977–1979	Population reduction	Population suppressed in contracted release area, but unexpected immigration believed to reduce effect.	– <sup>c</sup>
<i>Anopheles culicifacies</i>	1979	Pakistan	Tr	3100 males in 1 release	Mating with wild and released colony females	Assortative mating did not appear to have been selected during the (difficult) colonization process. Males were competitive.	[55]
	1980	Pakistan	Ch	7500 males in 1 wk.	Mating with wild and released colony females	Males were less competitive, but dispersal, swarming and mating were observed.	[56]
<i>Anopheles gambiae</i>	1968–1969	Burkina Faso	Hy	240 000 over 9 wks	Population reduction	No significant effect on egg-batch sterility. Dispersal was high, but male competitiveness was poor.	[57]
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	1959–1960	FL, USA	Ch	433 600 males over 48 wks at 2 locations	Population reduction and semi-sterility	No population reduction, and no or little semi-sterility was observed.	[58]
	1962–1963	Panasoffkee Creek, FL, USA	Ch	50 000 colony and wild males	Male competitiveness, behaviour, and sterilization methods	Mating with wild and colony females was observed.	[59]

<sup>a</sup>All SIT releases during the World Health Organization/Indian Council of Medical Research project are not included here. Abbreviations: Ch, chemosterilization; Ci, cytoplasmic incompatibility; Ga, gamma irradiation; Hy, hybrid male sterility; Ma, marker only (i.e. no sterility intended); Sg, segregation distorter; SIT, sterile insect technique; Tr, translocation and other chromosomal rearrangements.

<sup>b</sup>Asman, S.M. et al. (1980) A field release of irradiated male *Culex tarsalis* in California. In *Proceedings of the 48th Annual Conference of the Californian Mosquito Vector Control Association*, pp. 64

<sup>c</sup>Dame, D.A. et al. (1981) Assessment of released sterile *Anopheles albimanus* and *Glossina morsitans morsitans*. In *Cytogenetics and Genetic of Vectors: Proceedings of a Symposium of the XVIIth Int. Congress of Entomology*, pp. 231–248

**Fig. 1.1b** Lanci di zanzare relativi alla metodica SIT (da Benedict e Robinson 2003)

Da queste esperienze sono emerse una serie di linee guida illustrate da Benedict e Robinson (2003) e di seguito riassunte.

- 1) E' necessario avere la certezza che i maschi si accoppino con le femmine selvatiche nelle aree di lancio. Esperimenti di competizione in gabbia, effettuati in laboratorio, non garantiscono il successo dell'accoppiamento con le femmine selvatiche anche se necessari per avere una prima informazione.
- 2) I ceppi a sessaggio genetico migliorano grandemente l'efficienza e l'effetto di questi programmi e sono importanti per i lanci di zanzare.
- 3) E' necessario testare in anticipo la metodica di lancio e le aree dove verranno effettuate le prove tenendo conto anche delle condizioni climatiche della zona.

- 4) La sterilità delle femmine (misurata con metodiche adeguate) costituisce un indice della frequenza di accoppiamento, tuttavia la densità della popolazione del vettore target rappresenta un indice più rilevante dell'effetto dei lanci nelle aree di prova.
- 5) I livelli di produttività dell'allevamento devono essere accertati prima dell'inizio dei lanci.
- 6) I rilasci dei maschi devono essere programmati quando la popolazione è a livelli bassi, al fine di ottenere massimi risultati.
- 7) Nella fase di sviluppo di un programma SIT devono essere disponibili dati sul monitoraggio di aree con caratteristiche simili a quella di prova.
- 8) Capacità di accoppiamento e dispersione sono due fattori fondamentali per il controllo di qualità della fitness del materiale rilasciato.
- 9) L'isolamento delle aree di prova è una caratteristica che deve essere dimostrata in ogni prevedibile condizione climatica.
- 10) Informazioni sulla dispersione ottenute da altre fonti bibliografiche costituiscono un punto di partenza importante, tuttavia dati di monitoraggio ottenuti autonomamente prima di iniziare un programma sono essenziali per dimostrare l'efficacia della prova.
- 11) Infine, stabilità politica, buone relazioni con il pubblico, i media e le parti politiche sono fattori essenziali per sostenere gli sforzi perpetrati da qualsiasi programma per il controllo di specie target.

Sono stati fatti miglioramenti nella tecnica SIT, la quale, in combinazione con tecnologie avanzate sviluppate in parallelo, potrebbe diventare un metodo sicuro ed efficace non solo per la riduzione immediata della trasmissione, ma anche per acquisire esperienza in materia e contribuire, o meno, alla possibilità di utilizzare zanzare transgeniche (Benedict e Robinson 2003).

## **1.2 Allevamento e produzione massale**

Le zanzare, come altri insetti prodotti per l'applicazione della metodica SIT, devono essere sottoposte a diversi processi "innaturali" come la produzione su piccola e vasta scala. Dopo aver subito questi processi, i maschi di zanzara resi sterili devono, come avviene in natura, competere con i maschi selvatici per trovare e accoppiarsi con le femmine selvatiche.

Per questo motivo i processi di allevamento devono preservare il più possibile le caratteristiche necessarie per espletare tali funzioni. Al contrario della selezione naturale, che agisce favorendo una serie di caratteristiche che migliorano globalmente tutti gli aspetti della fitness di un individuo, le pratiche di allevamento in laboratorio sono volte a massimizzare solo alcune qualità. Bisogna tener conto che esiste ancora molta incertezza riguardo ad alcune di queste caratteristiche a causa della mancanza di dati, anche se è stato dimostrato che è possibile riconoscere e modificare certe caratteristiche legate alla competizione, al fine di produrre, in grandi quantità, maschi sterili efficienti (Benedict et al. 2009).

Un'accurata ricerca bibliografica riguardo altri programmi SIT e studi di acquicoltura costituiscono un presupposto indispensabile ai fini della messa a punto di un efficiente allevamento massale di zanzare, il cui sviluppo avviene per la maggior parte in ambiente acquatico.

Sono numerosi gli ambiti ancora poco conosciuti che richiedono ulteriori approfondimenti quali la dieta, la gestione dell'allevamento massale e i fattori genetici e fisiologici che influenzano la competitività nell'accoppiamento. Compromessi dovuti alla necessità di aumentare i numeri o a quella di ridurre i costi dovrebbero essere attentamente considerati alla luce delle prestazioni attese in campo (Benedict et al. 2009).

### **1.2.1 Allevamento larvale**

Le condizioni di allevamento delle larve hanno un effetto diretto, e spesso irreversibile, sull'adulto prodotto, appare quindi chiaro come l'utilizzo di una dieta ben caratterizzata costituisca una priorità, nel caso delle zanzare come di altri insetti. La creazione di un tale tipo di dieta non è un procedimento semplice e diretto come potrebbe sembrare e, solitamente, avviene tramite errori e tentativi (Cohen 2003).

Gli allevamenti massali non sono condotti in condizioni asettiche per cui è naturale la formazione di microrganismi che, essendo le larve di zanzara onnivore, vanno a costituire una grande porzione della dieta stessa. In programmi su larga scala per le zanzare non è mai stata usata una dieta veramente caratterizzata.

Al fine di ottenere produzioni massali efficienti, tutte le condizioni dovrebbero essere controllate e l'allevamento dovrebbe essere condotto con diete definite in

ambiente asettico, tuttavia un tale tipo di allevamento non sarebbe pratico su larga scala.

Una dieta chimicamente definita è stata utilizzata con successo per l'allevamento di diverse specie di culicini (Dadd e Kleinjan 1976), ma non è stata efficace per *Anopheles freeborni* (Dadd et al. 1977) sebbene allevamenti di piccole dimensioni di anofelini siano stati possibili (Rosales-Ronquillo et al. 1973). Un esempio interessante di predatore che diventa preda è quello in cui Munderloh et al., nel 1982, riuscì ad allevare larve di *An. stephensi* su colture cellulari di *Toxorhynchites*, una specie di zanzare predatrice di larve di zanzare.

Una dieta ottimale dovrebbe fornire componenti nutrizionali adeguati che influenzino positivamente le condizioni di allevamento e la qualità dell'insetto prodotto, dovrebbe essere economica, globalmente reperibile e di qualità riproducibile.

Le diete utilizzate per piccoli allevamenti che consistono di cibo per pesci, per esempio Tetramin®, sono di alta qualità ma molto costose e perciò non adatte per allevamenti massali. Come indicazione della quantità di dieta richiesta, e dell'importanza del costo, è stato stimato che per produrre un milione di maschi al giorno servono circa 2-3 kg al giorno di dieta larvale (Benedict et al. 2009).

Le diete finora utilizzate per allevamenti massali sono costituite da cibo per animali, il più economico possibile, essiccato e macinato (a volte privato dei grassi per evitare la formazione di patine), cereali, lievito, fegato di bovino e, ovviamente, quella flora di microrganismi non ben identificati che si possono formare in queste condizioni. I croccantini per gatti o per scimmie sono spesso utilizzati per l'allevamento, tuttavia questo tipo di dieta non è ideale per le larve di zanzara, non essendo stato creato appositamente per questo scopo, né può essere reperito globalmente nella stessa forma e con le stesse caratteristiche.

Nella pratica si sono ottenuti risultati positivi dall'utilizzo di tali ingredienti, ma non è facile capire se gli effetti positivi sulle larve derivino direttamente dalla dieta somministrata, dai microrganismi che si formano grazie alla dieta o piuttosto da entrambi (Benedict et al. 2009).

Un esempio in cui uno specifico componente della dieta è stato collegato alle prestazioni delle zanzare osservate in campo è quello relativo a lanci di *Culex tarsalis* effettuati in California. Durante questi esperimenti si è osservata una sensibile riduzione della competitività nella prima generazione di questa specie

(Reisen et al 1982). Essendo tali maschi geneticamente identici a quelli di campo, si sospettò che la causa fosse da imputare all'effetto dell'allevamento in laboratorio. In precedenza erano già state fatte osservazioni su un ridotto livello di acidi grassi in zanzare allevate in laboratorio rispetto al tipo selvatico (Dadd et al. 1988), e tale diminuzione era stata collegata alla capacità di volo (Dadd e Kleinjan 1978). Da una serie di esperimenti è stato possibile identificare diversi acidi grassi che erano presenti in minor quantità nelle zanzare allevate in laboratorio e che erano necessari per il volo e per l'accoppiamento. Di conseguenza gli autori raccomandarono l'utilizzo di diete integrate con olio di pesce o altre fonti di acido eicosapentanoico, un suggerimento poi non accolto da molti laboratori che hanno deciso di evitare diete larvali ricche in grassi. Esperimenti più recenti condotti da Huho et al. (2007) hanno dimostrato che la quantità totale di lipidi presente in zanzare di laboratorio era minore di quella presente nelle zanzare selvatiche anche se non sono state fatte ricerche più approfondite per analizzare gli acidi grassi in specifico. Tali considerazioni dovrebbero servire a focalizzare l'attenzione sull'importanza di controllare l'apporto di acidi grassi nella dieta di laboratorio indipendentemente dal peso totale, il contenuto di lipidi e il tasso di crescita (Benedict et al. 2009).

Per la mancanza di appropriati disegni sperimentali che isolino l'effetto della concentrazione di dieta e della densità larvale, della quantità di dieta disponibile e degli scarti accumulati ancora poco si conosce anche sulle interazioni spaziali e tattili nell'ambiente in cui avviene la crescita larvale. Timmermann e Briegel (1993) hanno dimostrato che un aumento della profondità dell'acqua influenza negativamente specie appartenenti al genere *Anopheles* ma non le *Aedes* e hanno osservato interazioni tattili inibitorie in *Culex sitiens* (Roberts 1998), tuttavia non è semplice separare l'effetto di variabili che interagiscono tra di loro in questo modo.

Un pratico compromesso tra un sistema di allevamento in cui le condizioni non siano tutte ben caratterizzate e uno ben definito anche dal punto di vista chimico potrebbe essere possibile e consiste nel produrre numerose specie di microrganismi (*Tetrahymena*, *Euglena*, *Chlamydomonas*), di misura definita, che potrebbero costituire un cibo complesso per le larve (Benedict et al. 2009).

Alcuni vantaggi dell'utilizzo di un tale sistema sono che questi protisti si nutrono di batteri e funghi nocivi per l'allevamento e possono essere allevati facilmente in grandi quantità in semplici terreni di coltura. Inoltre, molte specie sono mobili e si accumulano sulla superficie dell'acqua dove la maggior parte delle larve si

nutre. Un tale tipo di dieta complessa potrebbe essere adatta in particolare per le larve di *Anopheles*.

Finché gli studi sulle correlazioni tra dieta larvale e capacità di accoppiamento degli adulti non saranno approfonditi, un approccio conservativo è quello di scegliere una dieta complessa contenente grassi animali.

Lo sviluppo di una dieta larvale efficace risulta un elemento chiave per l'allevamento massale di zanzare e la qualità di tale dieta non può essere misurata semplicemente come l'abilità di chiunque ad allevare zanzare in laboratorio (Benedict et al. 2009).

### **1.2.2 Controllo di qualità nel SIT**

In linea generale la dimensione è considerata un parametro importante per valutare la qualità degli insetti, in particolare è considerata indice dello stato nutrizionale, nonché della presenza di riserve energetiche disponibili per il volo. In *C. hominivorax*, la dimensione di maschi adulti è stata correlata positivamente con la capacità di accoppiamento, la quale, in uno studio condotto da Alley e Hightower (1966), è risultata addirittura migliore che nel tipo selvatico.

Per quanto riguarda le zanzare, le evidenze disponibili non provano nessuna correlazione conclusiva tra la dimensione e la capacità di accoppiamento. E' stato osservato che le femmine di *An. gambiae* di grandi dimensioni sono preferite dai maschi per l'accoppiamento (Okanda et al. 2002), tuttavia non è dimostrato che le femmine prediligano per l'accoppiamento i maschi di maggiori dimensioni. Alcune osservazioni su questa specie suggeriscono che la dimensione del maschio sia irrilevante (Charlwood et al. 2002).

Protocolli di controllo di qualità sono stati predisposti per la mosca mediterranea della frutta, ad esempio per la dimensione e il peso della pupa, sfarfallamento, capacità di volo, longevità, sex ratio e propensione all'accoppiamento (Enkerlin et al. 2003, Enkerlin 2003, FAO IAEA USDA 2003). Il confronto di risultati ottenuti dagli stessi test in diverse biofabbriche ha permesso di stabilire determinati standard per ogni parametro per diverse specie, prima e dopo l'irraggiamento. Questi test, pur non misurando direttamente la competitività dell'insetto, forniscono indicazioni importanti sul processo di produzione, in particolare quando collegati al rilascio di maschi per la soppressione della popolazione.



In generale, le caratteristiche prese in considerazione per valutare la qualità di un insetto sono “qualità biologiche” che comprendono: il peso di un certo stadio, il periodo di sviluppo di un particolare stadio o dell'intera fase preimmaginale, la fecondità (il numero di uova deposte in un certo lasso di tempo o nell'intera vita dell'individuo), la fertilità (determinata come tasso di schiusa delle uova), il numero di generazioni prodotte in certe determinate condizioni (dieta, temperatura, umidità relativa) e la misura lineare di un parametro del corpo (larghezza della capsula cefalica, rapporto tra le misure di determinate parti del corpo, lunghezza dell'ala). I parametri relativi al comportamento, a volte considerati ai fini della qualità, sono la capacità di volo, il tasso di mobilità, la capacità di ricerca e “*handling time*” (Cohen 2001). In alcuni studi sono stati utilizzati test biochimici per esaminare eventuali contaminazioni della dieta o per valutarne la qualità (Sikarowski e Thompson 1984, Cohen 1990) e sono state impiegate anche analisi genetiche per valutare il grado di variabilità o di fitness di popolazioni allevate (Bartlett 1994). Inoltre, in alcuni studi, in particolare per organismi utilizzati nella lotta biologica o nella tecnica dell'insetto sterile, sono state effettuate prove di lancio e ricattura per valutare la fitness di individui prodotti dall'allevamento (Cohen e Staten 1994).

I risultati ottenuti in passato nei diversi tentativi di applicazione della tecnica SIT, utilizzando strumenti che oggi potrebbero sembrare obsoleti, costituiscono valide basi per mettere a punto metodi per la produzione più economici e di più alta qualità (Benedict et al. 2009).

### **1.2.3 Dieta artificiale e allevamento di insetti come discipline di Scienza e Tecnologia**

La qualità degli insetti allevati (zanzare, ma anche insetti entomofagi e fitofagi) è di importanza fondamentale per la maggior parte delle ricerche di carattere entomologico (Dindo et al. 2006, Grenier 2012). Oltre che per scopi legati alla ricerca, gli insetti allevati in laboratorio sono utilizzati anche per altri fini: da compagnie commerciali per i test di insetticidi, sviluppo di prodotti alternativi per il controllo di insetti nocivi quali feromoni, virus, piante resistenti all'ospite, e da settori industriali, globalmente in crescita, che si occupano della produzione di insetti utili. In tutti questi casi è importante che vengano utilizzati insetti di qualità il più elevata possibile pena il fallimento del prodotto proposto. Nonostante ciò è sorprendente

constatare come l'allevamento degli insetti sia poco considerato e apprezzato. La causa è forse da ricercarsi nel fatto che l'allevamento degli insetti come metodo non è considerato una scienza a sé stante, ma si interseca con numerose discipline. Comprende principi di nutrizione, fisiologia, comportamento, patologia, ecologia, genetica, scienze degli alimenti e persino ingegneria (Cohen 2001, 2003).

I progressi ottenuti nell'allevamento degli insetti sono derivati da diversi ambiti dove si è reso necessario o conveniente disporre di un certo numero, a volte anche molto numeroso, di insetti. A tal fine, etologi, genetisti, fisiologi, tossicologi e altri sono diventati, per necessità, pionieri della tecnologia di allevamento.

La natura interdisciplinare intrinseca nell'atto di allevare, insieme al fatto che allevare insetti non è solitamente un fine, ma un mezzo per risolvere problemi che non sono legati direttamente all'allevamento, sono almeno in parte le ragioni di una carenza di insegnamenti formali relativi a questa materia.

Recentemente si è, comunque, assistito a un cambiamento verso un'altra direzione: in risposta alla sempre crescente necessità di acquisire conoscenze in questo campo, sempre più istituzioni hanno iniziato ad offrire all'interno dei loro programmi corsi in allevamento di insetti che dovrebbe essere considerata una disciplina vera e propria facente parte dell'entomologia e conosciuta come "Scienza e Tecnologia di allevamento" (Cohen 2001, Dindo e Grenier in corso di stampa).

### **1.3 Cenni di biologia e allevamento massale di *Aedes albopictus***

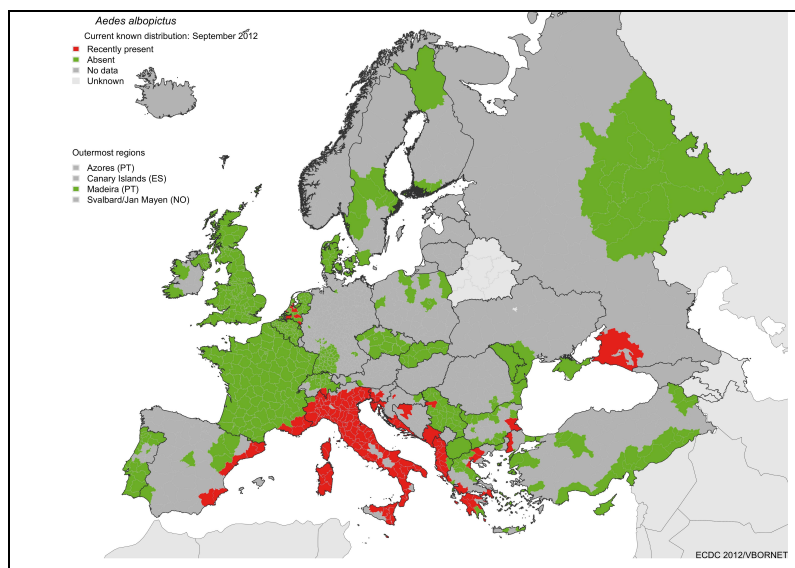
Negli ultimi 20 anni *Aedes albopictus* (Skuse), specie originaria del Sud-Est asiatico, si è diffusa in diversi continenti principalmente a causa del commercio internazionale di pneumatici usati (Reiter e Sprenger 1987, Benedict et al. 2007, Scholte e Schaffner 2007).

Il ciclo di sviluppo di questa specie è caratterizzato da quattro stati morfologicamente distinti: uovo, larva, pupa e adulto. Gli stati preimmaginali vivono in ambiente acquatico; dall'uovo fuoriesce la larva che si accresce attraverso quattro età. La larva matura s'impupa; dalla pupa sfarfalla l'adulto. Si tratta di una specie multivoltina, con diverse generazioni che si susseguono nel corso della stagione favorevole, in ambienti tropicali l'avvicendamento delle generazioni è continuo, mentre nelle regioni temperate, durante i mesi più freddi, si osserva una fase di quiescenza invernale (diapausa) che interessa lo stadio di uovo. Le uova, deposte

poco sopra la superficie dell'acqua, sulle pareti di piccole raccolte d'acqua naturali o artificiali, sono in grado di resistere anche per mesi all'essiccamento e di schiudersi solo quando sommerse a seguito di un innalzamento del livello dell'acqua (Hawley 1988, Romi 1994).

La sua rapida diffusione desta notevoli preoccupazioni in campo sanitario in quanto la specie è un vettore competente di diversi arbovirus come dengue e chikungunya (Gratz 2004) e potrebbe avere un ruolo nel ciclo di trasmissione di altri arbovirus e nella filaria del cane (Cancrini et al. 2003, Calzolari et al. 2010). Oltre al rischio per la salute umana e animale, questa specie arreca notevole disturbo a causa della sua attività trofica, fortemente antropofila e caratterizzata da estrema aggressività diurna.

In Italia *Ae. albopictus* si è insediata in gran parte del territorio nazionale (Figura 1.2) con vari livelli di infestazione grazie alla sua adattabilità biologica e alla capacità di superare la stagione invernale producendo uova diapausanti (Romi 1994). I risultati ottenuti impiegando metodi di lotta convenzionali non sembrano idonei a contenerla entro soglie soddisfacenti, probabilmente a causa della sua peculiare eco-biologia che la porta a colonizzare una grande varietà di contenitori per l'acqua posizionati in giardini privati, cortili e aree verdi urbane (Carrieri et al. 2006, Bellini et al. 2010). Inoltre, nell'estate 2007 è stata la causa scatenante della prima epidemia di chikungunya in Europa (Romi et al. 2008). Tale situazione rende necessaria la ricerca di nuove strategie in grado di assicurare risultati soddisfacenti nel tempo.



**Fig. 1.2** Distribuzione di *Ae. albopictus* in Italia e Europa aggiornata a settembre 2012 (mappa dal sito [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu))

La distribuzione a isole centrate sulle aree urbane e la scarsa propensione al volo rendono questa specie candidato ideale all'applicazione della lotta autocida, attraverso l'impiego della tecnica del maschio sterile (SIT).

I principali fattori di difficoltà connessi con lo sviluppo di tale tecnica sono imputabili principalmente alla necessità di rilasciare grandi numeri di individui sterili e quindi di disporre di grandi strutture per allevamenti massali, all'esigenza di disporre di un efficiente sistema di separazione dei sessi al fine di evitare il rilascio di femmine insieme ai maschi sterili, alla difficoltà di ottenere individui sterili sufficientemente vigorosi e competitivi con quelli fertili, alla perdita di vigore, di adattamento all'ambiente naturale e di affinità con la popolazione selvatica da parte dei ceppi allevati in laboratorio. Per questo i processi di produzione devono preservare e, se possibile migliorare, i caratteri necessari per tali funzioni (Benedict et al. 2009). Nella fase di allevamento massale, le condizioni di allevamento e la qualità della dieta hanno un effetto diretto e spesso irreversibile sulla qualità degli insetti ottenuti (Briegel e Timmermann 2001, Cohen 2003, Benedict et al. 2009).

Come riportato da Timmermann e Briegel (1999) la dieta larvale dovrebbe fornire un'ampia gamma di nutrienti al fine di evitare il rischio di carenze le quali potrebbero influenzare negativamente sia la produttività dell'allevamento sia la fitness dei maschi prodotti.

Un altro aspetto da considerare, quando si seleziona una dieta artificiale da utilizzare per allevamenti massali, è la scelta tra l'uso di diete grezze e indefinite verso alternative definite e lavorate. Come suggerito da Cohen (2001), ingredienti grezzi, come per esempio germe di grano, farina di soia, carne bovina e uova di pollo, sono relativamente poco costosi e con alto valore nutritivo, mentre diete altamente definite sono più costose e più complicate da preparare.

Dal 1999 è in corso, presso il laboratorio di Entomologia Medica Veterinaria del Centro Agricoltura Ambiente "G. Nicoli" (CAA) a Crevalcore (BO), una sperimentazione finalizzata a verificare la possibilità di attuare la tecnica SIT in Italia per sopprimere la popolazione di *Ae. albopictus* (Bellini et al. 2007). Le fasi principali per l'attuazione di questa tecnica sono: allevamento degli adulti per la produzione di uova, allevamento delle larve, separazione delle pupe maschio da quelle femmina tramite setacciamento (a 24 ore dall'impupamento), irraggiamento tramite raggi gamma (a 30-40 ore dal setacciamento) e rilascio in campo (Bellini et al. 2007).

**Alcuni aspetti, di cruciale importanza per migliorare l'efficienza di questa struttura pilota, oggetto della presente ricerca, sono stati l'acquisizione di dati sugli effetti di determinati costituenti della dieta larvale sullo sviluppo larvale stesso, per individuare intervalli limite di densità larvale e di concentrazione di cibo in cui è possibile lo sviluppo di tale specie, e sulla qualità dei maschi adulti ottenuti, la valutazione di attrezzatura per l'allevamento massale e la possibilità di migliorare la dieta larvale mediante integrazione di carboidrati.**

Le prove, al fine di perfezionare un modello di allevamento massale di *Ae. albopictus*, sono state condotte in celle climatizzate, con parametri di temperatura, umidità relativa e fotoperiodo controllati, presso il su menzionato laboratorio del CAA, in collaborazione con l'area Entomologia del Dipartimento di Scienze Agrarie dell'Università di Bologna e presso i laboratori dell'Unità "Insect Pest Control" dell'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica (IAEA) a Vienna.

## 2. MATERIALI E METODI

Gli studi compiuti possono essere suddivisi in:

- prove di valutazione della dieta larvale per testare l'effetto di diverse dosi di dieta e diverse densità larvali sullo sviluppo larvale, utilizzando come contenitori piastre Petri;
- prova di confronto tra diverse diete larvali utilizzando contenitori di maggiori dimensioni (500 ml di acqua);
- prove di valutazione di attrezzatura per l'allevamento massale di zanzare;
- prove di integrazione di carboidrati nella dieta larvale di *Ae. albopictus*.

Le concentrazioni di dieta sono sempre espresse in peso:volume (cioè grammi in 100 ml di liquido).

### 2.1 Prove di valutazione della dieta larvale in piastre Petri

Sono state analizzate le caratteristiche dello sviluppo di *Ae. albopictus* a diverse condizioni di laboratorio per individuare intervalli limite di densità larvale e di concentrazione di dieta in cui è possibile lo sviluppo di tale specie.

Sono state eseguite due prove, nella prima sono stati valutati i seguenti parametri: sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, tempo di impupamento e sfarfallamento (entrambi calcolati dallo stadio di larva di I età allo stadio rispettivamente di pupa e adulto) e sex ratio (intesa come proporzione di femmine ottenute sul totale di adulti).

Nella seconda prova l'analisi dei dati è stata effettuata a 24 ore dall'inizio dell'impupamento poiché, come riportato in precedenza, la fase di setacciamento delle pupe, per la separazione delle pupe maschio da irraggiare e rilasciare in campo, avviene in questa particolare fase. Sono stati presi in considerazione: sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto (calcolata dallo stadio di larva di I età allo stadio rispettivamente di pupa e di adulto a 24 ore dall'impupamento), sex ratio (percentuale di maschi presenti a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di adulti ottenuti) e percentuale di impupamento (percentuale di pupe prodotte a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di pupe ottenute).

E' stato utilizzato un ceppo di *Ae. albopictus* originato da uova raccolte in campo a Rimini, nel 2009, e conservate in laboratorio all'interno di celle climatizzate

a condizioni standard:  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$  UR, 12:12 L:B. Il ceppo è stato mantenuto in allevamento per una generazione e utilizzato per le prove (ceppo Rimini F2) (Bellini et al. 2007).

### 2.1.1 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando due diete: “CAA” e “IAEA 1”

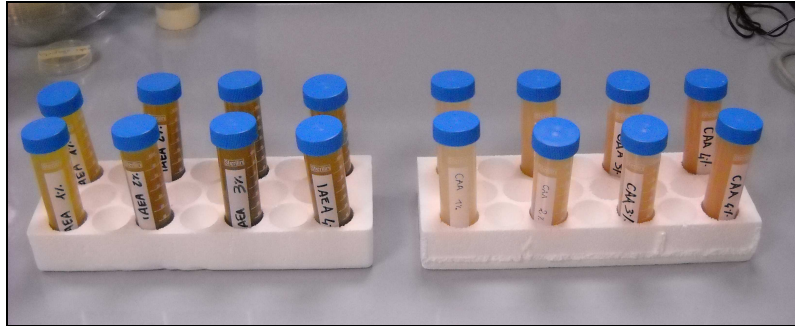
In questa prova sono state messe a confronto due diete larvali a diversa composizione: la dieta standard “CAA” (80% di croccantini per gatti Friskies®, 14% di lievito di birra, 6% di cibo secco per pesci Tetramin®) (Bellini et al. 2007) e la dieta “IAEA 1” (50% di fegato bovino essiccato, 50% di farina di tonno più una dose standard supplementare di mix di vitamine, Vitamin Mix) (Damiens et al. 2012) (Figura 2.1).



**Fig. 2.1** Componenti solidi della dieta “IAEA 1” e dieta “CAA”

Entrambe le diete sono state preparate in soluzione acquosa (utilizzando acqua deionizzata) pesando diverse quantità di ciascun componente, precedentemente polverizzato, per ottenere le concentrazioni desiderate.

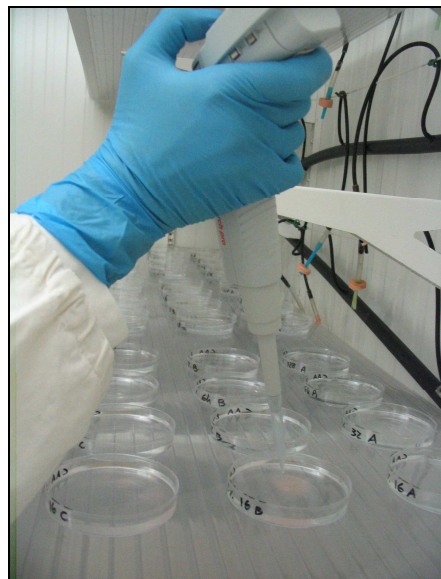
Per ciascuna dieta, sono state testate quattro diverse densità larvali (0,5, 1, 2, 4 larve/ml) insieme a quattro concentrazioni di dieta (1, 2, 3, 4%) (Figura 2.2) al fine di individuare quale delle due producesse i migliori risultati in relazione ai parametri considerati.



**Fig. 2.2** Dieta liquida “IAEA 1” e “CAA” a 4 concentrazioni

Sono state utilizzate larve di I età provenienti dal ceppo Rimini F2. Le larve sono state contate e trasferite in piastre Petri (diametro di 9 cm) in 32 ml di acqua demineralizzata.

Ogni giorno, ad ogni Petri, è stata somministrata una quantità pari a 640  $\mu$ l di ogni concentrazione di dieta (Figura 2.3) e, in orari prestabiliti (ore 9:00 e ore 16:00), è stato effettuato il controllo dei parametri: sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, tempo di impupamento, sfarfallamento e sex ratio (Figura 2.4).



**Fig. 2.3** Somministrazione giornaliera di dieta





**Fig. 2.4** Controllo dei parametri

In questa prova si sono tenuti fissi il volume del mezzo di allevamento (32 ml) e la dimensione dei contenitori per l'allevamento (piastre Petri di 9 cm di diametro), variando la concentrazione di cibo somministrato e la densità larvale.

### **2.1.2 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando la dieta "IAEA 1"**

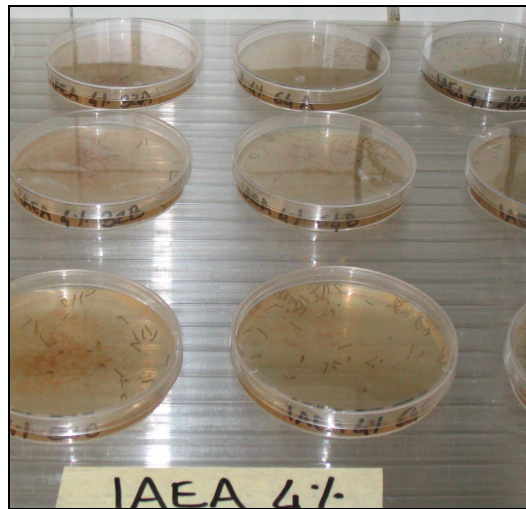
Sulla base dei risultati ottenuti dalla prima prova, si è deciso di proseguire la sperimentazione sulla dieta larvale utilizzando solo la dieta "IAEA 1" e provando ad incrementare sia la densità delle larve che la concentrazione di dieta da somministrare, tenendo fissi il volume del mezzo d'allevamento e la dimensione del contenitore. Al fine di ottenere un miglior rendimento nell'allevamento, in questa prova si è voluto definire la massima densità larvale raggiungibile senza incidere sulla sopravvivenza dei maschi prodotti.

Sono state testate quattro diverse densità larvale (2, 3, 4, 5 larve/ml) e quattro concentrazioni di dieta (4, 6, 8, 10%).

Anche per questa prova sono state utilizzate larve di *Ae. albopictus* di I età provenienti dal ceppo Rimini F2. Le larve sono state contate e trasferite in piastre Petri (diametro di 9 cm) riempite con 32 ml di acqua deionizzata.

Ogni giorno, ad ogni Petri, è stata somministrata una quantità pari a 640 µl di ogni concentrazione di dieta e, in orari prestabiliti (ore 9:00 e ore 16:00), è stato effettuato il controllo dei parametri per valutare, a 24 ore dall'inizio dell'impupamento:

sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, sex ratio e percentuale di impupamento (Figura 2.5).



**Fig. 2.5** Larve e pupe nelle piastre Petri

## **2.2 Prova di confronto tra diverse diete larvali**

Si è deciso di proseguire la ricerca utilizzando contenitori per l'allevamento delle larve di dimensioni maggiori, allo scopo di valutare l'applicabilità della dieta nell'ottica di allevamento massale.

Nel corso delle prove eseguite sono state confrontate le due diete impiegate nella prima prova ed una terza dieta nella quale un componente, più costoso, è stato in parte sostituito con altri, più convenienti dal punto di vista economico e della reperibilità.

Oltre ai parametri di sviluppo larvale considerati per le prove precedenti, sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, tempo di impupamento e sfarfallamento, e sex ratio (proporzione di maschi adulti sfarfallati rispetto alle femmine), si è considerata anche la produzione di pupe maschio a 24 ore dall'inizio dell'impupamento (proporzione di pupe maschio ottenute a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di pupe maschio ottenute) e la sex ratio a 24 ore dall'inizio dell'impupamento (proporzione di maschi adulti sfarfallati dalle pupe prodotte a 24 ore dall'impupamento rispetto alle femmine). Inoltre si è analizzato l'effetto delle tre diete su alcuni parametri riguardanti l'adulto: longevità dei maschi con e senza sostanze energetiche, dimensione del maschio in termini di misura dell'ala, longevità

di maschi e femmine messi nella stessa gabbia con sostanze energetiche, fecondità (in termini di numero di uova prodotte per femmina) e fertilità.

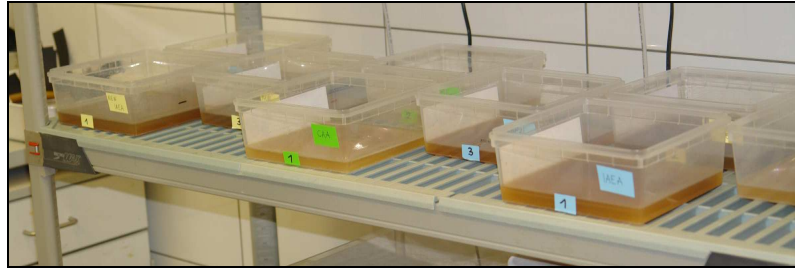
Queste prove sono state condotte durante un periodo di internato durato 5 mesi presso i laboratori dell'Unità "Insect Pest Control" dell'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica a Vienna.

Sono state messe a confronto tre diete larvali a diversa composizione: la dieta standard "CAA" (80% di croccantini per gatti Friskies®, 14% di lievito di birra, 6% di cibo secco per pesci Tetramin®), la dieta "IAEA 1" (50% di fegato bovino essiccato, 50% di farina di tonno più una dose standard supplementare di Vitamin Mix) e una dieta, variante della dieta "IAEA 1", in cui metà della quantità di fegato di bovino è sostituita da lievito di birra e farina di calamaro, dieta "IAEA 2" (25% di fegato bovino essiccato, 12,5% di lievito di birra, 12,5% di farina di calamaro, 50% di farina di tonno più una dose standard supplementare di Vitamin Mix).

E' stato utilizzato un ceppo di *Ae. albopictus* originato da uova raccolte in campo a Rimini, nel 2009, e conservate in laboratorio all'interno di celle climatizzate a condizioni standard:  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$  UR, 12:12 L:B. Il ceppo è stato mantenuto in allevamento per quattro generazioni e utilizzato per le prove (ceppo Rimini F5).

Le diete sono state preparate in soluzione acquosa (utilizzando acqua deionizzata) pesando quantità di ciascun componente, precedentemente polverizzato, per ottenere una concentrazione del 4%. Sono stati utilizzati contenitori delle dimensioni di 16,6X16,6X8 cm con 500 ml di acqua deionizzata fino ad ottenere una densità larvale di 1,5 larve/ml.

Ogni giorno, ad ogni contenitore, è stata aggiunta una quantità di 10 ml di dieta liquida (pari a 0,53 mg/larva/giorno di dieta "CAA" e 0,59 mg/larva/giorno di "IAEA 1" e "IAEA 2") (Figura 2.6). Alle larve di IV età è stata somministrata una dose doppia di dieta per sopperire all'aumentato fabbisogno di nutrienti delle larve prossime all'impupamento (Timmermann e Briegel 1999, Medici et al. 2011). In orari prestabiliti (ore 9:00, 15:00 e 16:00) è stato effettuato il controllo dei parametri.



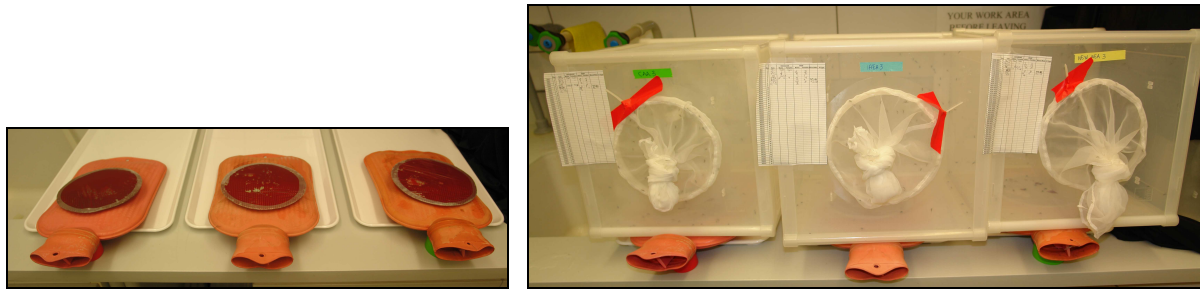
**Fig. 2.6** Contenitori utilizzati per la prova

Una volta sfarfallati, 50 maschi per ogni trattamento sono stati posti in gabbie (dimensioni 30X30X30 cm) senza nessuna sostanza energetica, solo con acqua, mentre altri 50 maschi sono stati posti in gabbie con libero accesso a soluzione zuccherina (soluzione di acqua e saccarosio preparata a una concentrazione del 10%) per valutarne la longevità. Un campione di maschi per ogni trattamento è stato analizzato per misurare le ali.

Per valutare i parametri di longevità e fecondità, 100 maschi e 100 femmine per ogni trattamento sono stati messi in gabbia con soluzione zuccherina e, per 15 giorni, tutti i giorni, è stato offerto un pasto di sangue alle femmine (Figura 2.7). Per il pasto di sangue è stato utilizzato sangue fresco bovino meccanicamente defibrinato e scaldato in piastre metalliche coperte da un sottile strato di parafilm (Figura 2.8).



**Fig. 2.7** Gabbie con adulti per valutare longevità e fecondità



**Fig. 2.8** Pasto di sangue

## 2.3 Prove di valutazione di attrezzatura per l'allevamento massale di zanzare

Sono state eseguite tre prove preliminari per testare le possibilità di allevamento larvale di *Ae. albopictus* in vassoi di grandi dimensioni realizzati per l'allevamento massale di *Anopheles arabiensis* (Balestrino et al. 2012). Queste prove preliminari hanno fornito indicazioni che hanno suggerito la possibilità di un futuro, positivo impiego dei vassoi per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*.

Le prove sui vassoi sono proseguite testando diverse densità larvali, diverse temperature di allevamento e valutando l'effetto dell'integrazione di lievito di birra nella dieta larvale. Sulla base dei risultati ottenuti, è stato testato l'utilizzo di un carrello ideato per l'allevamento massale di *An. arabiensis* (Balestrino et al. 2012) al fine di verificarne l'impiego anche su *Ae. albopictus*.

E' stato utilizzato un ceppo di *Ae. albopictus* originato da uova raccolte in campo in diverse località dell'Emilia Romagna, nel 2011, e conservate in laboratorio all'interno di celle climatizzate a condizioni standard:  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$  UR, 12:12 L:B, per 10 generazioni (RER F10).

### 2.3.1 Utilizzo di vassoi per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*

#### 2.3.1.1 Effetto della densità larvale

Le prove per testare i vassoi per l'allevamento massale di *Ae. albopictus* sono state effettuate riponendo i vassoi (dimensioni esterne 100X60X3 cm) su dei ripiani all'interno della cella climatizzata ( $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$  UR, 14:10 L:B) e ponendovi sopra un altro vassoio, a distanza di 3 cm, tramite dei distanziatori in plastica, per simulare la condizione di impiego dei vassoi all'interno del carrello proposto da IAEA

(Figura 2.9). Tale condizione determina la riduzione dell'evaporazione dell'acqua di allevamento, ne stabilizza la temperatura e, riparando dalla luce, facilita la distribuzione delle larve su tutta la superficie del vassoio.



**Fig. 2.9** Vassoi testati per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*

I vassoi sono stati riempiti con 6 litri di acqua deionizzata e testati a tre diverse densità larvali: 2, 3 e 4 larve per ml. Per raggiungere le densità desiderate, sono state introdotte in ogni vassoio rispettivamente 12.000, 18.000 e 24.000 larve di I età ( $L_1$ ). Le larve sono state ottenute facendo schiudere uova deposte su cartine per ovideposizione, precedentemente contate tramite procedure standardizzate di scansione digitalizzata, come descritto in Bellini et al. (2007).

Per l'allevamento è stata utilizzata dieta liquida "IAEA 1" (50% farina di tonno, 50% fegato di bovino in polvere e una dose standard di Vitamin Mix pari a 0,4 grammi in 100 ml di soluzione).

Ogni giorno, per quattro giorni, è stata somministrata ad ogni vassoio una quantità di dieta liquida pari a 120 ml. Diverse concentrazioni di dieta (5%, 7,5% e 10%) sono state preparate a seconda della densità testata (rispettivamente 2, 3 e 4 larve/ml), in modo da somministrare la stessa dose di cibo per larva equivalente a 0,5 mg/larva/giorno.

A 24 ore dall'inizio dell'impupamento, tutte le pupe formate sono state raccolte e sessate meccanicamente tramite un setaccio metallico a maglia 1400  $\mu\text{m}$  (Bellini et al. 2007). Le pupe passate sono state contate attraverso una stima volumetrica e

lasciate sfarfallare in appositi sfarfallatoi per il controllo della sex ratio, in modo da ottenere il numero di pupe passate al setacciamento, la percentuale di maschi prodotti (percentuale di pupe maschio presenti tra le pupe passate al setacciamento) e il rendimento di allevamento (numero di pupe passate rispetto alle L<sub>1</sub> utilizzate).

### **2.3.1.2 Effetto dell'integrazione di lievito di birra nella dieta larvale**

I risultati ottenuti dalle prove di confronto tra diverse diete hanno evidenziato una migliore sopravvivenza dei maschi adulti allevati con diete larvali contenenti carboidrati, facendo supporre possibili carenze nella dieta "IAEA 1" (Puggioli et al. in pubblicazione). Questi risultati hanno suggerito l'importanza di investigare l'effetto di tali componenti anche su parametri dello sviluppo e accrescimento degli stadi preimmaginali per verificare la possibilità di migliorare la separazione dei sessi.

E' stato quindi valutato l'effetto dell'integrazione di lievito di birra (composto da circa 40% di carboidrati) nella dieta larvale "IAEA 1", la dieta ottenuta è stata chiamata "IAEA\_BY" ed è risultata così composta: 50% farina di tonno, 36% fegato di bovino in polvere, 14% lievito di birra e una dose standard di Vitamin Mix pari a 0,2 grammi in 100 ml di soluzione.

Sono state condotte due prove: nella prima si è valutato l'effetto dell'integrazione del lievito di birra su due densità larvali, 2 e 3 larve/ml; nella seconda si è valutato l'effetto dell'integrazione di lievito di birra mantenendo costante la densità larvale, 3 larve/ml (in 6 litri di acqua deionizzata), e la temperatura, 30°C.

Ogni giorno, per quattro giorni, sono stati somministrati, per vassoio, 120 ml di dieta liquida alla concentrazione di 7,5%, in modo da somministrare la stessa quantità di cibo per larva (0,5 mg/larva/giorno).

Anche per questa prova sono stati valutati, a 24 ore dall'impupamento: il numero di pupe passate al setacciamento, la percentuale di maschi prodotti e il rendimento di allevamento.

### **2.3.1.3 Effetto della temperatura**

Al fine di valutare il funzionamento dei vassoi massali su *Ae. albopictus*, sono state effettuate ulteriori prove a diverse temperature, analizzando sempre gli stessi

parametri delle prove precedenti, numero di pupe passate al setacciamento, percentuale di maschi prodotti e rendimento di allevamento.

Le prove sono state effettuate su vassoi con densità larvale 3 larve/ml, in 6 litri di acqua deionizzata, ed è stata utilizzata la dieta integrata con il lievito di birra (dieta "IAEA\_BY"), somministrando 0,5 mg/larva/giorno.

Le temperature dell'acqua di allevamento testate, ottenute regolando ogni volta il parametro della temperatura dell'aria all'interno della cella climatizzata, sono state 25,5 – 26,5 – 28,5 – 29°C.

Ogni giorno, utilizzando un termometro a sonda, è stata controllata la temperatura dell'acqua di allevamento all'interno dei vassoi.

### **2.3.2 Utilizzo del carrello per allevamento massale di *Ae. albopictus***

#### **2.3.2.1 Confronto tra vassoi isolati e carrello**

Per valutare l'utilizzo del carrello ideato da IAEA (Balestrino et al. 2012) per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*, sono state condotte prove di allevamento per la comparazione degli effetti ottenuti con vassoi isolati e posizionati nel carrello (dimensioni esterne 78X100X209,7 cm) (Figura 2.10).



**Fig. 2.10** Carrello testato per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*



Le prove sono state effettuate utilizzando la densità larvale di 3 larve/ml, in 6 litri di acqua deionizzata, e somministrando alle larve dieta liquida "IAEA\_BY" (0,5 mg/larva/giorno). Nel carrello sono stati impiegati per l'allevamento 10 vassoi per ogni prova.

In entrambi i due metodi di allevamento in comparazione, la temperatura dell'acqua è stata impostata a 29 °C. La temperatura dell'acqua all'interno dei vassoi posizionati nel carrello risulta mediamente inferiore di 4°C alla temperatura dell'aria impostata all'interno della cella (Balestrino et al. 2012). Per tale motivo si è deciso di mantenere la temperatura della cella climatizzata a 31°C per le prove effettuate sui vassoi isolati e a 33°C per quelle che impiegavano il carrello. La temperatura all'interno dei vassoi isolati e dei vassoi riposti nel carrello è stata misurata ogni giorno utilizzando un termometro a sonda.

A 24 ore dall'inizio dell'impupamento il numero di pupe passate al setacciamento, la percentuale di maschi prodotti e il rendimento di allevamento sono stati analizzati in funzione del metodo di allevamento impiegato.

### **2.3.2.2 Effetto della temperatura**

Al fine di migliorare le procedure di sessaggio di pupe ottenute utilizzando il carrello, sono state effettuate prove di allevamento con temperatura dell'acqua a 28°C e 29°C. Durante le prove è stata utilizzata una densità larvale di 3 larve/ml in 6 litri di acqua deionizzata ed è stata somministrata dieta liquida "IAEA\_BY" (0,5 mg/larva/giorno).

A 24 ore dall'impupamento sono stati valutati il numero di pupe passate al setacciamento, la percentuale di maschi prodotti e il rendimento di allevamento.

## **2.4 Prove di integrazione di carboidrati nella dieta larvale di *Ae. albopictus*: dati preliminari**

Sono state condotte prove preliminari per valutare diete larvali, arricchite di carboidrati, in termini di produttività a 24 ore (numero di pupe ottenute a 24 ore dall'inizio dell'impupamento), sex ratio a 24 ore (percentuale di pupe maschio ottenute a 24 ore dall'inizio dell'impupamento) e qualità dei maschi adulti in riferimento alla longevità, performance sessuale e capacità di volo.

Dalle prove effettuate finora si è visto un miglioramento della separazione dei sessi integrando la dieta “IAEA 1” con componenti costituiti da carboidrati e buoni risultati sono stati ottenuti con la dieta “IAEA\_BY” (dieta “IAEA 1” integrata con il lievito di birra). Al fine di valutare e massimizzare i possibili effetti positivi dovuti all’integrazione di carboidrati è stata condotta una prova preliminare confrontando la dieta “IAEA 1”, la dieta “IAEA\_BY” e una terza dieta ottenuta sostituendo nella dieta “IAEA\_BY” il lievito di birra con amido solubile (dieta “IAEA\_SS”).

Oltre alla valutazione dei principali parametri di allevamento (numero di pupe passate al setacciamento, percentuale di maschi prodotti a 24 ore dall’impupamento e rendimento di allevamento), sono stati presi in considerazione ulteriori parametri per valutare l’effetto della dieta sul metabolismo basale e per attività che richiedono energie superiori quali: longevità dei maschi adulti senza riserve energetiche, capacità di volo e capacità di accoppiamento.

La prova è stata condotta utilizzando una densità larvale di 3 larve/ml e somministrando una quantità di dieta liquida pari a 0,5 mg per larva al giorno.

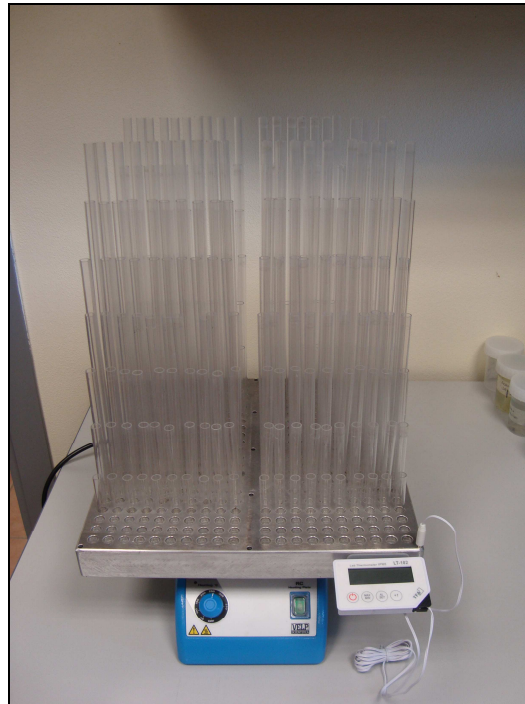
A 24 ore dall’impupamento le pupe prodotte sono state contate e sottoposte a setacciamento per la separazione dei sessi. Il sesso delle pupe passate è stato quindi verificato allo stereomicroscopio.

Per valutare le riserve immagazzinate durante la fase preimmaginale, 50 pupe maschio per ogni dieta sono state introdotte in gabbie di Plexiglas (15x15x15 cm) con uno strappo di carta imbevuto con acqua per l’analisi della longevità senza riserve energetiche (Figura 2.11). Giornalmente si è proceduto al conteggio e alla rimozione degli adulti morti.



**Fig. 2.11** Gabbie utilizzate per la prova di integrazione di carboidrati

Per valutare la capacità e la propensione al volo, 70 pupe maschio per ogni dieta sono state inserite in pozzetti alla base di tubi in Plexiglas di diverse altezze (7 altezze crescenti da 10 a 40 cm) (Figura 2.12). A due giorni dallo sfarfallamento si è verificata e registrata la mortalità pupale e la presenza o meno dell'adulto all'interno dei tubi.



**Fig. 2.12** Strumento utilizzato per valutare la capacità di volo

Infine, per valutare la capacità di accoppiamento, una pupa maschio è stata introdotta in una gabbia (15x15x15 cm) con uno strappo di carta imbevuto di acqua e con tre femmine vergini di età superiore a tre giorni. Ogni 24 ore le femmine del giorno precedente venivano prelevate per il controllo dello stato di inseminazione e sostituite con nuove femmine vergini fino alla morte del maschio. L'analisi dello stato di inseminazione è stato effettuato tramite il controllo delle spermatozoi per verificarne il riempimento. Sono stati osservati tre maschi per ciascuna dieta impiegata.

## 2.5 ANALISI STATISTICHE

I dati ottenuti nelle prove di valutazione della dieta larvale in piastre Petri sono stati analizzati tramite analisi della varianza (ANOVA) semplice o fattoriale per valutare differenze tra i parametri considerati ( $P < 0,05$ ) con test di separazione delle medie di Tukey: sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, tempo di impupamento, sfarfallamento e sex ratio.

Gli effetti della dieta sulla sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, la produzione di pupe maschio, il tempo di impupamento, sfarfallamento e sex ratio, valutati tramite la prova di confronto tra diverse diete larvali, sono stati analizzati con General Linear Model (GLM) con test di separazione delle medie di Tukey. Il metodo Kaplan-Meier è stato utilizzato per stimare la vita media dei maschi in funzione delle diverse diete larvali e risorse energetiche da adulti. Le differenze tra le longevità dei maschi in funzione delle diete sono state valutate utilizzando il test Log-rank, infine l'effetto della dieta sulla misura dell'ala del maschio, la produzione di uova e la fertilità è stato valutato utilizzando GLM con test di separazione delle medie di Tukey ( $P < 0,05$ ).

Anche il numero di pupe passate al setacciamento, la percentuale di maschi prodotti e il rendimento di allevamento, considerati nelle prove di valutazione di attrezzatura per l'allevamento massale di zanzare, sono stati analizzati utilizzando GLM con test di separazione delle medie di Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Prove di valutazione della dieta larvale in piastre Petri

Nella prima prova sono stati presi in considerazione: sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, tempo di impupamento e sfarfallamento (entrambi calcolati dallo stadio di larva di I età allo stadio rispettivamente di pupa e adulto) e sex ratio (intesa come proporzione di femmine ottenute sul totale di adulti).

Nella seconda prova l'analisi dei dati è stata effettuata a 24 ore dall'inizio dell'impupamento valutando: sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto (calcolata dallo stadio di larva di I età allo stadio rispettivamente di pupa e di adulto a 24 ore dall'impupamento), sex ratio (percentuale di maschi presenti a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di adulti ottenuti) e percentuale di impupamento (percentuale di pupe prodotte a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di pupe ottenute).

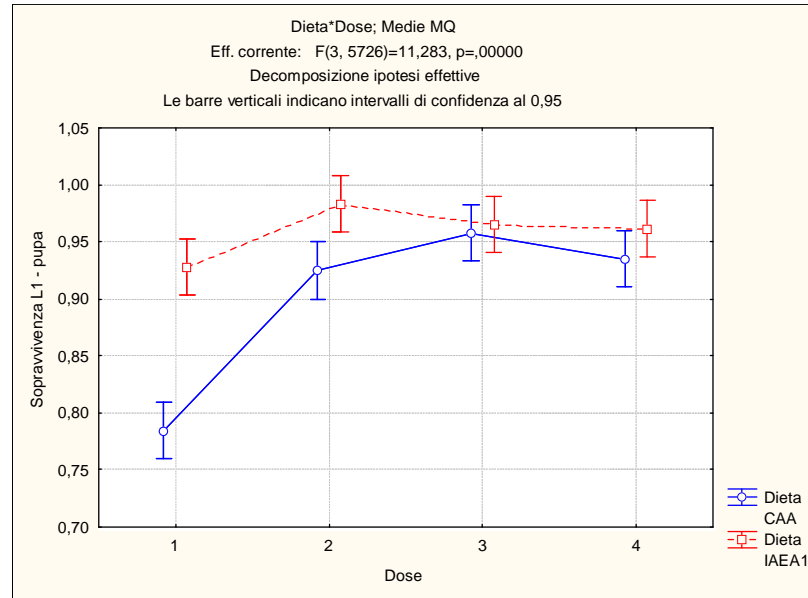
##### 3.1.1 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando due diete: "CAA" e "IAEA 1"

L'analisi della varianza effettuata per confrontare la sopravvivenza fino allo stadio di pupa di larve allevate con dieta "CAA" e dieta "IAEA 1" in funzione sia della dose di dieta sia della densità larvale è mostrata in Tabella 3.1.

**Tab. 3.1** ANOVA a tre vie per valutare la sopravvivenza fino allo stadio di pupa

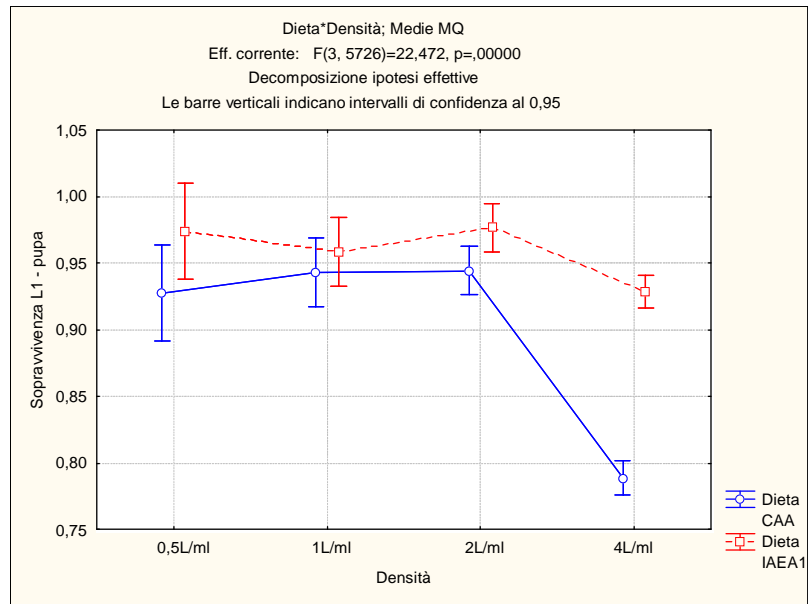
	<b>SS</b>	<b>Gradi di Libertà</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Intercetta</b>	2832,29	1	2832,29	43258,33	0,000000
<b>Dieta</b>	2,832	1	2,832	43,25	0,000000
<b>Dose</b>	6,016	3	2,005	30,63	0,000000
<b>Densità</b>	13,732	3	4,577	69,91	0,000000
<b>Dieta*Dose</b>	2,216	3	0,739	11,28	0,000000
<b>Dieta*Densità</b>	4,414	3	1,471	22,47	0,000000
<b>Dose*Densità</b>	29,91	9	3,323	50,76	0,000000
<b>Dieta*Dose*Densità</b>	6,339	9	0,704	10,76	0,000000
<b>Errore</b>	374,903	5726	0,065		

L'analisi effettuata in funzione della dose e del tipo di dieta ha evidenziato una maggiore sopravvivenza fino allo stadio di pupa con la dieta "IAEA 1", a carico soprattutto della dose più bassa (1%) (Figura 3.2).



**Fig. 3.2** Sopravvivenza fino allo stadio di pupa rispetto alle dosi di dieta per le diete "CAA" e "IAEA 1"

Si osservano differenze anche tra le due diete in funzione della densità larvale, in particolare alla densità più alta (4 larve/ml) (Figura 3.3).

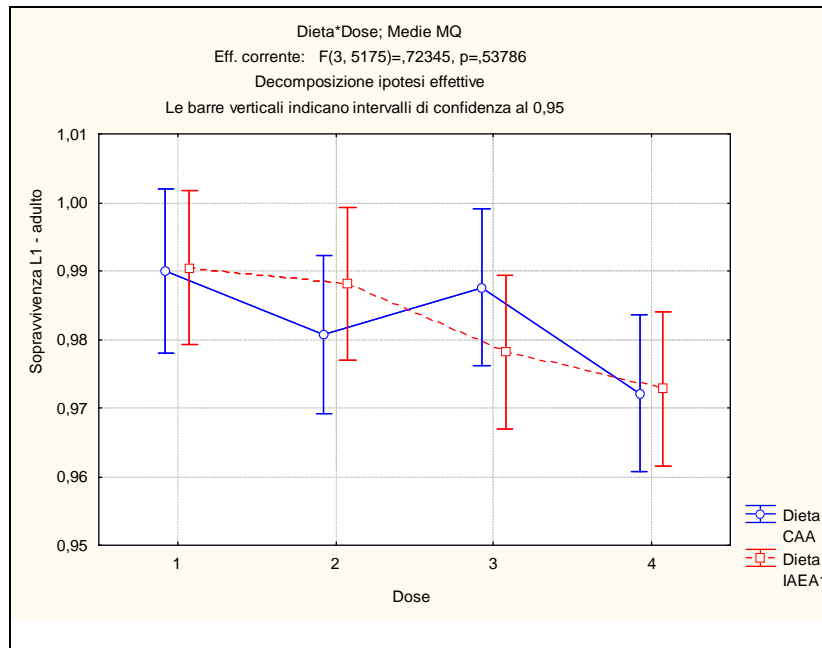


**Fig. 3.3** Sopravvivenza fino allo stadio di pupa rispetto alle densità larvali per le diete “CAA” e “IAEA 1”

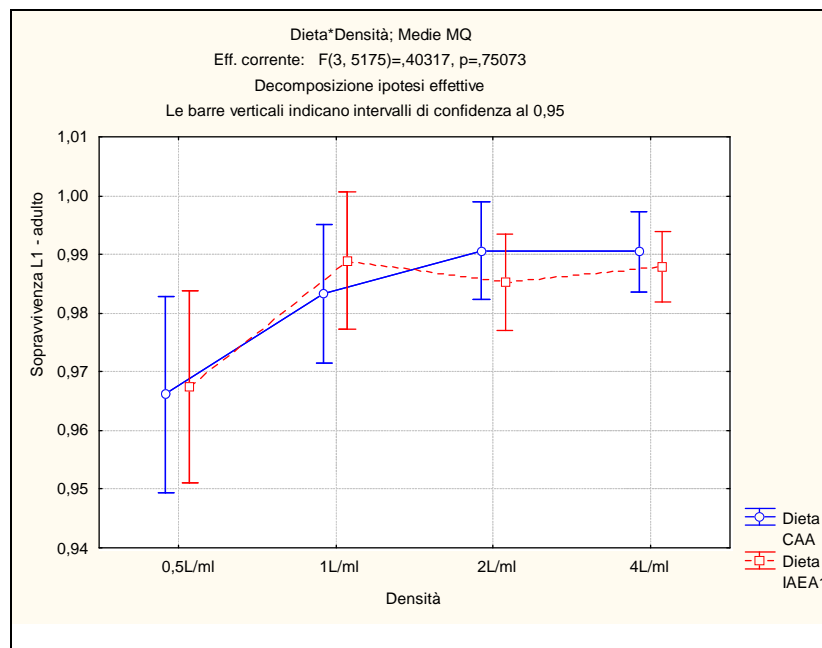
Per quanto riguarda la sopravvivenza fino all’adulto, invece, l’analisi dei dati non ha mostrato differenze significative tra le due diete (Tabella 3.4) in relazione alla dose e alla densità larvale (Figure 3.5 e 3.6).

**Tab. 3.4** ANOVA a tre vie per valutare la sopravvivenza fino allo stadio di adulto

	<b>SS</b>	<b>Gradi di Libertà</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Intercetta</b>	2965,236	1	2965,236	227226	0,000000
<b>Dieta</b>	0	1	0	0	0,960262
<b>Dose</b>	0,126	3	0,042	3,2	0,021682
<b>Densità</b>	0,161	3	0,054	4,1	0,006256
<b>Dieta*Dose</b>	0,028	3	0,009	0,7	0,537862
<b>Dieta*Densità</b>	0,016	3	0,005	0,4	0,750729
<b>Dose*Densità</b>	0,203	9	0,023	1,7	0,076764
<b>Dieta*Dose*Densità</b>	0,077	9	0,009	0,7	0,751817
<b>Errore</b>	67,532	5175	0,013		



**Fig. 3.5** Sopravvivenza fino allo stadio di adulto rispetto alle dosi di dieta per le diete “CAA” e “IAEA 1”



**Fig. 3.6** Sopravvivenza fino allo stadio di adulto rispetto alle densità larvali per le diete “CAA” e “IAEA 1”

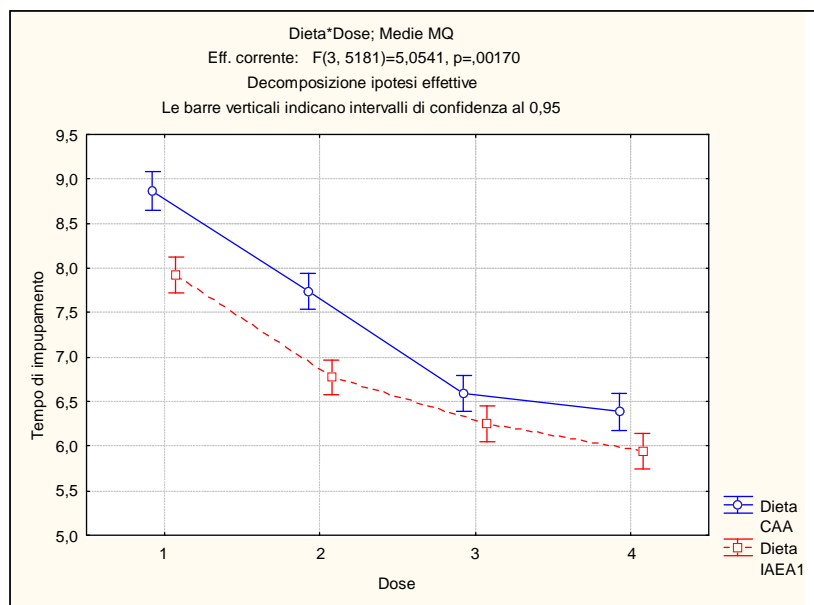
Per quanto riguarda il tempo di impupamento l’ANOVA a tre vie evidenzia differenze significative per tutti i fattori (Tabella 3.7).



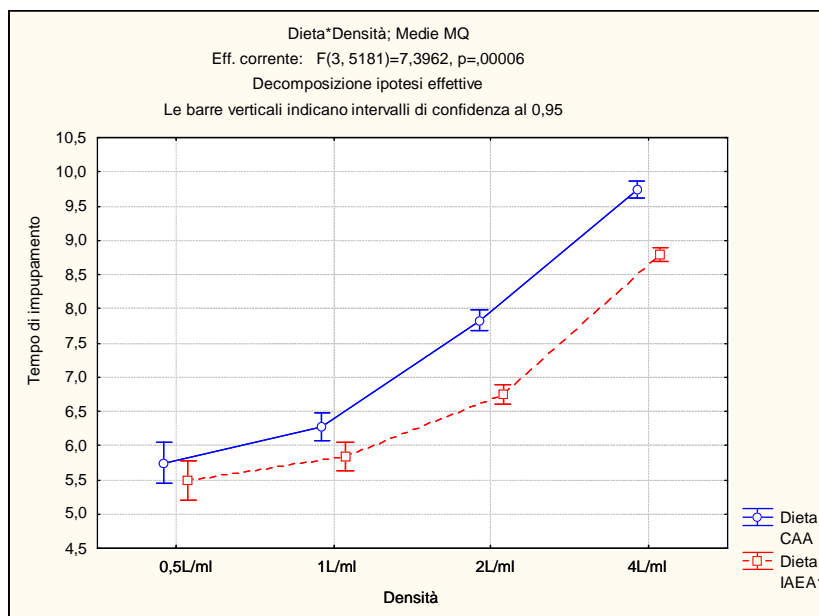
**Tab. 3.7** ANOVA a tre vie per valutare il tempo di impupamento

	<b>SS</b>	<b>Gradi di Libertà</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Intercetta</b>	153141,0	1	153141	37652,32	0,000000
<b>Dieta</b>	346,7	1	346,7	85,24	0,000000
<b>Dose</b>	2293,5	3	764,5	187,96	0,000000
<b>Densità</b>	9363,9	3	3121,3	767,43	0,000000
<b>Dieta*Dose</b>	61,7	3	20,6	5,05	0,001699
<b>Dieta*Densità</b>	90,2	3	30,1	7,4	0,000061
<b>Dose*Densità</b>	1496,8	9	166,3	40,89	0,000000
<b>Dieta*Dose*Densità</b>	244,4	9	27,2	6,68	0,000000
<b>Errore</b>	21072,4	5181	4,1		

Si osserva sia nel rapporto con la dieta sia con la densità larvale una differenza significativa tra le due diete (Figure 3.8 e 3.9).



**Fig. 3.8** Tempo di impupamento rispetto alle dosi di dieta

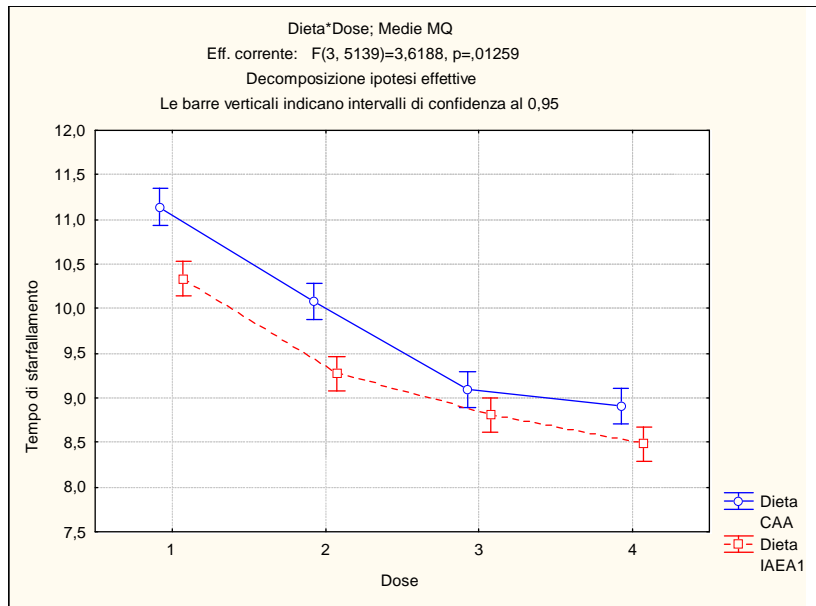


**Fig. 3.9** Tempo di impupamento rispetto alle densità larvali

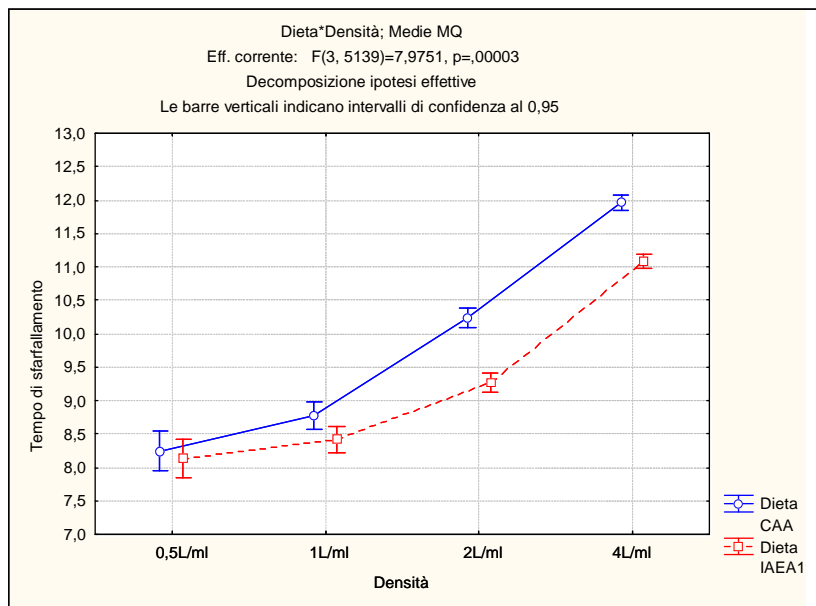
Dall'analisi dei dati (Tabella 3.10), il tempo di sfarfallamento è risultato significativamente inferiore con la dieta "IAEA 1" sia in relazione alla dose sia alla densità larvale (Figure 3.11 e 3.12).

**Tab. 3.10** ANOVA a tre vie per valutare il tempo di sfarfallamento

	SS	Gradi di Libertà	MS	F	P
<b>Intercetta</b>	272618,2	1	272618,2	71654,25	0,000000
<b>Dieta</b>	255	1	255	67,01	0,000000
<b>Dose</b>	1863,8	3	621,3	163,29	0,000000
<b>Densità</b>	7708	3	2569,3	675,31	0,000000
<b>Dieta*Dose</b>	41,3	3	13,8	3,62	0,012589
<b>Dieta*Densità</b>	91	3	30,3	7,98	0,000027
<b>Dose*Densità</b>	1327,6	9	147,5	38,77	0,000000
<b>Dieta*Dose*Densità</b>	214	9	23,8	6,25	0,000000
<b>Errore</b>	19552	5139	3,8		



**Fig. 3.11** Tempo di sfarfallamento rispetto alle dosi di dieta

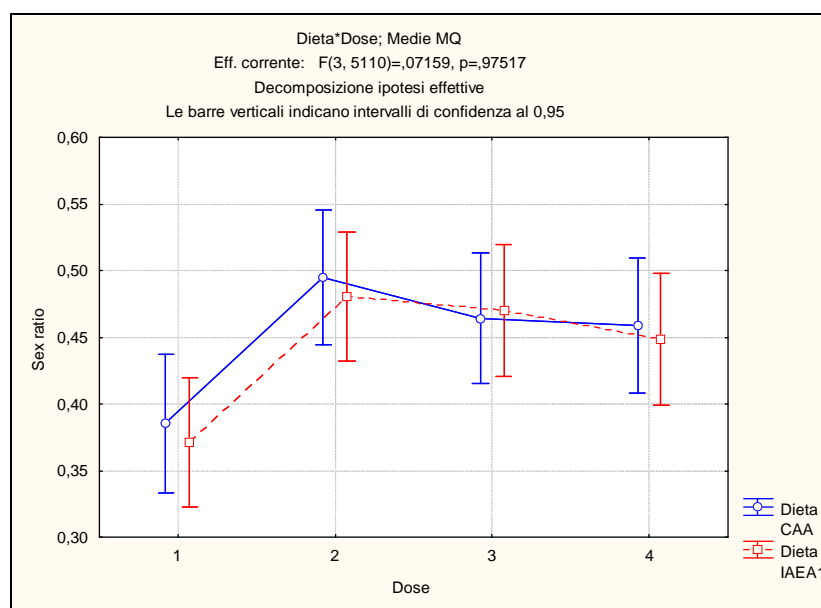


**Fig. 3.12** Tempo di sfarfallamento rispetto alle densità larvali

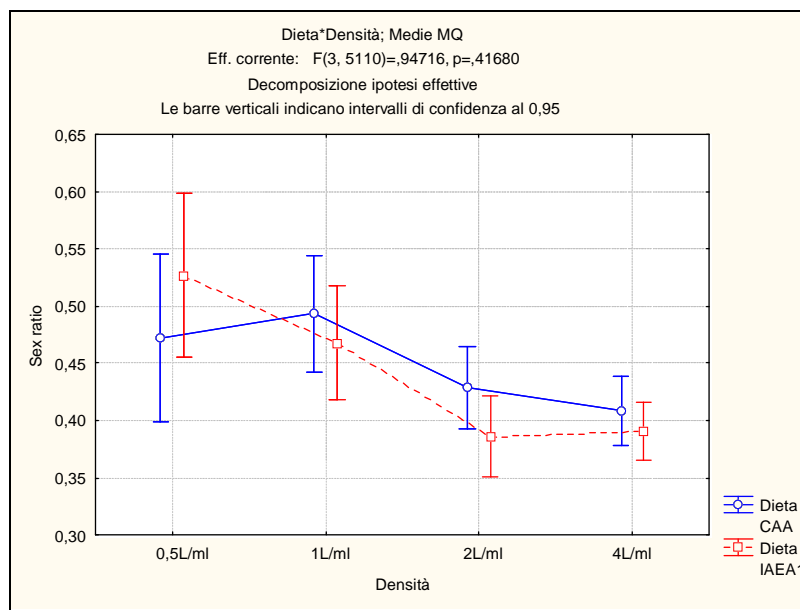
Dall'analisi della sex ratio (proporzione di femmine rispetto al totale di adulti ottenuti), non sono risultate differenze significative (Tabella 3.13), tuttavia si osserva che con la dieta "IAEA 1", alla dose di dieta più bassa, c'è una produzione leggermente inferiore di femmine (Figura 3.14), mentre alla densità larvale minore c'è una produzione di femmine maggiore (Figura 3.15).

**Tab. 3.13** ANOVA a tre vie per valutare la sex ratio

	<b>SS</b>	<b>Gradi di Libertà</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Intercetta</b>	597,48	1	597,48	2485,933	0,000000
<b>Dieta</b>	0,051	1	0,0509	0,212	0,645275
<b>Dose</b>	5,045	3	1,6816	6,996	0,000108
<b>Densità</b>	6,124	3	2,0413	8,493	0,000013
<b>Dieta*Dose</b>	0,052	3	0,0172	0,072	0,975166
<b>Dieta*Densità</b>	0,683	3	0,2276	0,947	0,416799
<b>Dose*Densità</b>	6,67	9	0,7411	3,084	0,001072
<b>Dieta*Dose*Densità</b>	6,782	9	0,7536	3,135	0,000897
<b>Errore</b>	1228,16	5110	0,2403		



**Fig. 3.14** Sex ratio rispetto alle dosi di dieta



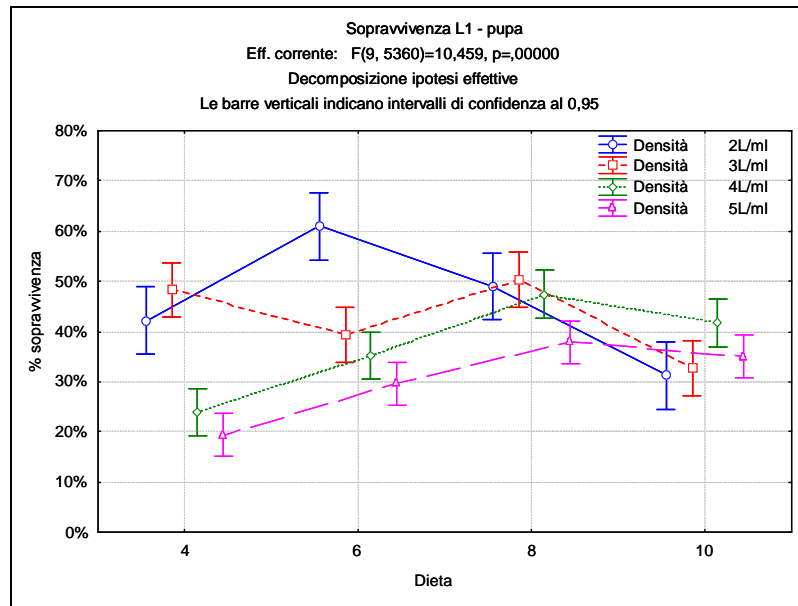
**Fig. 3.15** Sex ratio rispetto alle densità larvali

### 3.1.2 Effetto della dose di dieta e della densità larvale utilizzando la dieta “IAEA 1”

Dall’analisi della sopravvivenza fino allo stadio di pupa, effettuata con ANOVA a due vie a 24 ore dall’inizio dell’impupamento (Tabella 3.16), si può evidenziare che la maggiore percentuale di sopravvivenza (61%) si ha con una concentrazione di dieta al 6 % e una densità di 2 larve/ml, mentre alla densità di 4 larve/ml si ottiene il 50 % di sopravvivenza con la dieta dell’8%, con la dieta al 10% si ha comunque una diminuzione (forse dovuta a qualche effetto tossico della dieta, o per la possibile presenza di troppe vitamine che potrebbe aver provocato effetti di ipervitaminosi) (Figura 3.17).

**Tab. 3.16** ANOVA a due vie per valutare la sopravvivenza fino allo stadio di pupa

	<b>SS</b>	<b>Gradi di Libertà</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Intercetta</b>	727,884	1	727,8839	3247,459	0,000000
<b>Dieta</b>	12,197	3	4,0656	18,139	0,000000
<b>Densità</b>	17,812	3	5,9373	26,489	0,000000
<b>Dieta*Densità</b>	21,099	9	2,3443	10,459	0,000000
<b>Errore</b>	1201,388	5360	0,2241		

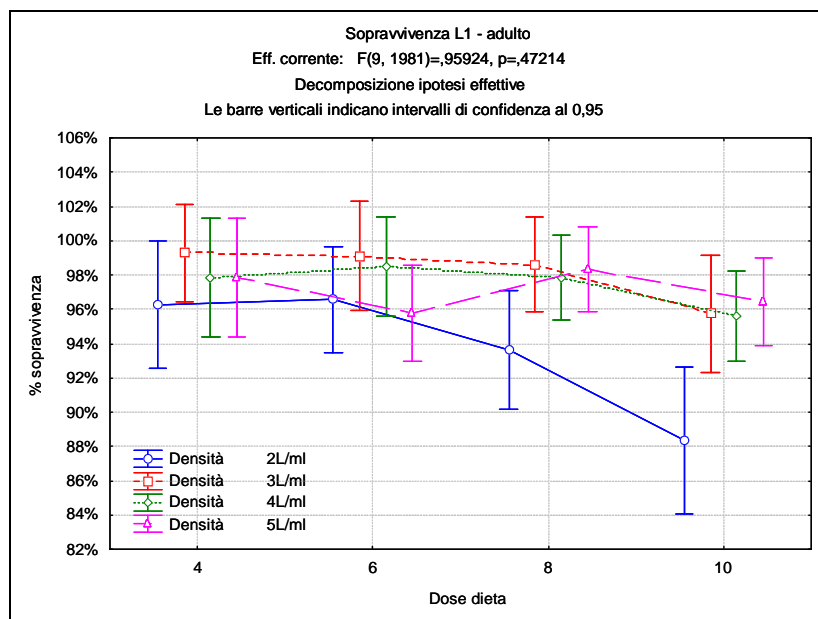


**Fig. 3.17** Sopravvivenza fino allo stadio di pupa a 24 ore dall'impupamento in funzione delle dosi di dieta

L'analisi della sopravvivenza fino allo stadio adulto, effettuata con ANOVA a due vie a 24 ore dall'inizio dell'impupamento (Tabella 3.18), non ha mostrato differenze significative in funzione della dieta e della densità larvale (Figura 3.19).

**Tab. 3.18** ANOVA a due vie per valutare la sopravvivenza fino allo stadio adulto

	SS	Gradi di Libertà	MS	F	P
<b>Intercetta</b>	1694,126	1	1694,126	58558,71	0,000000
<b>Dieta</b>	0,377	3	0,126	4,34	0,004651
<b>Densità</b>	0,436	3	0,145	5,02	0,001814
<b>Dieta*Densità</b>	0,25	9	0,028	0,96	0,472141
<b>Errore</b>	57,311	1981	0,029		

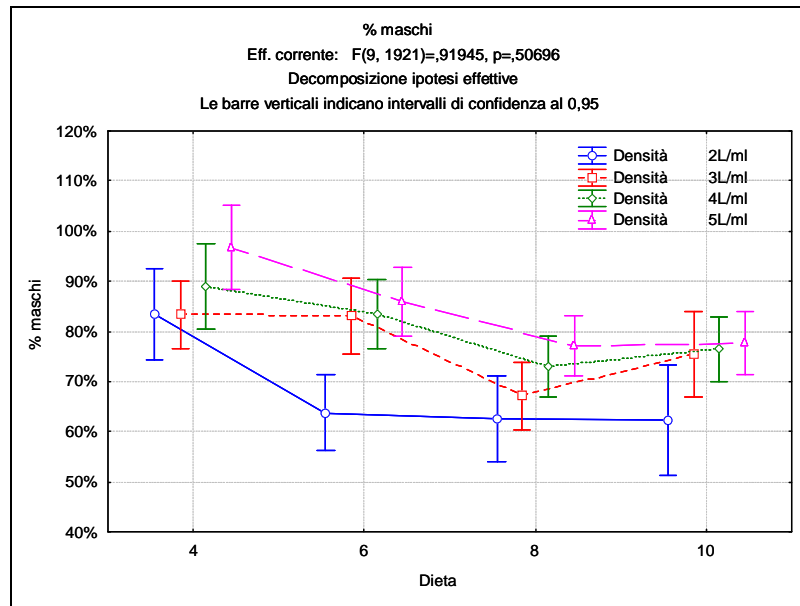


**Fig. 3.19** Sopravvivenza fino allo stadio adulto a 24 ore dall'impupamento in funzione delle dosi di dieta

L'analisi della sex ratio (percentuale di maschi presenti a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di adulti ottenuti) (Tabella 3.20) ha evidenziato che con la dieta al 4%, per tutte le densità, si è ottenuta una percentuale elevata di maschi, mentre alle concentrazioni di dieta più alte si è osservato che la percentuale di maschi è risultata minore, probabilmente alla dose del 4% l'apporto di nutrienti è sufficiente per lo sviluppo dei maschi ma non è adeguato per lo sviluppo delle femmine. Tali risultati potrebbero far presupporre un possibile effetto di sottoalimentazione delle larve (Figura 3.21).

**Tab. 3.20** ANOVA a due vie per valutare la sex ratio

	SS	Gradi di Libertà	MS	F	P
<b>Intercetta</b>	1046,073	1	1046,073	6243,721	0,000000
<b>Dieta</b>	8,145	3	2,715	16,205	0,000000
<b>Densità</b>	5,546	3	1,849	11,033	0,000000
<b>Dieta*Densità</b>	1,386	9	0,154	0,919	0,506958
<b>Errore</b>	321,844	1921	0,168		



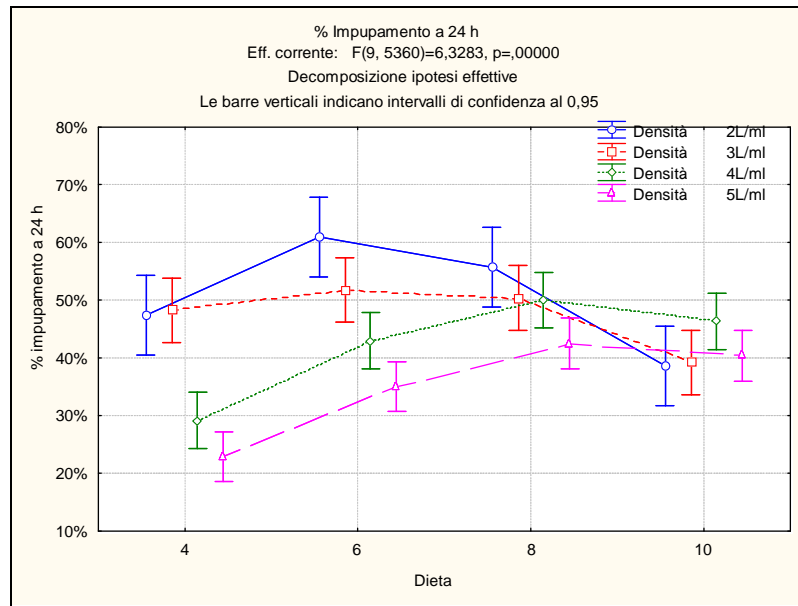
**Fig. 3.21** Sex ratio a 24 ore dall'impupamento in funzione delle dosi di dieta

Dall'analisi della percentuale di impupamento (percentuale di pupe prodotte a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di pupe ottenute) (Tabella 3.22) si osserva che la percentuale maggiore di pupe prodotte si ha con una densità di 2 larve/ml e una dose di dieta del 6%. Una buona produttività di pupe si ha anche alla densità di 4 larve/ml, ma con una dose di dieta maggiore (8%) (Figura 3.23).

**Tab. 3.22** ANOVA a due vie per valutare la percentuale di impupamento

	SS	Gradi di Libertà	MS	F	P
<b>Intercetta</b>	920,322	1	920,3224	3906,602	0,000000
<b>Dieta</b>	12,359	3	4,1196	17,487	0,000000
<b>Densità</b>	17,96	3	5,9868	25,413	0,000000
<b>Dieta*Densità</b>	13,418	9	1,4908	6,328	0,000000
<b>Errore</b>	1262,716	5360	0,2356		





**Fig. 3.23** Percentuale di impupamento a 24 ore dall'inizio dell'impupamento in funzione delle dosi di dieta

### 3.2 Prova di confronto tra diverse diete larvali

I parametri considerati per questa prova sono stati: sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto, tempo di impupamento e sfarfallamento, sex ratio (proporzione di maschi adulti sfarfallati rispetto alle femmine), produzione di pupe maschio a 24 ore dall'inizio dell'impupamento (proporzione di pupe maschio ottenute a 24 ore dall'impupamento rispetto al totale di pupe maschio ottenute) e sex ratio a 24 ore dall'inizio dell'impupamento (proporzione di maschi adulti sfarfallati dalle pupe prodotte a 24 ore dall'impupamento rispetto alle femmine). Si sono inoltre valutati: longevità dei maschi con e senza sostanze energetiche, dimensione del maschio in termini di misura dell'ala, longevità di maschi e femmine messi nella stessa gabbia con sostanze energetiche, fecondità (in termini di numero di uova prodotte per femmina) e fertilità.

L'analisi dell'effetto della dieta sulla sopravvivenza fino allo stadio di pupa non ha dato differenze significative ( $F_{2,6}=2,66; P>0,05$ ). I valori medi di sopravvivenza per le tre diete ( $\pm$  ES) sono stati: 0,97 ( $\pm 0,02$ ) per la dieta "CAA", 0,89 ( $\pm 0,03$ ) per "IAEA 1" e 0,93 ( $\pm 0,01$ ) per "IAEA 2".

Si sono osservate invece differenze significative tra le diete per quanto riguarda la sopravvivenza fino allo stadio adulto ( $F_{2,12}=10,87; P<0,05$ ) (Tabella 3.24).

La dieta ha avuto effetto significativo anche sul tempo di impupamento e di sfarfallamento (rispettivamente  $F_{2,12}=118,1$ ;  $P<0,001$  e  $F_{2,12}=119$ ;  $P<0,001$ ), l'analisi ha evidenziato un minor tempo di impupamento relativamente alle due diete "IAEA 1" e "IAEA 2" rispetto alla dieta "CAA" così pure per il tempo di sfarfallamento (Tabella 3.24).

L'analisi della sex ratio non ha mostrato differenze significative tra le diete ( $F_{2,6}=1,6$ ;  $P>0,05$ ), al contrario, la sex ratio a 24 ore dall'inizio dell'impupamento è risultata differente tra le tre diete ( $F_{2,6}=5,48$ ;  $P<0,001$ ), anche l'analisi della produzione di pupe maschio a 24 ore dall'inizio dell'impupamento ha evidenziato differenze significative ( $F_{2,6}=55,26$ ;  $P<0,001$ ) tra le diete, con una proporzione di maschi maggiore per le diete "IAEA 1" e "IAEA 2" rispetto alla dieta "CAA" suggerendo una separazione migliore tra i due sessi (Tabella 3.24).

**Tab. 3.24** Parametri dello sviluppo di *Ae. albopictus* (media  $\pm$  ES) in funzione di tre diete larvali "CAA", IAEA 1" e "IAEA 2". Lettere diverse (da leggere in riga) indicano differenze significative tra le medie, con  $P<0,05$  (General Linear Model con test di Tukey). <sup>a</sup> M+F (sia maschi che femmine), M (maschi), F (femmine) e M/F (sex ratio).

Parametro	Stadio	Sesso <sup>a</sup>	CAA	IAEA 1	IAEA 2
<b>Tasso di sopravvivenza</b> (in rapporto a L1)	pupa	M+F	0,968 $\pm$ 0,023 <b>a</b>	0,891 $\pm$ 0,033 <b>a</b>	0,926 $\pm$ 0,011 <b>a</b>
	adulto	M+F	0,886 $\pm$ 0,048 <b>a</b>	0,700 $\pm$ 0,002 <b>b</b>	0,809 $\pm$ 0,020 <b>ab</b>
	adulto	M	0,429 $\pm$ 0,032 <b>a</b>	0,377 $\pm$ 0,020 <b>a</b>	0,412 $\pm$ 0,009 <b>a</b>
	adulto	M	0,456 $\pm$ 0,018 <b>a</b>	0,324 $\pm$ 0,018 <b>b</b>	0,397 $\pm$ 0,018 <b>ab</b>
<b>Tempo di sviluppo</b> (giorni da L1)	pupa	M	5,53 $\pm$ 0,09 <b>a</b>	4,89 $\pm$ 0,03 <b>b</b>	4,88 $\pm$ 0,03 <b>b</b>
	pupa	F	6,37 $\pm$ 0,05 <b>a</b>	5,61 $\pm$ 0,03 <b>b</b>	5,70 $\pm$ 0,07 <b>b</b>
	adulto	M	7,55 $\pm$ 0,10 <b>a</b>	6,83 $\pm$ 0,03 <b>b</b>	6,79 $\pm$ 0,01 <b>b</b>
	adulto	F	8,54 $\pm$ 0,06 <b>a</b>	7,69 $\pm$ 0,04 <b>b</b>	7,80 $\pm$ 0,06 <b>b</b>
<b>Sex ratio</b>	adulto	M/F	0,94 $\pm$ 0,08 <b>a</b>	1,18 $\pm$ 0,13 <b>a</b>	1,04 $\pm$ 0,06 <b>a</b>
<b>Tasso di produzione di pupe maschio a 24 h</b>	pupa	M	0,50 $\pm$ 0,06 <b>a</b>	0,91 $\pm$ 0,01 <b>b</b>	0,90 $\pm$ 0,00 <b>b</b>
<b>Sex ratio a 24 h</b>	pupa	M/F	4,72 $\pm$ 0,01 <b>a</b>	2,36 $\pm$ 0,31 <b>b</b>	2,42 $\pm$ 0,10 <b>b</b>

L'analisi della longevità dei maschi adulti alimentati con solo acqua ha evidenziato differenze significative tra le tre diete ( $\chi^2(2)=65,11$ ;  $P<0,001$ ), con una longevità più alta per i maschi allevati con la dieta CAA. La longevità dei maschi con libero accesso a soluzione zuccherina è stata di circa 30 giorni e non è risultata statisticamente diversa tra le tre diete ( $\chi^2(2)=3,17$ ;  $P>0,05$ ) (Tabella 3.25).

L'analisi delle dimensioni del maschio adulto non ha mostrato differenze significative tra le tre diete. I valori medi ( $\pm$  ES) della misura dell'ala sono stati: 2170,86  $\mu\text{m}$  ( $\pm 9,02$ ), 2173,31  $\mu\text{m}$  ( $\pm 13,73$ ) e 2178,65  $\mu\text{m}$  ( $\pm 28,25$ ) rispettivamente per le diete "CAA", "IAEA 1" e "IAEA 2".

La longevità dei maschi adulti, quando messi in gabbia con le femmine, è risultata differente tra le tre diete ( $\chi^2(2)=42.54$ ;  $P<0.001$ ), mentre nessuna differenza significativa si è osservata nella longevità delle femmine ( $\chi^2(2)=5.2$ ;  $P>0.05$ ) (Tabella 3.25).

Anche l'analisi dell'effetto della dieta sulla produzione di uova non ha evidenziato differenze significative ( $F_{2,6}=2,68$ ;  $P>0,05$ ). I valori medi del numero totale di uova prodotte ( $\pm$  ES) sono stati: 3345 ( $\pm 230$ ), 3835 ( $\pm 404$ ) e 4484 ( $\pm 385$ ) rispettivamente per le diete "CAA", "IAEA 1" e "IAEA 2". Nessuna differenza significativa anche per il tasso di fertilità ( $\pm$  ES): 0,80 ( $\pm 0,01$ ), 0,86 ( $\pm 0,03$ ) e 0,88 ( $\pm 0,04$ ) per le diete "CAA", "IAEA 1" e "IAEA 2" rispettivamente ( $F_{2,6}=2,78$ ;  $P>0,05$ ).

**Tab. 3.25** Longevità (in giorni) (media  $\pm$  ES) di adulti in funzione di tre diete larvali "CAA", IAEA 1" e "IAEA 2". Lettere diverse (da leggere in riga) indicano differenze significative tra le medie, con  $P<0,05$  (General Linear Model con test di Tukey). <sup>a</sup> M [M] (maschi in gabbia con altri maschi), M [F] (maschi messi in gabbia con femmine) e F [M] (femmine messe in gabbia con maschi).

Risorsa alimentare	Sesso <sup>a</sup>	CAA		IAEA 1		IAEA 2	
acqua	M [M]	5,17 $\pm$ 0,08	<b>a</b>	4,84 $\pm$ 0,06	<b>b</b>	4,49 $\pm$ 0,07	<b>c</b>
soluzione zuccherina	M [M]	30,17 $\pm$ 1,75	<b>a</b>	31,46 $\pm$ 1,19	<b>a</b>	32,58 $\pm$ 1,22	<b>a</b>
soluzione zuccherina	M [F]	14,31 $\pm$ 0,52	<b>a</b>	10,15 $\pm$ 0,43	<b>b</b>	13,81 $\pm$ 0,58	<b>a</b>
soluzione zuccherina	F [M]	18,92 $\pm$ 0,77	<b>a</b>	17,33 $\pm$ 0,63	<b>a</b>	19,29 $\pm$ 0,63	<b>a</b>

### 3.3 Prove di valutazione di attrezzatura per l'allevamento massale di zanzare

Per tutte le prove, a 24 ore dall'inizio dell'impupamento, sono stati considerati il numero di pupe passate al setacciamento, la percentuale di maschi prodotti (percentuale di pupe maschio presenti tra le pupe passate al setacciamento) e il rendimento di allevamento (numero di pupe passate rispetto alle  $L_1$  utilizzate).

### 3.3.1 Utilizzo di vassoi per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*

Dalle prove preliminari per testare la possibilità di allevamento larvale di *Ae. albopictus* in vassoi di grandi dimensioni realizzati per l'allevamento massale di *An. arabiensis* (Balestrino et al. 2012) è emerso che l'utilizzo di vassoi sovrapposti minimizza l'evaporazione dell'acqua e riduce l'aggregazione delle larve, osservata, invece, in vassoi esposti direttamente alla luce.

#### 3.3.1.1 Effetto della densità larvale

L'analisi del numero di pupe passate a 24 ore dall'inizio dell'impupamento (N PP) ha evidenziato differenze significative tra le varie densità larvali ( $F_{2,18}=4,54$ ;  $P<0,05$ ) come mostrato in Tabella 3.26.

La percentuale di maschi presenti tra le pupe passate (%M PP), invece, non ha mostrato differenze significative in funzione della densità larvale ( $F_{2,18}=0,52$ ;  $P>0,05$ ), così come il rendimento (N PP/N L1) ( $F_{2,18}=2,17$ ;  $P>0,05$ ) (Tabella 3.26).

**Tab. 3.26** Numero di pupe passate (N PP), percentuale di maschi passati (%M PP) e rendimento di allevamento (N PP/N L1) a 24 ore dall'inizio impupamento a diverse densità larvali. Lettere diverse (da leggere in colonna) indicano differenze significative tra le medie, con  $P<0,05$  (General Linear Model con test di Tukey).

L/ML	N		24 h					
			N PP	%M PP	N PP / N L1			
2	4	Media	2134	ab	96,940	a	0,1778	a
		DS	480		2,150		0,0400	
		ES	240		1,080		0,0200	
3	13	Media	2284	a	96,755	a	0,1269	a
		DS	622		1,090		0,0346	
		ES	173		0,302		0,0096	
4	4	Media	4529	b	93,610	a	0,1887	a
		DS	3063		8,630		0,1276	
		ES	1532		4,310		0,0638	

Come era prevedibile, le uniche differenze in funzione delle diverse densità larvali si sono osservate per il numero di pupe passate e non passate. Le densità 2 e 3 larve/ml hanno dato risultati simili mentre la densità 4 larve/ml ha dato risultati migliori ma affetti da estrema variabilità.

Nessuna delle densità larvali testate ha mostrato risultati soddisfacenti in termini di percentuale di maschi passati al setacciamento a 24 ore dall'impupamento, in generale piuttosto alta per tutte le densità: 96,94% di maschi passati per la densità 2 larve/ml, 96,76% per 3 larve/ml e 93,61% per 4 larve/ml. Una percentuale dell'1% di femmine tra le pupe passate è il valore massimo considerato accettabile per rilasci di maschi sterili di zanzara in aree in cui la circolazione di arbovirus endemici sia assente, mentre questo valore deve essere nullo in aree con eventi epidemici e endemici ricorrenti (Benedict e Robinson 2003).

### 3.3.1.2 Effetto dell'integrazione di lievito di birra nella dieta larvale

Per la prima prova, l'analisi effettuata in funzione delle due diverse densità larvali, scelte per la minore variabilità rispetto alla densità 4 larve/ml, ha evidenziato differenze significative per il numero di pupe passate e per il rendimento di allevamento (rispettivamente  $F_{1,8}=29,93$ ;  $P<0,05$  e  $F_{1,8}=5,66$ ;  $P<0,05$ ), mentre non ha evidenziato differenze significative per il numero di maschi passati al setacciamento ( $F_{1,8}=0,59$ ;  $P>0,05$ ) (Tabella 3.27).

**Tab. 3.27** Numero di pupe passate (N PP), percentuale di maschi passati (%M PP) e rendimento di allevamento (N PP/N L1) a 24 ore dall'inizio impupamento in funzione di due densità larvali. Lettere diverse (da leggere in colonna) indicano differenze significative tra le medie, con  $P<0,05$  (General Linear Model con test di Tukey).

L/ML	N	24 h						
			N PP		%M PP		N PP / N L1	
2	5	Media	1440	a	99,176	a	0,1200	a
		DS	358		0,768		0,0298	
		ES	160		0,343		0,0133	
3	5	Media	2960	b	98,707	a	0,1644	b
		DS	508		0,887		0,0282	
		ES	227		0,397		0,0126	

Per la seconda prova, effettuata scegliendo la densità larvale che ha mostrato migliori risultati nella prova precedente (3 larve/ml), l'analisi del numero di pupe passate e del rendimento di allevamento non ha mostrato differenze significative in funzione della dieta (rispettivamente  $F_{1,14}=1,61$ ;  $P>0,05$  e  $F_{1,14}=1,6$ ;  $P>0,05$ ). La

percentuale di maschi passati, invece, ha mostrato una differenza significativa tra le diete utilizzate ( $F_{1,14}=15,81$ ;  $P<0,05$ ) (Tabella 3.28).

**Tab. 3.28** Numero di pupe passate (N PP), percentuale di maschi passati (%M PP) e rendimento di allevamento (N PP/N L1) a 24 ore dall'inizio impupamento in funzione di due diete larvali. Lettere diverse (da leggere in colonna) indicano differenze significative tra le medie, con  $P<0,05$  (General Linear Model con test di Tukey).

Dieta	N	24 h						
			N PP		%M PP		N PP / N L1	
IAEA	13	Media	2284	a	96,755	a	0,1269	a
		DS	622		1,090		0,0346	
		ES	173		0,302		0,0096	
IAEA_BY	3	Media	1800	a	99,033	b	0,1000	a
		DS	400		0,379		0,0220	
		ES	231		0,219		0,0127	

L'integrazione del lievito di birra nella dieta "IAEA 1" ha prodotto ottimi risultati in termini di selettività del metodo di separazione dei sessi, anche se il numero di pupe passate e la produzione di pupe a 24 ore dall'impupamento è risultata leggermente inferiore, ma non statisticamente differente. Questo fa supporre che l'integrazione di carboidrati faccia aumentare il divario di dimensioni esistente tra maschi e femmine, migliorando la separazione dei sessi. Ulteriori prove saranno necessarie per indagare l'origine di tale differenza attraverso l'analisi dimensionale dei maschi e delle femmine mediante confronto della misura dell'ala.

### 3.3.1.3 Effetto della temperatura

La temperatura dell'acqua all'interno dei vassoi è risultata, in media, sempre inferiore di 2°C rispetto alla temperatura dell'aria nella cella climatizzata.

A 25,5°C e 26,5°C, l'impupamento delle larve di *Ae. albopictus* è avvenuto un giorno dopo rispetto alle temperature più elevate, ovvero al sesto giorno dalla messa in acqua delle larve di I età, invece che al quinto.

Come mostrato in Tabella 3.29, il numero di pupe passate ( $F_{3,34}=5,93$ ;  $P<0,05$ ), la percentuale di maschi passati ( $F_{3,34}=4,16$ ;  $P<0,05$ ) e il rendimento ( $F_{3,34}=4,34$ ;  $P<0,05$ ) hanno mostrato differenze significative in funzione della temperatura di allevamento impiegata.

**Tab. 3.29** Numero di pupe passate (N PP), percentuale di maschi passati (%M PP) e rendimento di allevamento (N PP/N L1) a 24 ore dall'inizio impupamento in funzione di diverse temperature dell'acqua. Lettere diverse (da leggere in colonna) indicano differenze significative tra le medie, con  $P < 0,05$  (General Linear Model con test di Tukey).

T°C	N	24 h						
			N PP		%M PP		N PP / N L1	
25,5	5	Media	3225	a	97,664	ab	0,1791	a
		DS	1195		1,226		0,0664	
		ES	534		0,548		0,0297	
26,5	5	Media	3000	a	96,496	a	0,1667	ab
		DS	510		1,970		0,0283	
		ES	228		0,881		0,0127	
28,5	20	Media	1970	b	98,751	b	0,1194	b
		DS	745		1,267		0,0389	
		ES	167		0,283		0,0087	
29	8	Media	2050	b	98,125	ab	0,1139	ab
		DS	306		0,902		0,0170	
		ES	108		0,319		0,0060	

E' interessante notare come alle più basse temperature (25,5 e 26,5°C) si abbia un rendimento maggiore rispetto alle temperature più alte, probabilmente dovuto al prolungamento dei tempi di sviluppo larvale. Tali condizioni, tuttavia, hanno anche portato ad una diminuzione della percentuale di maschi passati e di conseguenza ad un aumento inaccettabile della percentuale di femmine passate durante il setacciamento. E' stato quindi deciso di continuare le prove abbandonando le due temperature più basse. La possibilità di condurre allevamenti massali in tempi ridotti costituisce un fattore di risparmio e ottimizzazione degli spazi di produzione.

### 3.3.2 Utilizzo del carrello per allevamento massale di *Ae. albopictus*

#### 3.3.2.1 Confronto tra vassoi isolati e carrello

Il numero di pupe passate ( $F_{1,29}=0,02$ ;  $P > 0,05$ ), il rendimento ( $F_{1,29}=0,29$ ;  $P > 0,05$ ) e la percentuale di maschi passati ( $F_{1,29}=2,07$ ;  $P > 0,05$ ) non hanno mostrato differenze significative in funzione del metodo di allevamento impiegato (Tabella 3.30). I risultati ottenuti, quindi, sono positivi per un futuro, possibile impiego del carrello anche per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*.

**Tab. 3.30** Numero di pupe passate (N PP), percentuale di maschi passati (%M PP) e rendimento di allevamento (N PP/N L1) a 24 ore dall'inizio impupamento in funzione di due metodi di allevamento (vassoio isolato e carrello). Lettere diverse (da leggere in colonna) indicano differenze significative tra le medie, con  $P < 0,05$  (General Linear Model con test di Tukey).

Metodo	N		24 h					
			N PP	%M PP	N PP / N L1			
Vassoio isolato	28	Media	1993	a	98,572	a	0,1179	a
		DS	645		1,193		0,0339	
		ES	122		0,225		0,0064	
Carrello (10 vassoi)	3	Media	1930	a	97,522	a	0,1072	a
		DS	780		0,576		0,0433	
		ES	450		0,332		0,0250	

Si è tuttavia osservato, rispetto all'allevamento nei vassoi isolati, un lieve peggioramento del valore medio della percentuale di pupe maschio passate provenienti dall'allevamento nel carrello (Tabella 3.30). Per questo motivo si è deciso di valutare il funzionamento del carrello a temperature dell'acqua inferiori a 29°C, ipotizzando che l'elevata temperatura abbia determinato un'eccessiva velocità di sviluppo delle pupe rendendo meno sfruttabile la naturale precocità di impupamento dei maschi osservabile in questa specie (proterandria).

### 3.3.2.2 Effetto della temperatura

L'analisi del numero di pupe passate in funzione della temperatura non ha mostrato differenze significative ( $F_{1,7}=0,71$ ;  $P > 0,05$ ), mentre si sono registrate differenze significative per quanto riguarda la percentuale di maschi passati ( $F_{1,7}=25,89$ ;  $P < 0,05$ ). Nessuna differenza significativa è stata osservata per il rendimento ( $F_{1,7}=0,90$ ;  $P > 0,05$ ) (Tabella 3.31).

I risultati ottenuti hanno confermato che la temperatura di 29°C in vassoi posizionati nel carrello è troppo elevata per una efficace separazione dei sessi attraverso setacciamento meccanico. Diminuendo la temperatura di 1°C si è ottenuta una buona separazione dei sessi, con una percentuale residua di femmine pari a circa 1%, e un migliore rendimento (seppure non significativo) (Tabella 3.31).



**Tab. 3.31** Numero di pupe passate (N PP), percentuale di maschi passati (%M PP) e rendimento di allevamento (N PP/N L1) a 24 ore dall'inizio impupamento in funzione di due temperature. Lettere diverse (da leggere in colonna) indicano differenze significative tra le medie, con  $P < 0,05$  (General Linear Model con test di Tukey).

T°C	N	24 h						
		N PP	%M PP	N PP / N L1				
28	6	Media	2252	a	98,973	a	0,1251	a
		DS	406		0,299		0,0225	
		ES	166		0,122		0,0092	
29	3	Media	1930	a	97,522	b	0,1072	a
		DS	780		0,576		0,0433	
		ES	450		0,332		0,0250	

### 3.4 Prove di integrazione di carboidrati nella dieta larvale di *Ae. albopictus*: dati preliminari

Osservazioni preliminari hanno evidenziato una rilevante mortalità larvale nella dieta contenente amido probabilmente per un'eccessiva formazione di patina sulla superficie dell'acqua di allevamento. Gli adulti ottenuti con questa dieta mostrano, tuttavia, una migliore sopravvivenza e attività di accoppiamento. Anche nelle capacità di volo, i maschi analizzati sembrano mostrare migliori performance fuoriuscendo con maggiore frequenza dai tubi di altezza massima.

#### 4. CONSIDERAZIONI FINALI

Le diverse diete larvali, messe a confronto nelle prove condotte al fine di individuare quella migliore per l'allevamento di *Ae. albopictus*, sono state ideate secondo diversi approcci. La dieta "CAA" rappresenta l'evoluzione di una classica dieta di laboratorio per le zanzare che, in fasi successive, è stata arricchita di componenti nutrizionali. Lo scopo principale era quello di fornire agli individui negli stadi immaturi una vasta gamma di sostanze nutritive per ottimizzare la composizione della dieta. Inizialmente la dieta "CAA" era composta semplicemente da croccantini per gatto (Friskies®), finemente tritati, in seguito, al fine di aumentare la sopravvivenza dei primi stadi larvali e la produttività di pupe, nuovi elementi, come lievito di birra e cibo secco per pesci (Tetramin®), sono stati introdotti (Bellini et al. 2007). Al contrario, le diete "IAEA" sono state appositamente ideate per essere utilizzate in allevamenti massali, con lo scopo di fornire sostanze nutritive adeguate sia per ottimizzare l'allevamento che la qualità degli insetti adulti prodotti, impiegando ingredienti che fossero al tempo stesso economici, disponibili a livello globale e di qualità costante (Parker 2005, Benedict et al. 2009).

La prima versione della dieta IAEA (dieta "IAEA 1"), sviluppata presso i laboratori dell'Unità "Insect Pest Control" dell'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica a Vienna, è stata in seguito rivista (dieta "IAEA 2") per ridurre i costi e ampliare lo spettro nutrizionale attraverso l'introduzione di lievito di birra e di farina di calamaro e il dimezzamento della quantità di fegato bovino essiccato (Damiens et al. 2012).

L'ottimizzazione della produzione massale di *Ae. albopictus* richiede lo sviluppo di un modulo di allevamento che porti ad avere un'alta sopravvivenza larvale, uno sviluppo veloce e omogeneo, omogeneità di dimensione all'interno della popolazione, sincronia di impupamento e che produca adulti di alta qualità in termini di longevità, capacità di volo, capacità di accoppiamento, fecondità e fertilità (Bellini et al. 2007, Medici et al. 2011).

Il tempo di impupamento e sfarfallamento delle larve alimentate con diete "IAEA 1" e "IAEA 2" è stato minore rispetto a quello di larve nutrite con la dieta "CAA". Si potrebbe ipotizzare che le larve allevate con le due diete "IAEA" abbiano raggiunto il loro valore di peso critico prima di quelle allevate con la dieta "CAA" a causa della composizione della dieta stessa. Come riportato da Chambers e

Klowden (1990), infatti, le riserve nutrizionali svolgono un ruolo regolatore nella fase di sviluppo degli insetti influenzando la capacità di impupamento delle larve. Un minor tempo di impupamento significa anche minor tempo di allevamento per ottenere i maschi da rilasciare in campo e quindi una riduzione dei costi operativi.

Solo nelle femmine è stata osservata una differenza del tasso di sopravvivenza fino allo stadio di pupa e di adulto tra i diversi trattamenti, mentre la stessa proporzione di maschi allevati sulle varie diete è sopravvissuta fino allo stadio adulto. Nella dieta "IAEA 1" ci potrebbe essere una carenza di nutrienti che potrebbe essere negativa per lo sviluppo delle femmine, ma non per quello dei maschi. In *Ae. aegypti* si è visto, per esempio, che l'accumulo sia di carboidrati sia di lipidi durante gli stadi immaturi è dipendente dal sesso (Chambers e Klowden 1990). Questo presunto deficit nutrizionale sembra essere ridotto nella dieta "IAEA 2", suggerendo che i componenti aggiunti in questa dieta possano in parte compensare tale carenza. Considerando la somiglianza, in termini di composizione proteica, tra la farina di calamaro e il fegato bovino essiccato, è probabile che il lievito di birra sia l'ingrediente responsabile della migliore efficacia di questa dieta.

Al momento dello sfarfallamento, le zanzare hanno riserve di carboidrati (glicogeno) e lipidi (trigliceridi), accumulati nella fase larvale, che sono utilizzati per la sopravvivenza degli adulti (Nayar 1968, Van Handel 1965) e per il volo (Clements 1955, Nayar e Van Handel 1971). L'analisi degli ingredienti presenti nella dieta ha rivelato che la farina di calamaro, la farina di tonno e il fegato bovino essiccato sono ricchi di proteine, vitamine e acidi grassi (Damiens et al 2012), mentre tra i componenti principali presenti nel lievito di birra ci sono anche carboidrati (Nestel e Nemny-Lavy 2008). La dieta "CAA", oltre il lievito di birra, contiene diverse altre fonti di carboidrati (in base all'etichetta di produzione, sia i croccantini per gatto che il cibo per pesci contengono cereali, lieviti e zuccheri in quantitativi non specificati) che potrebbero fornire adeguate riserve di glicogeno per la produzione di maschi adulti competitivi da rilasciare in campo.

La produzione di pupe maschio (percentuale di maschi impupati nelle prime 24 ore dall'inizio dell'impupamento) è risultata maggiore nei trattamenti con le due diete "IAEA" rispetto a quelli con la dieta "CAA". La sex ratio con la dieta "CAA", a 24 ore dalla comparsa della prima pupa, è risultata sbilanciata a favore dei maschi rispetto alla sex ratio delle diete "IAEA" in cui sono state prodotte più pupe femmine. Ulteriori studi sulla dimensione delle pupe saranno necessari per determinare se il

numero maggiore di femmine prodotte alimentando le larve con le diete "IAEA" possa influenzare il numero di femmine accidentalmente raccolte (e quindi potenzialmente rilasciate) insieme ai maschi durante la separazione meccanica dei sessi, basata sul dimegetismo sessuale.

Nell'allevamento massale di zanzare *Aedes* è molto importante ottenere un impupamento sincrono o comunque il più concentrato possibile nel tempo (coetaneo), al fine di massimizzare l'efficienza del procedimento di separazione meccanica dei sessi, che avviene 24 ore dall'inizio dell'impupamento. La raccolta di circa il 90% della produzione totale di pupe maschio nelle prime 24 ore dall'impupamento, osservata alimentando le larve con le diete "IAEA", implica un grande risparmio in termini di costi nella produzione massale. Una buona sincronizzazione dell'impupamento permette anche una più accurata determinazione dell'età delle pupe al fine di minimizzare gli effetti negativi delle procedure di irraggiamento (Balestrino et al. 2011). Ulteriori indagini potrebbero essere fatte anche per ricercare un componente della dieta in grado di incrementare la naturale proterandria di questa specie.

Per quanto riguarda la valutazione dei parametri effettuata sugli adulti allevati con le diverse diete larvali, si è osservato che la longevità dei maschi è risultata significativamente inferiore negli adulti allevati con le diete "IAEA" rispetto a quelli allevati con la dieta "CAA" solo quando i maschi non avevano accesso a soluzione zuccherina e dovevano quindi sfruttare esclusivamente le riserve energetiche accumulate durante la fase larvale. La maggiore longevità dei maschi allevati con la dieta "CAA" potrebbe essere dovuta al prolungato fagoperiodo (circa 20-24 ore in più). Come riportato da Briegel e Timmermann (2001), infatti, più lungo è il periodo di alimentazione larvale, maggiori sono le riserve che possono essere sintetizzate, tali riserve portano ad un accumulo esponenziale di lipidi nei maschi appena sfarfallati i quali, insieme al glicogeno, sono necessari per la sopravvivenza dei maschi stessi. In *Ae. aegypti* Van Handel (1988) ha osservato che l'assimilazione di carboidrati raggiunge i suoi livelli massimi alla fine della IV età, poco prima dell'impupamento, rafforzando l'ipotesi che un prolungato periodo larvale può portare a un aumento del livello di riserve di glicogeno.

Questi risultati suggeriscono una carenza di carboidrati nelle diete "IAEA" che, tuttavia, può essere compensata da un apporto di zucchero nella fase adulta. A differenza degli adulti ottenuti da larve nutrite con dieta "IAEA 2" e "CAA", i maschi

allevati con dieta "IAEA 1" e nutriti con soluzione zuccherina da adulti hanno subito un aumento della mortalità quando messi in gabbia con le femmine. Questo sembra indicare che la somministrazione di soluzione zuccherina non è stata sufficiente, o comunque adeguata, a sostenere il fabbisogno metabolico di energia per le funzioni superiori al metabolismo basale e che il lievito di birra nella dieta aumenta le riserve metaboliche per supportare tali funzioni. Van Handel (1988) ha osservato che gli adulti sfarfallati da pupe caratterizzate da basse riserve di glicogeno sono costretti a doversi alimentare prima di quelli che, nelle fasi immature, hanno accumulato un livello adeguato di carboidrati. Ulteriori ricerche saranno necessarie per testare l'effetto di diete larvali arricchite con carboidrati sui parametri relativi alla fitness del maschio adulto. E' stato anche valutato l'effetto della somministrazione di soluzione zuccherina ai maschi appena sfarfallati dopo il rilascio in campo ed è risultato avere un grande impatto, in particolare in condizioni climatiche estreme (R. Bellini, dati non pubblicati).

La dieta ottimale per allevamenti massali dovrebbe essere poco costosa e di qualità e composizione altamente standardizzate. Anche se, per alcune specie di zanzara, diete costituite da componenti naturali come materiale organico e erba tagliata sono più efficienti per l'allevamento delle larve rispetto a quelle costituite da componenti artificiali, i primi hanno lo svantaggio di non essere pratici per l'allevamento massale, inoltre la loro acquisizione e la somministrazione sono più difficili in caso di mantenimento di colonie numerose, sono meno omogenei e una quantità enorme di materiale deve essere processata (Sy e Campos 2008).

Il costo approssimativo, per kg, delle diete esaminate (dati di dicembre 2012) è: 24,6 Euro per "IAEA 1", 13,8 Euro per "IAEA 2" e 25,4 Euro per la dieta "CAA". Considerando tali costi e il fatto che nessuna differenza è stata osservata nella dimensione dei maschi e nella fecondità e fertilità degli adulti allevati con le diverse diete, si può affermare che la dieta integrata con lievito di birra, "IAEA 2", è preferibile rispetto alla dieta "CAA" per l'allevamento massale di *Ae. albopictus*, anche se ulteriori indagini saranno necessarie per trovare un integratore della dieta che compensi la carenza di carboidrati, sia in termini di qualità che di quantità.

Dalle prove effettuate per valutare la possibilità di allevare *Ae. albopictus* in vassoi di grandi dimensioni, eseguite utilizzando la prima versione della dieta IAEA, "IAEA 1", è emerso che le densità 2 e 3 larve/ml hanno dato risultati simili mentre la densità 4 larve/ml ha dato risultati migliori ma estremamente variabili, indicando che

a quella densità compaiono effetti negativi legati al sovraffollamento. Nessuna delle densità larvali testate ha mostrato risultati soddisfacenti in termini di percentuale di maschi passati al setacciamento a 24 ore dall'impupamento, in generale piuttosto bassa per tutte le densità: 96,94% di maschi passati per la densità 2 larve/ml, 96,76% per 3 larve/ml e 93,61% per 4 larve/ml. Una percentuale dell'1% di femmine tra le pupe passate è il valore massimo considerato accettabile per rilasci di maschi sterili di zanzara in aree in cui la circolazione di arbovirus endemici sia assente, mentre questo valore deve essere nullo in aree con eventi epidemici o endemiche (Benedict e Robinson 2003).

L'integrazione del lievito di birra nella dieta "IAEA 1" ha prodotto significativi miglioramenti in termini di selettività del metodo di separazione dei sessi, anche se il numero di pupe passate e la produzione di pupe a 24 ore dall'impupamento è risultata leggermente inferiore, ma non statisticamente differente. Questo fa supporre che l'integrazione di carboidrati faccia aumentare il divario di dimensioni esistente tra maschi e femmine, migliorando la separazione dei sessi. Ulteriori prove saranno necessarie per indagare l'origine di tale differenza attraverso l'analisi dimensionale dei maschi e delle femmine mediante confronto della misura dell'ala.

Testando diverse temperature d'allevamento è interessante notare come alle più basse temperature (25,5°C e 26,5°C) si sia ottenuto un rendimento maggiore rispetto alle temperature più alte, probabilmente dovuto al prolungamento dei tempi di sviluppo larvale. Tali condizioni, tuttavia, hanno anche portato ad un aumento inaccettabile della percentuale di femmine passate durante il setacciamento. Come già detto, la possibilità di condurre allevamenti massali in tempi ridotti significa un grande risparmio nella produzione di maschi prodotti attraverso un più efficiente impiego di vassoi, carrelli e dieta.

I risultati ottenuti dalle prove per valutare l'allevamento massale di *Ae. albopictus* nel carrello, ideato per l'allevamento di *An. arabiensis* (Balestrino et al. 2012), sono positivi per un suo futuro, possibile impiego anche per *Ae. albopictus*. Si è tuttavia osservato, rispetto all'allevamento nei vassoi isolati, un lieve peggioramento del valore medio della percentuale di pupe maschio passate. Per questo motivo si è deciso di valutare il funzionamento del carrello a temperature dell'acqua inferiori a 29°C, ipotizzando che l'elevata temperatura abbia determinato un'eccessiva velocità di sviluppo delle pupe rendendo meno sfruttabile la naturale precocità di impupamento dei maschi osservabile in questa specie (proterandria).

I risultati ottenuti hanno confermato che la temperatura di 29°C in vassoi posizionati all'interno del carrello è troppo elevata per un'efficace separazione dei sessi attraverso setacciamento meccanico. Diminuendo la temperatura di 1°C si è ottenuta una migliore separazione dei sessi, con una percentuale residua di femmine pari a circa 1%, e un migliore rendimento (seppure non significativo). Si è potuto così definire un protocollo di allevamento massale di *Ae. albopictus* con parametri standardizzati di densità larvale, dose di dieta, temperatura dell'acqua di allevamento, percentuale di maschi passati al setacciamento e rendimento di allevamento.

Osservazioni preliminari riguardanti le prove di integrazione di carboidrati nella dieta larvale di *Ae. albopictus* hanno evidenziato una rilevante mortalità larvale nel caso di dieta contenente amido probabilmente per un'eccessiva formazione di patina sulla superficie dell'acqua di allevamento. Gli adulti ottenuti con questa dieta hanno mostrato, tuttavia, una migliore sopravvivenza e attività di accoppiamento. Anche nelle capacità di volo, i maschi analizzati sembrano mostrare migliori capacità fuoriuscendo con maggiore frequenza dai tubi di altezza massima.

Prove future saranno necessarie per testare altri componenti ricchi in carboidrati, quali saccarosio, da integrare nella dieta larvale per migliorare le qualità degli adulti ottenuti senza provocare effetti negativi sui parametri dello sviluppo larvale. Risulta pertanto opportuno continuare la ricerca per l'ottimizzazione della dieta larvale in quanto fattore fondamentale per ottenere maschi di elevata qualità. Esistono al riguardo ampi spazi di miglioramento.

## 5. BIBLIOGRAFIA

**Alley, D. A., B. G. Hightower. 1966.** Mating behavior of the screw-worm fly as affected by differences in strain and size. *J. Econ. Entomol.* 59:1499-1502.

**Alphey, L., M. Benedict, R. Bellini, G. G. Clark, D. A. Dame, M. W. Service, S. L. Dobson. 2010.** Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10:295-311.

**Amazigo, U., B. Boatin. 2006.** The future of onchocerciasis control in Africa. *Lancet* 368:1946-1947.

**Balestrino, F., A. Medici, G. Candini, M. Carrieri, B. Maccagnani, M. Calvitti, S. Maini, and R. Bellini. 2010.**  $\gamma$  ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. *J. Med. Entomol.* 47:58-591.

**Balestrino, F., M. Q. Benedict, J. R. L. Gilles. 2012.** A new larval tray and rack system for improved mosquito mass rearing. *J. Med. Entomol.* 49:595-605.

**Bartlett, A. C. 1994.** Maintaining genetic diversity in laboratory colonies of parasites and predators, pp. 133-145. In S. K. Narang, A. C. Bartlett, and R. M. Faust eds., *Applications of genetics to arthropods of biological control significance*. CRC, Boca Raton, FL.

**Bellini, R., M. Calvitti, A. Medici, M. Carrieri, G. Celli, S. Maini. 2007.** Use of the sterile insect technique against *Aedes albopictus* in Italy: first results of a pilot trial, pp. 505–515. In M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson and J. Hendrichs (eds.), *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

**Bellini, R., A. Albieri, F. Balestrino, M. Carrieri, D. Porretta, S. Urbanelli, M. Calvitti, R. Moretti, S. Maini. 2010.** Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) males in Italian urban areas and significance for sterile insect technique application. *J. Med. Entomol.* 47:1082-1091.



**Benedict, M., A. Robinson. 2003.** The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol.* 19:349-355.

**Benedict, M. Q., R. S. Levine, W. A. Hawley, L. P. Lounibos. 2007.** Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoonot.* 7:76-85.

**Benedict, M. Q., B. G. J. Knols, H. C. Bossin, P. I. Howell, E. Mialhe, C. Caceres, A. S. Robinson. 2009.** Colonisation and mass rearing: learning from others. *Malar. J.* 8(Suppl. 2):S4.

**Briegel, H., S. E. Timmermann. 2001.** *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): physiological aspects of development and reproduction. *J. Med. Entomol.* 38:566-571.

**Calzolari, M., P. Bonilauri, R. Bellini, A. Albieri, F. De Filippo, G. Maioli, G. Galletti, A. Gelati, I. Barbieri, M. Tamba, D. Lelli, E. Carra, P. Cordioli, P. Angelini, M. Dottori. 2010.** Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2009. *PLoS ONE* 5:e14324.

**Cancrini, G., A. Frangipane di Regalbono, I. Ricci, C. Tessarin, S. Gabrielli, M. Pietrobelli. 2003.** *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet. Parasit.* 118:195-202.

**Carrieri, M., R. Colonna, G. Gentile, R. Bellini. 2006.** Lotta alla Zanzara Tigre: strategie a confronto. *Igiene Alimenti-Disinfestazione & Igiene Ambientale* 23:45-50.

**Chambers, G. M., M. J. Klowden. 1990.** Correlation of nutritional reserves with a critical weight for pupation in larval *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6:394-9.

**Charlwood, J. D., J. Pinto, C. A. Sousa, C. Ferreira, V. E. Do Rosario. 2002.** Male size does not affect mating success (of *Anopheles gambiae* in Sao Tome). Med. Vet. Entomol. 16:109-111.

**Cirio, U. 1975.** The Procida Medfly pilot experiment. Status of The Medfly control after two years of the Sterile Insect release. IAEA, Panel Proc. Series, STI/PUB/392, pp 39-49.

**Cirio, U. 1977.** Control of Mediterranean Fruit fly (Diptera Tephritidae) by Sterile Insect Technique. Bollettino del Laboratorio Entomologico Agrario di Portici. 32:180-189.

**Cirio, U., M. Capparella, A. P. Economopoulos. 1987.** Control of medfly (*Ceratitis capitata* Wied.) by releasing a mass-reared genetic sexing strain. In: Economopoulos, A. P. (ed.) Fruit Flies. Elsevier, Amsterdam, pp. 515-522.

**Clements, A. N. 1955.** The sources of energy for flight in mosquitoes. J. Exp. Biol. 32:547-554.

**Cohen, A. C. 1990.** Fatty acid distribution as related to adult age, sex and diet in the phytophagous heteropteran, *Lygus hesperus*. J. Entomol. Sci. 25:75-84.

**Cohen, A. C., R. T. Staten. 1994.** Long-term culturing and quality assessment of predatory big-eyed bugs, *Geocoris punctipes*, pp. 122-132. In S. K. Narang, A. C. Bartlett, and R. M. Faust eds., Applications of genetics to arthropods of biological control significance. CRC, Boca Raton, FL.

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

**Cohen, A. C. 2003.** Insect diets: science and technology. CRC Press, Boca Raton, FL.

**Coleman, P. G., L. Alphey. 2004.** Genetic control of vector populations: an imminent prospect. *Trop. Med. Int. Health* 9:433-437.

**Dadd, R. H., J. E. Kleinjan. 1976.** Chemically defined dietary media for larvae of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): effects of colloid texturizers. *J. Med. Entomol.* 13:285-291.

**Dadd, R. H., J. E. Kleinjan, V. P. Sneller. 1977.** Development of several species of mosquito larvae in fully defined dietary media: preliminary evaluation. *Mosq. News* 37:699-703.

**Dadd, R. H., J. E. Kleinjan. 1978.** An essential nutrient for the mosquito *Culex pipiens* associated with certain animal derived phospholipids. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 71:794-800.

**Dadd, R. H., J. E. Kleinjan, S. M. Asman. 1988.** Eicosapentaenoic acid in mosquito tissues: differences between wild and laboratory reared adults. *Environ. Entomol.* 17:172-180.

**Damiens, D., M. Q. Benedict, M. Wille, J. R. L. Gilles. 2012.** An inexpensive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): eat like a horse, a bird, or a fish? *J. Med. Entomol.* 49:1001-1011.

**Dame, D. A., R. E. Lowe, D. L. Williamson. 1981.** Assessment of released sterile *Anopheles albimanus* and *Glossina morsitans morsitans*. In *Cytogenetics and genetic of vectors: proceedings of symposium of the XVI International Congress of Entomology*, pp. 231-248.

**Dindo, M. L., S. Grenier, L. Sighinolfi, P. Baronio. 2006.** Biological and biochemical differences between *in vitro*- and *in vivo*-reared *Exorista larvarum*. *Ent. Exp. et Appl.* 120, 167-174.

**Dindo, M. L., S. Grenier. (in corso di stampa).** Production of Dipteran Parasitoids. In: J. Morales-Ramos, G. Rojas & D. Shapiro-Ilan (Eds.): Mass Production of Beneficial Organisms, Elsevier Publishing.

**Dowell, R. V., I. A. Siddiqui, F. Meyer, E. L. Spaugy. 2000.** Mediterranean fruit fly preventative release programme in southern California. Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests, pp. 369-375, Penerbit Universiti, Sains Malaysia.

**Dyck, V. A., J. Hendrichs, A. S. Robinson, eds. 2005.** Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

**Editorial. 1975.** Oh, New Delhi; oh, Geneva. Nature 256:355-357.

**Egger, J. R., E. E. Ooi, D. W. Kelly, M. E. Woolhouse, C. R. Davies, P. G. Coleman. 2008.** Reconstructing historical changes in the force of infection of dengue fever in Singapore: implications for surveillance and control. Bull. WHO 86:187-196.

**Enkerlin, W., A. Bakri, C. Caceres, J. P. Cayol, A. Dyck, U. Feldmann, G. Franz, A. Parker, A. Robinson, M. Vreysen, J. Hendrichs. 2003.** Insect pest intervention using the sterile insect technique: Current status on research and on operational programs in the world. In recent trends on sterile insect technique and area-wide integrated pest management – Economic feasibility, control projects, farmer organization and *Bactrocera dorsalis* complex control study – Research Institute for Subtropics, Naha, Japan, 11-24.

**Enkerlin, W. 2003.** Economics of area-wide SIT control programs. In recent trends on sterile insect technique and area-wide integrated pest management – Economic feasibility, control projects, farmer organization and *Bactrocera dorsalis* complex control study – Research Institute for Subtropics, Naha, Japan, 1-10.

**FAO IAEA USDA. 2003.** Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies Vienna: IAEA.

**Gratz, N. G. 2004.** Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med. Vet. Entomol. 18: 215-227.

**Grenier, S. 2012.** Artificial rearing of entomophagous insects, with emphasis on nutrition and parasitoids – General outlines from personal experience. Karaelmas Science and Engineering Journal 2:1-12.

**Hawley, W. A. 1988.** The biology of *Aedes albopictus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 4:1-40.

**Hendrichs, J., A. S. Robinson. 2009.** Sterile insect technique, pp. 953-957. In V. H. Resh and R. T. Cardé (eds.), Encyclopedia of insects, 2nd ed. Academic Press, Burlington, MA.

**Huho, B. J., K. R. Ng'habi, G. F. Killeen, G. Nkwengulila, B. G. J. Knols, H. M. Ferguson. 2007.** Nature beats nurture: a case study of the physiological fitness of free-living and laboratory-reared male *Anopheles gambiae* s.l. J. Exp. Biol. 210:2939-2947.

**Jayaraman, K. S. 1982.** Foreign labs shut. Nature 11:104-105.

**Keng-Hong, T. 2000.** Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Penerbit Universiti, Sains Malaysia.

**Knipling, E. 1955.** Possibilities of insect control or eradication through use of sexually sterile males. J. Econ. Entomol. 48:459-462.

**Knipling, E. 1979.** Agriculture Handbook No. 512: The basic principles of insect population suppression and management. Washington, DC: USDA.

**Knipling, E. 1998.** Role of parasitoid augmentation and sterile insect techniques for area-wide management of agricultural insect pests. J. Agric. Entomol. 15:273-301.

**Kouri, G., M. Guzman, J. Bravo. 1986.** Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. Bull. Pan. Am. Health Org. 20:24-30.

**Krafsur, E. S. 1998.** Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect populations: 55 years and counting. *J. Agric. Entomol.* 15:303-317.

**Laven, H. 1967.** Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* 216:383-384.

**Laven, H., J. Cousserans, G. Guille. 1971.** Experience de lutte genetique contre *Culex pipiens* dans la région de Montpellier. *Bull. Biologique* 105:358-367.

**Lindquist, D. A., M. Abusowa, M. J. Hall. 1992.** The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol.* 6:2-8.

**Lofgren, C. S., D. A. Dame, S. G. Breeland, D. E. Weidhaas, G. M. Jeffery, R. Kaiser, H. R. Ford, M. D. Boston, K. F. Baldwin. 1974.** Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador III. Field methods and population control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23:288-297.

**Medici, A., M. Carrieri, E. J. Scholte, B. Maccagnani, M. L. Dindo, R. Bellini. 2011.** Studies on *Aedes albopictus* larval mass-rearing optimization. *J. Econ. Entomol.* 104:266-273.

**Munderloh, U. G., T. J. Kurtti, K. Maramorosch. 1982.** *Anopheles stephensi* and *Toxorhynchites amboinensis*: aseptic rearing of mosquito larvae on cultured cells. *J. Parasitol.* 68:1085-1091.

**Nayar, J. K. 1968.** The biology of *Culex nigripalpus* Theobald (Diptera: Culicidae) Part 2. Adult characteristics at emergence and adult survival without nourishment. *J. Med. Entomol.* 5:203-210.

**Nayar, J. K., and E. Van Handel. 1971.** The fuel for sustained mosquito flight. *J. Insect Physiol.* 17:471-481.

**Nestel, D., E. Nemny-Lavy. 2008.** Nutrient balance in medfly, *Ceratitis capitata*, larval diets affects the ability of the developing insect to incorporate lipid and protein reserves. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 126:53-60.

**Okanda, F. M., A. Dao, B. N. Njiru, J. Arija, H. A. Akelo, Y. Touré, A. Odulaja, J. C. Beier, J. I. Githure, G. Yan, L. C. Gouagna, B. G. J. Knols, G. F. Killeen. 2002.** Behavioural determinants of gene flow in malaria vector populations: *Anopheles gambiae* males select large females as mates. *Malar. J.* 1:10.

**Ooi, E., K. Goh, D. Gubler. 2006.** Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg. Infect. Dis.* 12:887-893.

**Pal, R. 1974.** WHO/ICMR programme of genetic control of mosquitos in India. The use of genetics in insect control, pp. 75-95, Elsevier.

**Parker, A. G. 2005.** Mass-rearing for sterile insect release, pp. 209-232. In V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management.* Springer, Dordrecht, The Netherlands.

**Patterson, R. S., D. E. Weidhaas, H. R. Ford, C. S. Lofgren. 1970.** Suppression and elimination of an Island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. *Science* 168:1368-1370.

**Pereira, K., A. Barbosa, N. Silva, J. Caldeira, L. Dantas, J. Pacheco. 2000.** Madeira-Med, a sterile insect technique programme for control of the Mediterranean fruit fly in Madeira, Portugal. *Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests*, pp. 433-438, Penerbit Universiti, Sains Malaysia.

**Puggioli, A., F. Balestrino, D. Damiens, R. S. Lees, S. M. Soliban, O. Madakacherry, M. L. Dindo, R. Bellini, J. R. L. Gilles. (in pubblicazione).** Efficiency of three artificial diets for larval development in mass rearing *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*

**Reisen, W. K., M. M. Milby, S. M. Asman, M. E. Bock, R. P. Meyer, P. T. McDonald, W. C. Reeves. 1982.** Attempted suppression of a semi-isolated *Culex tarsalis* population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recently colonie strain. Mosq. News 42:565-575.

**Reiter, P., D. Sprenger. 1987.** The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3:494-501.

**Roberts, D. 1998.** Overcrowding of *Culex sitiens* (Diptera: Culicidae) larvae: population regulation by chemical factors or mechanical interference. J. Med. Entomol. 35:665-669.

**Romi, R. 1994.** *Aedes albopictus* in Italia: problemi sanitari, strategie di controllo e aggiornamento della distribuzione al 30 settembre 1994. Notiziario I.S.S. 7:7-11.

**Romi, R., L. Toma, F. Severini, M. Di Luca. 2008.** Twenty years of the presence of *Aedes albopictus* in Italy – from the annoying pest mosquito to the real disease vector. Eur. Infect. Dis. 2:98-101.

**Rosales-Ronquillo, M. C., R. W. Simons, P. H. Silverman. 1973.** Aseptic rearing of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 66:949-954.

**Sehgal, N. K. 1974.** Doubts over US in India. Nature 251:177-178.

**Scholte, E. J., F. Schaffner. 2007.** Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe, pp. 241–260. In W. Takken and B. Knols (eds.), Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

**Sikorowski, P. P., A. C. Thompson. 1984.** Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. Comp. Biochem. Physiol. 77A: 283-285.



**Soper, F., D. Wilson. 1943.** *Anopheles gambiae* in Brazil, 1930 to 1940. New York: The Rockefeller Foundation.

**Soper, F. 1963.** The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*. *Am. J. Public Health* 53:7-16.

**Sy, V. E., and R. E. Campos. 2008.** Effect of diet composition on the development of the floodwater mosquito *Ochlerotatus* (*Ochletotatus*) *albifasciatus* (Macquart) (Diptera: Culicidae). *Neotrop. Entomol.* 37:729-732.

**Timmermann, S. E., H. Briegel. 1993.** Water depth and larval density affect development and accumulation of reserves in laboratory populations of mosquitoes. *Bull. Soc. Vector. Ecol.* 18:174-187.

**Timmermann, S. E., H. Briegel. 1999.** Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 45:461-470.

**Van Handel, E. 1965.** The obese mosquito. *J. Physiol.* 181:478-486.

**Van Handel, E. 1988.** Nutrient accumulation in three mosquitoes during larval development and its effect on young adults. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4:374-376.

**Whitten, M., R. Mahon. 2005.** Misconceptions and constraints. In: Dyck, V. A., Hendrichs, J., Robinson, A. S., eds. *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management.* Dordrecht, The Netherlands: Springer, 601-626.

## **RINGRAZIAMENTI**

I miei più sentiti ringraziamenti vanno al Dott. Romeo Bellini e a tutti i colleghi del laboratorio di Entomologia Medica Veterinaria del Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli”, alla Prof. Maria Luisa Dindo dell’area Entomologia del Dipartimento di Scienze Agrarie dell’Università di Bologna e al Dott. Jeremie Gilles, insieme al suo gruppo di ricerca, dell’Unità “Insect Pest Control” dell’Agenzia Internazionale per l’Energia Atomica a Vienna.