



REGIONE PUGLIA

Area Politiche per lo Sviluppo Rurale

Servizio Agricoltura

Deliberazione della Giunta Regionale n. 903 del 15/05/2012

“Linee guida per la ricerca e sperimentazione in agricoltura 2012 – 2014”

Determinazione del Dirigente del Servizio Agricoltura
n. 175 del 15/04/2013

Avviso pubblico per l’invito a presentare proposte progettuali di ricerca e
sperimentazione in agricoltura
(B.U.R.P. n. 59 del 02/05/2013) – art. 8

PROGETTO DI RICERCA E SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA

CoBIAs

"RELAZIONE SULLE ATTIVITÀ ESPLETATE"

Periodo: 29 settembre 2016- 13 marzo 2019

Titolo: Controllo Biologico per Incremento contro *Aleurocanthus spiniferus*

UNIBA-DISSPA

INDICE

1. NOTIZIE SULL'ANDAMENTO DEL PROGETTO	3
1.1 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DI RICERCA E SPERIMENTAZIONE REALIZZATE	5
2. AGGIORNAMENTO DELLE PREVISIONI DI COSTO	25

1. NOTIZIE SULL'ANDAMENTO DEL PROGETTO

Il progetto, presentato nel giugno 2013, poi finanziato nel 2016 è stato rimodulato nel rispetto dello spirito di servizio e del senso del dovere, espressi al fine di risolvere o mitigare i danni causati dall'altrimenti incontrollata invasione dell'Aleurocanto: organismo alieno, invasivo e da quarantena.

Abbiamo catturato numerosi *Zelus* ispezionando piante da reddito e ornamentali mediamente/intensamente infestate da omotteri (*Macrohormotoma gladiata* e *Aleurocanthus spiniferus*) ed evidentemente imbrattate da melata. Su queste piante si trovano facilmente le uova di colore rosso-arancio deposte in ovature di 10-30 elementi; sulle stesse piante si trovano anche tutti gli stadi del reduvide. Il catturato è stato prima allevato con gli stessi fitofagi (*M. gladiata* e *A. spiniferus*) infestanti le piante luogo delle catture, poi con una formulazione di dieta artificiale a base di fegato bovino. In questa prima fase abbiamo constatato: 1) la variabilità della popolazione; 2) l'inclinazione di *Zelus* ad accettare la dieta artificiale; 3) l'inesistenza di patologie letali o incompatibilità di accoppiamento. In questo momento abbiamo continuato ad allevare gli individui che spontaneamente hanno mostrato prolificità. Naturalmente questo atteggiamento ha escluso individui con difficoltà nell'esuviamento o altre caratteristiche incompatibili con l'allevamento.

I migliori individui, come trovati nell'azione Azione 1, sono stati accoppiati per ottenere linee di progenie da allevare in massa con preda viva e con dieta artificiale di emergenza, al fine esaltare l'istinto predatorio pur nella sicurezza alimentare del predatore. La dieta artificiale è stata anche utilizzata come riserva di cibo *ad libitum* e in situazioni di scarsità di prede. Una volta moltiplicate ed ottenute una/due deposizioni per coppia abbiamo liberato gli adulti parentali in campo. Gli *Zelus* sono stati confinati in gabbie abitate da un solo individuo e su piante infestate da ASA al fine di valutare la fitness delle femmine dalle quali avevamo ottenuto progenie. Questo al fine di una possibile selezione per efficacia di predazione nei nostri ambienti. Dalle deposizioni e dalla progenie in Fx abbiamo estratto i dati di tendenza di popolazione ($T=N2/N1$)

Durante gli allevamenti abbiamo ri-valutato le performance e lo stato sanitario delle generazioni che si sono susseguite, fino alla quarta. Infatti abbiamo scelto di limitare l'inbreed alla quarta generazione. A partire dalle prime liberazioni in campo, abbiamo controllato l'impatto dei predatori sulle popolazioni di AS contro i quali sono stati liberati.

Una buona routine d'allevamento si basa sulla scelta di opportuni contenitori ri-usabili e facili da pulire. La facilità di approvvigionamento e il costo sono parametri di secondaria importanza.

Nel complesso le due azioni orientate al controllo dell'ASA, l'azione di disseminazione e l'azione di coordinamento si sono svolte secondo quanto previsto nel progetto. Uno scostamento importante è avvenuto durante l'ultimo quarto del periodo di progetto, al ritrovamento di due antagonisti di ASA. Questi due antagonisti, un parassitoide del genere *Anagyrus* (Hymenoptera Encyrtidae) e un Coleottero Coccinellidae del genere *Delphastus* entrambi di origine ignota, stanno ora procedendo nel controllo biologico naturale dell'ASA.

1.1 Descrizione delle attività di ricerca e sperimentazione realizzate

Azione 1 Così come proposto, il progetto suggerisce la produzione massale in laboratorio di *Zelus* a partire da parentali raccolti in campo, al fine di liberare nelle coltivazioni grandi quantità di antagonisti dell'*Aleurocanthus spiniferus*. Questa proposta nasce sulla conoscenza e la ricerca svolta su due antagonisti già valutati negli agrumeti infestati da AS in Puglia, dove abbiamo osservato due specie di Coccinellidae (Coleoptera), precisamente l'*Oenopia conglobata* e il *Clitostethus arcuatus*, predare attivamente l'AS. Sappiamo, inoltre, che queste due specie predano l'AS sia da adulti sia da larve e che possono completare il loro ciclo biologico a carico di AS. I due coccinellidi non sono però capaci di controllare l'ASA a livelli economici (El Kenawy A. (2016). Augmentative Biological Control (ABC) of *Aleurocanthus spiniferus*, an alien invasive pest recently introduced in Italy, in EPPO and into Mediterranean countries. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, 118 pp.).

Tavola 01: Attività di *Clitostethus arcuatus* contro *Aleurocanthus spiniferus* su Citrus CV; a) uova consumate prima della schiusura; b) larva; c) pupa; d) Adulto.



Tavola 02: Attività di *Oenopia conglobata* contro *Aleurocanthus spiniferus* su Citrus CV; a & b) larva vagante presso le uova dell'aleirode; c) pupa; d) adulto del coccinellide.



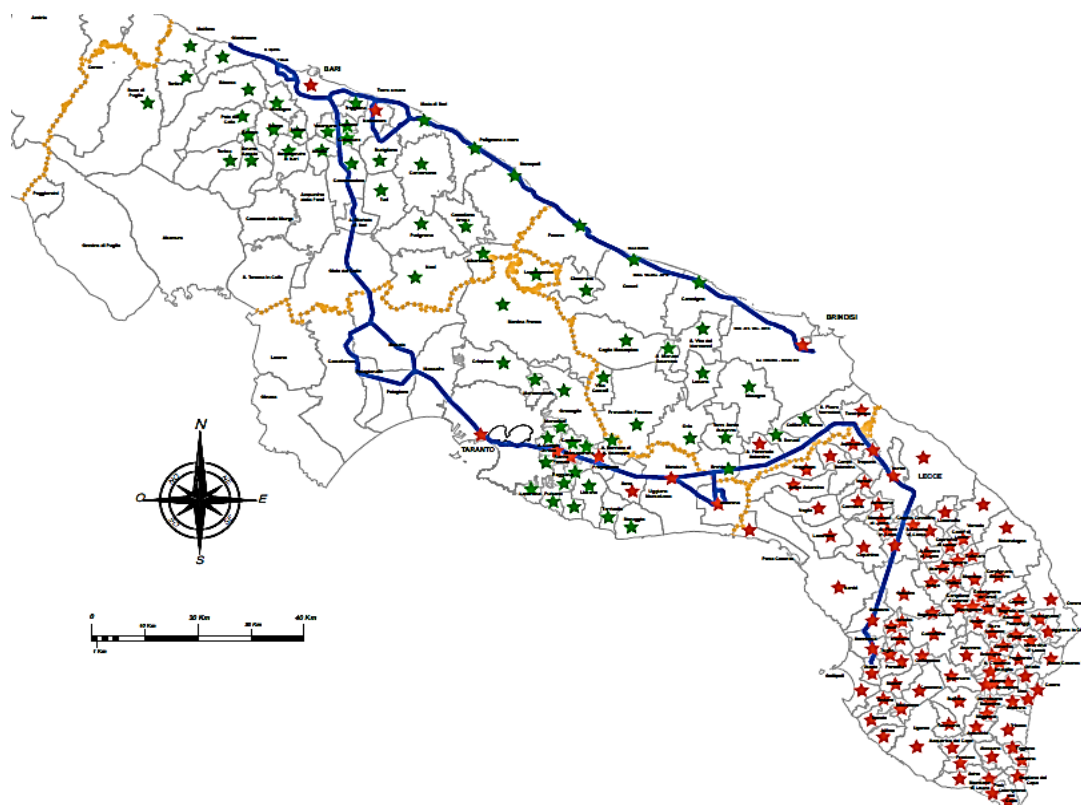


Figura 1 Luoghi delle raccolte di *Zelus* spp. Le stelle rosse individuano i comuni i cui territori sono stati invasi da *Aleurocanthus spiniferus* nel periodo delle raccolte del reduvide.

Nell'ambito dell'azione abbiamo raccolto in campo numerosi *Zelus* che abbiamo allevato con prede vive appartenenti a diverse specie e, in emergenza, con una formulazione di dieta artificiale a base di fegato bovino.

La valutazione sanitaria e genetica delle linee di progenie ha privilegiato la selezione di adulti di maggiori dimensioni, pronti ad accettare la dieta artificiale, senza difficoltà nell'esuvamento e regolarmente prolifici. La routine d'allevamento è stata scelta in base ai contenitori disponibili per costo, facilità di approvvigionamento, ri-usabilità e facilità di pulizia.

Di seguito si riporta un dettaglio delle fasi di cattura ed allevamento.

1.1 cattura in campo di *Zelus* e raccolta di possibili prede vive

Durante e per l'esecuzione di questo progetto abbiamo raccolto centinaia di ovature e catturato decine di *Zelus* vaganti in campo. Sia le ovature sia gli esemplari sono stati trovati su e presso piante ospiti attualmente o precedentemente infestate da omotteri produttori di melata. Abbiamo trovato le ovature prima e in procinto della schiusura delle uova su piante attualmente infestate. Abbiamo individuato ovature esauste su molte piante in precedenza

infestate da omotteri, infestazioni dedotte grazie ai segni (fumaggine) di abbondante produzione di melata.

Per la selezione siamo partiti da 66 forme preimmaginali tra neanidi e ninfe, 8 individui maschi, 8 individui femmine e 11 ovature composte, in media, da 28 uova per ovatura. Nel complesso la selezione è stata effettuata a partire da 391 *Zelus* catturati in campo.

Gli allevamenti di *Zelus* e delle sue possibili prede sono stati realizzati partendo da individui selvatici catturati su piante di *Citrus sp.*, infestate da AS e condotti nel laboratorio accreditato "Entomologia Forense" del DiSSPA-UNIBA Aldo Moro. Oltre che su AS abbiamo utilizzato come prede vive anche *Drosophila melanogaster* e *Megaselia sp.*, specie di ditteri insetti facilmente allevabili in laboratorio. Queste ultime due specie di ditteri sono state esposte alla predazione di *Zelus* giovani.

Tabella 01: Date e luoghi visitati per la cattura/raccolta *Zelus* e loro possibili prede vive. Diverse date possono essere attribuite allo stesso aggregato urbano nel caso diversi luoghi simili (i.e. Giardino urbano) siano stati visitati nelle date indicate.

Data della raccolta	Luogo della raccolta	Pianta ospite
	Provincia di BARI	
23/10/2016 23/10/2016 23/10/2016 23/10/2016 23/02/2017 24/02/2017 16/04/2017	Bari Via Amendola angolo via Postiglione; Via Padre Pio; Giardino pubblico Viale della Repubblica, vie: Luigi Galvani e Orabona, Campus Quagliariello UNIBA; Via Amendola 207, bed & breakfast Executive e l'Orangerie; Via Nizza; Corso Alcide de Gasperi (Giardino).	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Rosa sp.</i> , <i>Citrus sp.</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>CV Regina</i>
24/10/2016	Via Caccuri (Giardino urbano presso Hotel Nicholas)	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>
24/10/2016 10/02/2017 26/04/2017	Bitritto Circonvallazione, Via Nicola Bellomo	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> <i>Rosa sp.</i> <i>Citrus sp.</i>
24/10/2016 10/02/2017	Bari Via Giovanni Gentile Presso "Carbur drink" N.73 Autocarrozzeria Meselli N.58	<i>Vitis vinifera</i>
24/10/2016 10/02/2017 12/03/2017	Casamassima, SS 100, via Noicattaro 2, presso centro commerciale Auchan Casamassima, Giardino urbano	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>
24/10/2016 10/02/2017	Noicattaro Corso Roma, Giardino urbano	<i>Citrus sp.</i> <i>Vitis vinifera</i>
24/10/2016 10/02/2017	SP Noicattaro - Rutigliano giardino privato verso Rutigliano, Noicattaro, presso Esposizione Settanni S.r.l. Uffici Officina 634 Km, 72	<i>Vitis vinifera</i>
24/10/2016 10/03/2017	Polignano San Vito-San Giovanni F.lli Spada S.n.c. Distributore SS16, KM 835 Ripagnola Di Teofilo G. C. Distributore Km. 829.257 SS 16	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Citrus sp.</i>
25/10/2016 18/02/2017	Noicattaro Centro storico	<i>Citrus spp</i>

	Corso Roma	
26/10/2016 18/02/2017	Noicattaro SP 57, Distributore Q8 km 1,250	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Citrus spp</i>
28/10/2016 18/02/2017	Mola di Bari - Polignano a Mare SS 16 Distributore Eni & Total Erg km 829.257	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Citrus spp</i>
06/11/2016 27/02/2017	Bari San Paolo, SP 73 Viale Europa presso Distributore "Suditalia Gas" 18/b	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Rose</i> , <i>Citrus</i>
26/10/2016 27/02/2017	Bari Palese, Giardino urbano Via Nisio Girolamo Via Duca D'Aosta	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Rose</i> , <i>Citrus spp</i>
26/10/2016 27/02/2017	S.S. 16 Bis Santo Spirito, Giovinazzo Complanare Sud, Distributore ENI km 787,220	<i>Citrus spp</i>
28/04/2017	Bari Torre a mare, SS16, Distributore Q8 km 811.400 Esso Ss 16 Km 812+572	<i>Ficus spp</i> , <i>Parthenocissus tricuspidata</i>
28/04/2017	Noicattaro, via Torre a mare N.68 Giardino privato	<i>Citrus limon</i> , <i>Vitis vinifera</i>
28/04/2017	Cozze, Giardino urbano	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>
07/05/2016	Polignano a Mare SS16 San Vito San Giovanni, Distributore Q8 km 833,454	<i>Pittosporum tobira</i>
28/04/2017	Polignano a Mare-Monopoli SS16 Distributore Total Erg km 839.950	<i>Pittosporum tobira</i>
08/04/2017	Gioia del Colle, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Prunus laurocerasus</i>
12/11/2016 17/04/2017 09/05/2016	Modugno, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
12/11/2016 17/04/2017 09/05/2016	Bitonto, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
12/11/2016 17/04/2017 09/05/2016	Giovinazzo, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
12/11/2016 17/04/2017 09/05/2016	Molfetta, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Prunus laurocerasus</i>
12/11/2016 17/04/2017 09/05/2016	Terlizzi, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Prunus laurocerasus</i>
12/11/2016 17/04/2017 09/05/2016	Ruvo di Puglia, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
26/04/2017 12/05/2016	Bitritto, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
26/04/2017 12/05/2016	Binetto, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
26/04/2017 12/05/2016	Bitetto, Giardino urbano	<i>Rose</i> , <i>Citrus spp</i>
26/04/2017 12/05/2016	Palo del Colle, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
26/04/2017 12/05/2016	Toritto, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
26/04/2017 12/05/2016	Grumo Appula, Giardino urbano	<i>Rose</i> , <i>Citrus spp</i>
06/05/2016 15/05/2016	Sannicandro di Bari, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
20/04/2017 06/05/2016 15/05/2016	Adelfia, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i> , <i>Vitis vinifera</i>
20/04/2017	Valenzano, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>

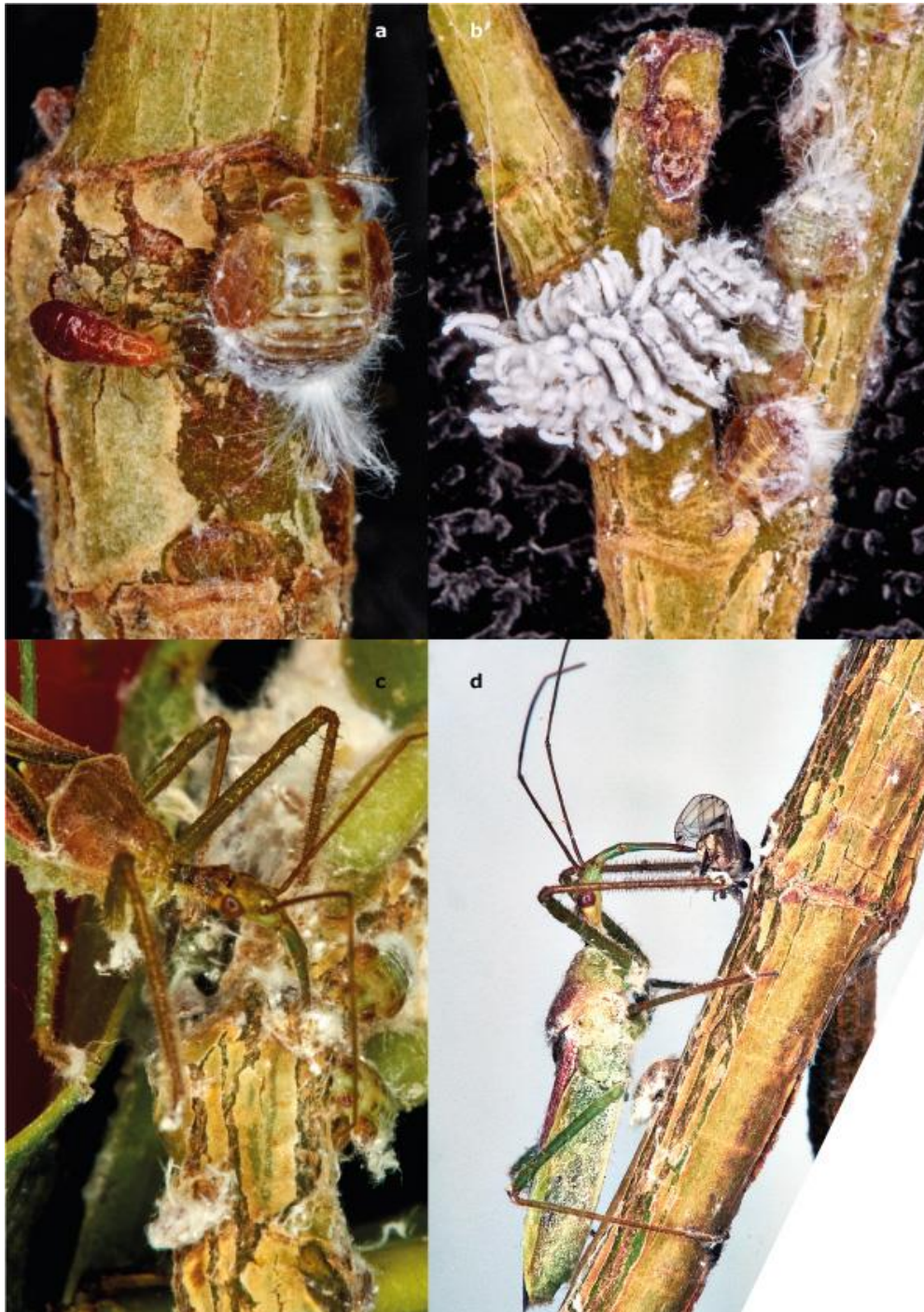
06/05/2016 15/05/2016		
21/10/2016 06/05/2016 15/05/2016	Capurso, Giardino urbano	<i>Citrus spp, Vitis vinifera</i>
21/10/2016 06/05/2016 15/05/2016	Cellamare, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
21/10/2016 06/05/2016 15/05/2016	Triggiano, Giardino urbano	<i>Ficus spp, Parthenocissus tricuspidata, Vitis vinifera</i>
21/10/2016 16/05/2016 16/05/2016	Conversano, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
12/03/2017 16/05/2016 16/05/2016	Turi, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
21/10/2016 16/05/2016 16/05/2016	Putignano, Giardino urbano	<i>Rose, Citrus spp</i>
21/10/2016 15/05/2016 16/05/2016	Noci, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
12/03/2017 16/05/2016 16/05/2016	Castellana Grotte, Giardino urbano	<i>Rose, Citrus spp</i>
21/10/2016 15/05/2017 16/05/2017	Alberobello, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
21/10/2016 15/05/2016 16/05/2016	Monopoli, Giardino urbano	<i>Citrus spp</i>
15/05/2016 16/05/2016	Locorotondo, Giardino urbano	<i>Rose, Citrus spp</i>
Provincia di TARANTO		
27/10/2016	Taranto, Via Ciro Giovinazzo, Giardino urbano	<i>Citrus spp Parthenocissus tricuspidata Rose, Citrus spp</i>
27/10/2016	Taranto, Giardino urbano Pantano	
20/04/2017 27/10/2016 08/04/2017	Massafra, Giardino urbano Pezzata rossa Patemisco Chiatona Albanello Dicolillo Mazzarelle Ciula	<i>Parthenocissus tricuspidata, Rose, Citrus spp, Vitis vinifera</i>
20/04/2017 13/02/2017 27/10/2016 08/04/2017	Palagiano, Giardino urbano Lupini San Marco Conocchiella Lenne Marchiotta Galliano Lama d'Erchie Conca d'oro Monticello	<i>Parthenocissus tricuspidata, Rose, Citrus spp</i>
20/04/2017 13/02/2017 28/10/2016 08/04/2017	Palagianello, Giardino urbano Parco di stalla Difesella Lenne	<i>Parthenocissus tricuspidata, Rose, Citrus spp</i>

05/11/2016 28/10/2016 22/04/2017	Castellaneta, Giardino urbano Borgo Perrone Le Ferre Salesiano Gaudella Serenella Terzo dieci Scapati	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Rose</i> , <i>Citrus</i> spp, <i>Vitis</i>
05/11/2016 28/10/2016 22/04/2017	Ginosa marina, Giardino urbano Magliati Girifalco Stornara Pantano Montedoro Lama di pozzo	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Rose</i> , <i>Citrus</i> spp
05/11/2016 27/10/2016 22/04/2017	Statte, Giardino urbano Accetta Grande Gravinella Accetta Piccola	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Rose</i> , <i>Citrus</i> spp
05/11/2016 13/10/2016 21/05/2016	San Giorgio Ionico, Giardino urbano	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> ,
24/11/2016	Monteparano, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
13/10/2016 24/11/2016	Fragagnano, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
13/02/2017 13/10/2016 21/05/2016	Manduria, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
13/02/2017 13/10/2016 21/05/2016	Sava, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
13/10/2016 21/05/2016	Avetrana, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
04/04/2017 21/11/2016	Martina Franca, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
13/02/2017 03/02/2017 21/11/2016	Crispiano, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
03/02/2017 21/11/2016	Montemesola, Giardino urbano	<i>Rose</i> ,
13/02/2017 03/02/2017 21/11/2016	Grottaglie, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
03/02/2017 21/11/2016	Monteiasi, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
24/02/2017 24/11/2016	San Marzano di San Giuseppe, Giardino urbano	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> <i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
13/02/2017 24/02/2017 24/11/2016	Carosino, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
24/02/2017 24/11/2016	Rocca Forzata, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
04/04/2017 24/02/2017 24/11/2016	Faggiano, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
13/10/2016 25/11/2016	Leporano, Giardino urbano	<i>Rose</i> , <i>Citrus</i>
04/04/2017 25/11/2016	Pulsano, Giardino urbano	<i>Rose</i> , <i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
04/04/2017 25/11/2016	Lizzano, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
04/04/2017	Torricella, Giardino urbano	<i>Citrus</i>

25/11/2016		
04/04/2017 25/11/2016	Maruggio, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
	Provincia di BRINDISI	
12/03/2017 13/02/2017 21/05/2016	Brindisi, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
30/04/2017 12/03/2017 09/04/2017 21/05/2016	Torchiarolo, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
28/04/2017 12/03/2017 17/07/2017	Fasano, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
28/04/2017 12/03/2017 17/07/2017	Ostuni, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
13/02/2017 17/07/2017	Carovigno, Giardino urbano	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> , <i>Citrus</i>
13/02/2017 17/07/2017	San Vito dei Normanni, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
30/04/2017 12/03/2017 09/04/2017 13/02/2017 17/07/2017	Mesagne, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
30/04/2017 12/03/2017 09/04/2017 13/02/2017 17/07/2017	Torre Santa Susanna, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
30/04/2017 12/03/2017 09/04/2017 17/07/2017	Erchie, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
13/02/2017 06/02/2017	Cisternino, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
13/02/2017 06/02/2017	Ceglie Messapica, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
06/02/2017	Villa Castelli, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
13/10/2016 04/04/2017 06/02/2017	FrancaVilla Fontana, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
30/04/2017 12/03/2017 09/04/2017 06/02/2017	Oria, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
13/02/2017 06/02/2017	Latiano, Giardino urbano	<i>Citrus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
06/02/2017	San Michele Salentino, Giardino urbano	<i>Citrus</i>
09/04/2017 12/03/2017	San Pietro Vernotico, Giardino urbano	<i>Citrus</i>

Già durante le prime osservazioni in campo abbiamo osservato *Zelus* e alcuni altri predatori (*Cryptolaemus montrouzieri*, *Anthocoris* (forse *nemoralis*) Mifsud & Porcelli, 2012) utilizzare le prede disponibili, formando una gilda di antagonisti concorrente al controllo naturale (o spontaneo) delle popolazioni di fitofagi infestanti.

Tavola 03: *Zelus* e altri predatori antagonisti di *Macrohomonotoma gladiata* su *Ficus* ornamentali; a) giovanile di *Anthocoris* sp. e b) larva di *Cryptolaemus montrouzierii* che predano ninfe di *M. gladiata*; c & d) *Zelus* adulto che preda adulti e ninfe dello stesso psillide.



1.2 allevamento con prede vive (AS)

I predatori sono stati allevati in capsule Petri, di diametro differente in funzione dello stadio di sviluppo dell'insetto e identificate con un codice alfanumerico. Nel corso degli allevamenti abbiamo constatato deformità e difficoltà di esuvamento

causate da bassa UR%. Abbiamo risolto inserendo nella petri un disco di cotone idrofilo o carta bibula imbevuto d'acqua. Questo accorgimento ha garantito un ambiente idoneo all'allevamento e un substrato – la carta – preferito per l'ovoposizione.

Tavola 04: *Zelus* in allevamento su *Aleurocanthus spiniferus* in capsule petri e postazione per la raccolta dati e la conduzione dell'allevamento.



Gli allevamenti di *Zelus* sono stati avviati partendo da ovature e individui selvatici catturati su piante di *Citrus sp.*, infestate da AS. Le piante in questione sono ubicate presso il campus universitario "Ernesto Quagliariello" dell'UNIBA Aldo Moro. Il catturato è stato posto in allevamento nel laboratorio accreditato "Entomologia Forense" del DiSSPA-UNIBA Aldo Moro.

Per la raccolta ci si è avvalsi di osservazioni dirette sulla vegetazione agrumicola e dell'ausilio di un ombrello entomologico.

In campo sono stati raccolti: 66 forme preimmaginali tra neanidi e ninfe, 8 individui maschi, 8 individui femmine e 11 ovature per un totale di 309 uova (in media 28 uova per ovatura).

Le forme preimmaginali e gli adulti sono stati posti singolarmente in allevamento in capsule Petri da 9 cm identificate da un codice alfanumerico. Le ovature, invece, sono state poste singolarmente in allevamento in capsule Petri da 3 cm.

Dalle ovature sono **nate 295 neanidi** (tasso di schiusura di circa il 93%) e queste sono state poste singolarmente in capsule Petri da 3 cm identificate anch'esse da un codice alfanumerico.

Gli *Zelus* sono stati allevati offrendo AS, ma abbiamo anche offerto Drosophilidae e Phoridae a giorni alterni e direttamente nella capsula d'allevamento. In particolare durante i fine settimana o l'inverno, abbiamo condotto gli allevamenti

anche proponendo diete artificiali. La dieta artificiale è stata dispensata in emergenza, in particolare in pieno inverno, quando le temperature particolarmente basse anche in laboratorio (non riscaldato durante i fine settimana) rendevano poco attrattive prede immobili.

Le diete oligidiche (naturali) sono state formulate principalmente con fegato bovino (80%) omogeneizzato e tuorlo d'uovo in polvere (20%) eventualmente protette con antifermentativi. Le formulazioni sono state diverse, liquide o gelificate. Queste diete sono state dispensate a giorni alterni in quantità eccedente i bisogni. Le diete sono state immediatamente accettate dal predatore che se ne è nutrito immergendo il rostro nei liquidi o infiggendo gli stiletto nelle gelificate.

Tavola 05: Ovature e esuvie di *Zelus* su Citrus CV intensamente infestato da *Aleurocanthus spiniferus* e *Aleurothrixus floccosus*. Le frecce indicano, sulle immagini a minore ingrandimento, i choria del predatore.



Tavola 06: Allevamento e conduzione di *Zelus* in laboratorio; a & b) adulti catturati in campo e in accoppiamento in laboratorio; c) femmina e uova appena deposte in piastra petri con *Aleurocanthus spiniferus*; d) neanidi neonate e nasciture da uova su carta umida, uova deposte come in "c"; e & f) neanidi trasferire in contenitori per allevamento con preda viva, *Drosophila melanogaster*; g & h) ninfe in allevamento su *Aleurocanthus spiniferus* e dieta artificiale agarizzata; i) adulto neosfarfallato nato e cresciuto in allevamento; l) femmina adulta che si alimenta su dieta artificiale liquida; m & n) femmina nata e cresciuta in cattività e deponente in piastra petri, di fianco e dal basso.



Azione 2 Valutazione performance di allevamento; Allevamento massale su preda di allevamento; Valutazione efficienza allevamento; Liberazione in campo degli antagonisti; Valutazione degli antagonisti.

Nell'ambito di questa azione ci siamo occupati dalla valutazione delle performance sanitarie e di allevamento degli organismi selezionati. Gli individui meglio sopravvissuti alla prima riproduzione e allevamento durante l'azione Azione 1, sono stati accoppiati per ottenere linee di progenie da allevare in massa con preda viva o su dieta artificiale in emergenza, al fine esaltare l'istinto predatorio. Una volta moltiplicate ed ottenute una/due deposizioni per coppia abbiamo liberato gli adulti parentali in campo. Gli *Zelus* sono stati confinati in gabbie abitate da un solo individuo e su piante infestate da ASA al fine di valutare la fitness delle femmine dalle quali avevamo ottenuto progenie. Questo al fine di una possibile selezione per efficacia di predazione nei nostri ambienti. Dalle deposizioni e dalla progenie in Fx abbiamo estratto i dati di tendenza di popolazione ($T=N2/N1$) che rappresentano il fattore di moltiplicazione degli individui ottenuti per generazione allevata.

Gli allevamenti da considerare per valutare i risultati di fitness e di "T" (= Trend = Tendenza) di popolazione dello *Zelus* sono quelli su preda viva, prevalentemente *Drosophila melanogaster* ma anche *Megaselia* sp. L'esperienza con dieta artificiale è stata condotta come opportunità di garanzia in caso di rarefazione o indisponibilità di dieta viva. Questa scelta di progetto origina dall'esperienza condivisa che anche gli allevamenti di prede vive sottostanno a imprevedibili epizoozie che assottigliano o azzerano la continua disponibilità di prede per l'allevamento principale. Tali epizoozie vengono contrastate aggiungendo farmaci antifermentativi/antibiotici alla dieta delle prede, farmaci che agiscono sfavorevolmente sugli endosimbionti dei predatori e falsano i risultati dell'allevamento degli antagonisti. La scelta di avere disponibile una dieta artificiale di emergenza permette una ragionevole presunzione di sicurezza, come persistenza e continuità, degli allevamenti.

L'esame con tavole vitali (Tabella 02 per dieta con preda viva e Tabella 03 per dieta artificiale) degli allevamenti può essere interpretato ammettendo che la causa di maggiore mortalità, in corrispondenza delle prime neanidi, sia un evento naturale. Infatti, le piccole dimensioni dei neonati che hanno, per questo, modeste riserve energetiche e una conseguente grande suscettibilità ai fattori ambientali e all'affamamento. La scarsità di cibo può dipendere dalla mobilità delle prede, alate e inclini a volare lontano dal predatore, una volta fallito il primo attacco. Le due diete si differenziano anche perché l'allevamento con *Drosophila* mostra una mortalità regolarmente decrescente da stadio a stadio di accrescimento del predatore. La dieta artificiale induce, invece, una mortalità

molto più importante nel primo stadio di neanide che poi diminuisce improvvisamente e manca dalle seconde ninfe. La mancata schiusa dalle uova in D0 non dipende dalla dieta. Infine, la dieta su preda permette una tendenza di popolazione di diciotto volte la tendenza naturale, mentre la dieta artificiale esprime un T di "solo" sei volte quello naturale.

Tabella 02: Tavole vitali per *Zelus* allevato con preda viva

Tavola vitale per Dm: dieta a base di <i>Drosophila melanogaster</i>					
Uova per femmina	112	Anfigonico= 0,5 (per sex ratio = 1) partenogenetico= 1	Fattore femmina =	0,5	
n° di adulti	8				
x	Lx	$\Delta x f$	Δx	$100 * q x$	$100 * \Delta x / N$
Uova (N1)	448	Non schiuse	93	20,76	21%
Uova (N1)	355	Nihil	0	0,00	0%
Uova (N1)	355	Nihil	0	0,00	0%
Naiadi 1	355	Mortalità prime naiadi	165	46,48	37%
Naiadi	190	Nihil	0	0,00	0%
Naiadi 2	190	Mortalità seconde naiadi	15	7,89	3%
Naiadi	175	Nihil	0	0,00	0%
Naiadi 3	175	Mortalità terze naiadi	18	10,29	4%
Naiadi	157	Nihil	0	0,00	0%
Ninfe 1	157	Mortalità prime ninfe	6	3,82	1%
Ninfe	151	Nihil	0	0,00	0%
Ninfe 2	151	Mortalità seconde ninfe	8	5,30	2%
Ninfe	143	Nihil	0	0,00	0%
Adulti	143	Nihil	0	0,00	0%
Adulti	143	Nihil	0	0,00	0%
Uova (N2)	8.008				
T =	17,88				

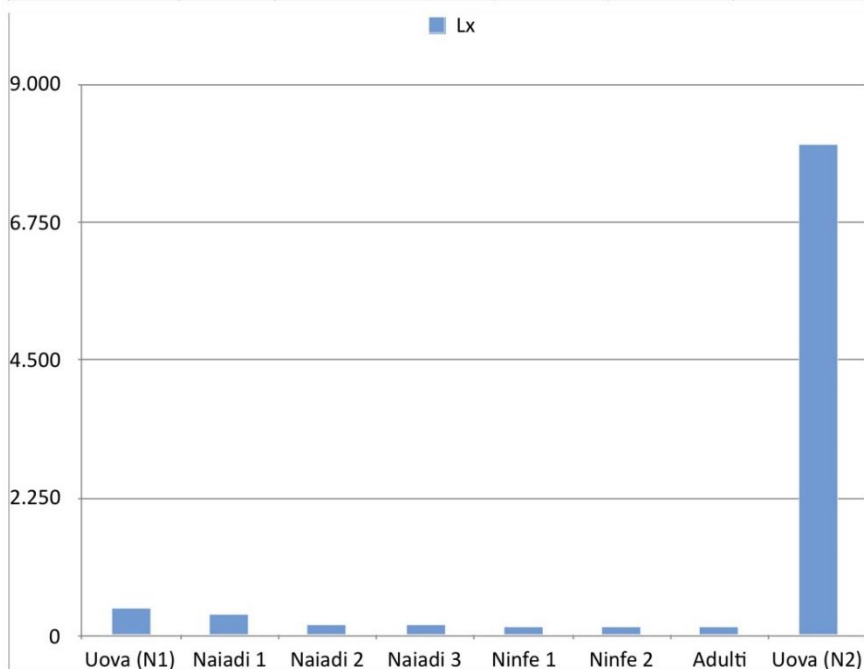
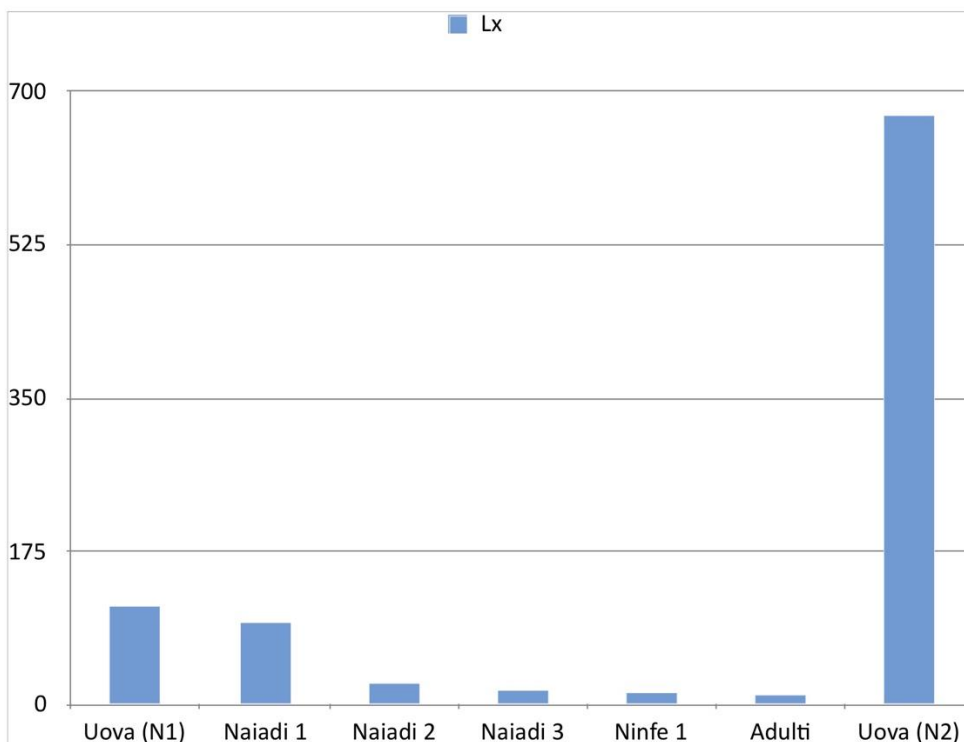


Tabella 03: Tavole vitali per *Zelus* allevato con dieta artificiale

Tavola vitale per D0: dieta artificiale a base di fegato e tuorlo d'uovo					
Uova per femmina	112	Anfigonico= 0,5 (per sex ratio = 1) partenogenetico= 1	Fattore femmina =	0,5	
n° di adulti	2				
x	Lx	$\Delta x f$	Δx	100*qx	100* $\Delta x/N$
Uova (N1)	112	Non schiuse	18	16,07	16%
Uova (N1)	94	Nihil	0	0,00	0%
Uova (N1)	94	Nihil	0	0,00	0%
Naiadi 1	94	Mortalità prime naiadi	70	74,47	63%
Naiadi	24	Nihil	0	0,00	0%
Naiadi 2	24	Mortalità seconde naiadi	8	33,33	7%
Naiadi	16	Nihil	0	0,00	0%
Naiadi 3	16	Mortalità terze naiadi	2	12,50	2%
Naiadi	14	Nihil	0	0,00	0%
Ninfe 1	14	Mortalità prime ninfe	2	14,29	2%
Ninfe	12	Nihil	0	0,00	0%
Ninfe 2	12	Mortalità seconde ninfe	0	0,00	0%
Ninfe	12	Nihil	0	0,00	0%
Adulti	12	Nihil	0	0,00	0%
Adulti	12	Nihil	0	0,00	0%
Uova (N2)	672				
T =	6,00				



Le coppie selezionate inizialmente sono state 18. I singoli individui sono stati allevati in capsule Petri identificate. Le capsule, del diametro di 9 cm, sono state rivestite sul fondo da un disco di cotone idrofilo del medesimo diametro. I Reduviidae necessitano di livelli di umidità pari o superiori al 68%. Il cotone idrofilo, imbibito a giorni alterni con 0,25 ml di acqua distillata, ha permesso il costante mantenimento dei livelli di umidità relativa. Inoltre, il cotone costituisce un buon substrato per la deposizione delle uova e, data la sua asperità, garantisce punti di ancoraggio per consentire l'esuviamento.

Una metà dei riproduttori è stata nutrita con prede vive afferenti ai generi *Drosophila* e *Megaselia*. L'altra metà, invece, è stata alimentata con una dieta artificiale oligidica. La dieta oligidica, caratterizzata da ingredienti organici grezzi, era composta da una miscela di fegato bovino omogeneizzato e tuorlo d'uovo di gallina. La dieta è stata somministrata dapprima in forma liquida e successivamente in forma solida grazie all'impiego di agar. Il cibo liquido è stato offerto in aliquote di 0,25 ml; mentre, quello agarizzato, è stato servito sotto forma di cubi di 1 cm² (1 cm x 1 cm). L'antagonista ha accettato la formulazione artificiale, sia liquida che solida, nutrendosi quasi immediatamente della razione alimentare (dopo circa un minuto dalla somministrazione). *Zelus*, sia con la dieta artificiale che naturale, è riuscito a completare il ciclo biologico in cattività (da uovo a uovo).

Gli individui selezionati come riproduttori (18 coppie) sono stati congiunti per far sì che avvenisse l'accoppiamento. Dall'accoppiamento sono state ottenute 33 ovature, deposte scolarmente nell'arco di due mesi. Il numero complessivo di uova di *Zelus* ottenute in cattività è di 852 (ca. 26 uova/ovatura). Appena deposte, le ovature sono state allontanate dalle capsule delle madri per essere isolate in capsule Petri dal diametro di 3,5 cm. anche queste capsule sono state rivestite da un disco di cotone idrofilo. Oltre che per garantire l'umidità relativa costante, il cotone è stato utilizzato per coadiuvare la fuoriuscita delle neanidi dalle uova. Il tempo intercorso tra la deposizione e la schiusura delle uova è stato in media di circa 17 giorni. Il totale degli individui nati è stato di 637. Nota la propensione al cannibalismo della specie, subito dopo la schiusura delle uova i neonati sono stati posti in singola capsula Petri identificata del diametro di 3,5 cm, corredata di cotone idrofilo. La progenie ottenuta è stata suddivisa in tre gruppi omogenei ai quali sono state sottoposte tre differenti tipi di diete artificiali: oligidica, olidica (dieta chimicamente definita in termini di amminoacidi, lipidi, carboidrati, vitamine, minerali, etc.) e meridica (base olidica con una o più sostanze non raffinate o chimicamente sconosciute).

Sulla progenie è avvenuta una prima selezione massale sulla base di caratteristiche etologiche del predatore selezionando individui dai parentali con

le più alte performance riproduttive, in termini di fertilità, e raptatorie. Inoltre, le linee di progenie sono state selezionate basandosi su caratteristiche come: prolificità, voracità e aggressività dei singoli individui rispetto alla media della popolazione allevata. Oltre alla selezione massale, sulla coorte è stata impressa una selezione sanitaria. Sono stati esclusi dalla sperimentazione tutti gli individui figli che hanno mostrato patologie o anomalie sia durante lo sviluppo. Alla fine dei processi selettivi è stata ottenuta una coorte di 127 individui con alte performance biologiche, etologiche e sanitarie.

Sulla progenie selezionata e allevata su le tre tipologie di diete sono stati raccolti dati sulla biologia dell'insetto nelle condizioni di laboratorio. La raccolta dati era finalizzata a comprendere quale, delle diete sottoposte a *Zelus*, fosse migliore per far completare il ciclo biologico.

L'allevamento di *Zelus*, sin dai primi stadi di sviluppo, è avvenuto nelle modalità già descritte. Sono state impiegate capsule Petri di diametro crescente (3,5 cm, 6 cm e 9 cm) in relazione allo stadio di sviluppo post-embrionale del predatore.

Al raggiungimento dello stadio adulto, la popolazione residua è stata fatta nutrire, sia *in vitro* che *in vivo*, su rametti di *Citrus spp.* infestati da AS. In laboratorio, gli individui sono stati alimentati inserendo, direttamente in capsula d'allevamento, delle foglie infestate da un numero noto di AS. Altri *Zelus* sono stati confinati, con una rete a maglia di 1mm, su delle branchette infestate da AS dopo aver eseguito la stima dell'infestazione iniziale. Dai dati osservati, sia in campo che in laboratorio, è emerso che *Zelus* ha una attività predatoria nei confronti di AS, ma la stessa è alquanto modesta. La stima dell'efficacia di *Zelus* nel controllo di AS si aggira attorno all'8%. Tali livelli di efficacia non indicano il predatore *Zelus* come possibile candidato per il controllo biologico del AS.

Ulteriori esperienze di laboratorio riguardanti *Zelus* hanno mostrato, invece, una buona attività predatoria nei riguardi di altre specie fitofaghe degli agrumi ma non solo. Infatti, sono in corso ulteriori studi sull'efficacia di *Zelus* nel controllo biologico dei suddetti fitofagi.

Zelus renardii è riuscito a completare il proprio ciclo biologico in cattività per quattro generazioni seguenti a condizioni di laboratorio, dalla nascita alla deposizione di uova fertili: sia con prede vive; sia con diete oligidiche. La quarta e ultima generazione si è evoluta fino a natale 2018 ed è stata falciata dalle basse temperature.

Si è proceduto anche con la selezione massale dei parentali in cattività. Una prima selezione è avvenuta sulla base delle performance riproduttive dei parentali, selezionando le femmine per la massima prolificità, e entrambi i sessi

per l'attitudine a predare misurata come numero di prede uccise per giorno. Inoltre abbiamo selezionato anche per l'accettazione delle diete loro offerte.

Quindi è stata operata la selezione massale della progenie in cattività. La progenie della stessa ovatura è stata selezionata intra coorte. Abbiamo scelto gli individui plus varianti da utilizzare per proseguire gli allevamenti in base a: attitudine a predare, misurata come numero di prede uccise per giorno; accettazione delle diete loro offerte; velocità dello sviluppo. Con l'innovazione nelle diete, nel metodo di allevamento, nella selezione e nella conduzione abbiamo standardizzato e stabilizzato l'allevamento di *Zelus* abbastanza da poter prevedere la disponibilità di numero di riproduttori e di numero di nati per generazione.

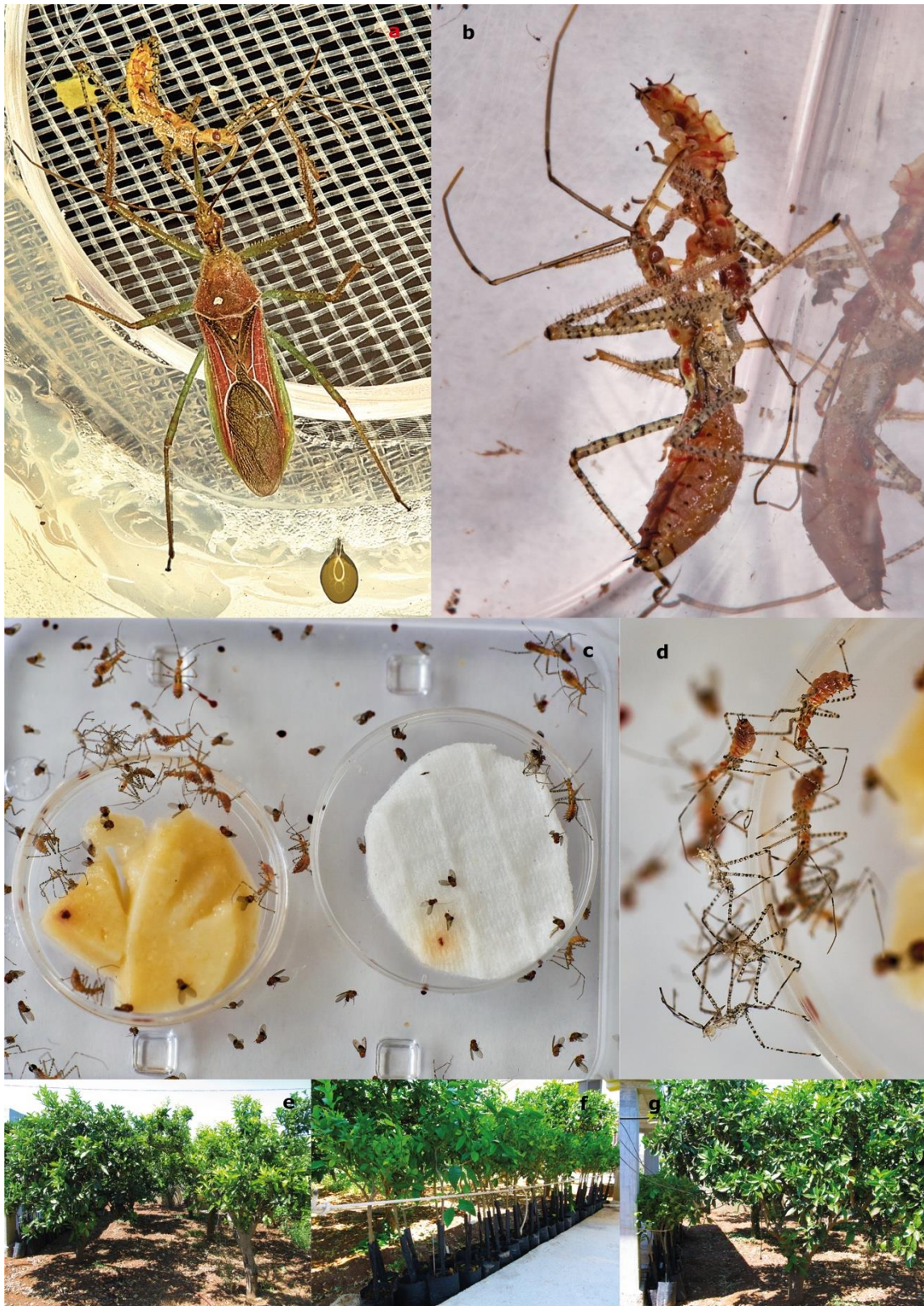
Sono state realizzate prove di predazione e individuazione di ulteriori nemici naturali. *Zelus*, sia *in vitro* che *in vivo*, è stato esposto a porzioni di agrumi infestati da AS. L'esposizione è avvenuta per valutare l'efficacia del predatore nel contenimento del fitofago. *Zelus* predava, sia in campo che in laboratorio, modeste quantità di AS. La stima dell'efficacia di *Zelus* nel controllo di AS si aggira attorno all'8%. Questi risultati mostrano una scarsa attività dell'antagonista nel controllo di AS.

Sulle piante infestate da AS, durante i diversi sopralluoghi, è stata riscontrata la frequente presenza di un Coleottero Coccinellidae. Degli esemplari sono stati identificati, tramite lo studio delle vie genitali, come: *Delphastus catalinae* Horn, 1895. Inoltre è stato possibile individuare anche la presenza di un parassitoide Imenottero afferente alla famiglia degli Aphelinidae e al genere *Eretmocerus*.

Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile redigere poster presentati in concomitanza di convegni nazionali e internazionali. Inoltre sono state organizzati differenti incontri e workshop per sensibilizzare stakeholders, funzionari, tecnici e studenti universitari sulla gestione delle infestazioni di AS.

Durante gli allevamenti abbiamo ri-valutato le performance e lo stato sanitario delle generazioni che si sono susseguite, fino alla quarta. Infatti abbiamo scelto di limitare l'ibridazione alla quarta generazione. A partire dalle prime liberazioni in campo, monitoreremo l'impatto dei predatori sulle popolazioni di AS contro i quali sono stati liberati.

Tavola 07: *Zelus*: selezione intra coorte, problematiche di allevamento massale e primo tentativo di liberazione in campo; a & b) cannibalismo adulto Vs ninfa e ninfa VS ninfa; c) allevamento massale intra coorte in eccesso di prede e dieta artificiale; d) neanidi coetanee che hanno preferito le prede e la dieta artificiale al cannibalismo; e, f & g) uno dei siti di liberazione degli *Zelus* allevati in laboratorio.



Azione 3 trasferimento.

Le conoscenze sviluppate con le attività di progetto sono disponibili su pagine www (www.alien-invasive-quarantine-pest.org/cobias-background; www.alien-invasive-quarantine-pest.org/cobias; www.alien-invasive-quarantine-pest.org/cobias-osw-pdf-s) e su profilo Facebook (www.facebook.com/ALIEN-Invasive-Quarantine-PEST-387478685346494/). Le pagine "www" raccolgono la documentazione di progetto, immagini e temi sullo studio dell'ASA e materiale organizzativo/burocratico sull'argomento di progetto. I materiali sono stati aggiornati quando disponibili e comprendono documenti .pdf, filmati, fotografie, pubblicazioni e strumenti di contatto e disseminazione.

Dalle attività svolte in questo progetto è stato possibile presentare un lavoro sul *D. catalinae*. La presentazione dal titolo "The *Aleurocanthus spiniferus* (OSW) in Europe: a becoming invasive threat to citrus also" (Nugnes *et al.*, 2018) è stata discussa al 53rd Croatian and 13th International Symposium of Agriculture 2018 tenutosi a Vodice in Croazia dal 18 – 23 febbraio 2018.

Inoltre è in fase di scrittura un articolo scientifico sull'allevamento con dieta artificiale di *Zelus*.

L'obiettivo sarà quello di trasferire le informazioni e il Know-how Il parametro di valutazione di tale obiettivo sarà il numero dei partecipanti ai vari workshop e visualizzazioni del sito. Collaboratori e utenti che hanno attivamente partecipato alla disseminazione dei risultati di progetto sono opportunamente riconosciuti nelle varie authorship.

Azione 4 Il coordinamento e il controllo del progetto sono stati condotti durante la durata del progetto con la verifica del dettaglio e della consistenza delle attività svolte. La propagazione del materiale esplicitamente pubblicato come finanziato dal progetto o dichiaratamente attribuito all'attività di progetto *ex ante* gli atti formali di inizio progetto è e resta pubblicato sul sito web (www.insettidannosi.org). Fraintendimenti ed errori sono da attribuire al responsabile scientifico, che può essere informato attraverso il modulo del sito a: www.alien-invasive-quarantine-pest.org/contact-me.

2. AGGIORNAMENTO DELLE PREVISIONI DI COSTO

A cura di Agriplan

voce di spesa	BUDGET RIMODULATO 2018	SPESE SOSTENUTE COBIAS
Personale	€ 92.326,86	€ 94.683,33
Materiale durevole		
Materiale di consumo	€ 433,1	€ 433,11
Servizi e consulenze	€ 30.000,00	€ 30.000,00
Missioni – rimborsi spese	€ 840,04	€ 840,04
Spese generali	€ 10.000,00	€ 9.000,00
TOTALE SPESE PREVISTE	€ 133.600,00	€ 134.956,48

Costi in Migliaia di Euro

DATA,

FIRMA

Responsabile Scientifico del progetto di cooperazione

