

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e
Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

**Prime indagini sul parassitoide oofago *Platystethynium
triclavatum* (Hymenoptera, Mymaridae) e sul suo possibile
ruolo nel controllo degli outbreaks di *Barbitistes vicetinus***

Relatore:
Prof. Luca Mazzon
Correlatore:
Dott. Giacomo Ortis

Laureando:
Paolo Zennaro
Matricola 1203117

Anno Accademico 2021-2022

Indice

Riassunto	p.5
1. Introduzione	p.7
2. Scopo della Tesi	p.10
3. Materiali e Metodi	p.11
3.1. Specie Ospiti utilizzate per i Test	p.12
a) <i>Barbitistes vicetinus</i>	p.12
b) <i>Pholidoptera aptera</i>	p.13
3.2. Longevità a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura)	p.13
3.3. Entità della parassitizzazione	p.14
3.4. Numero di individui che possono potenzialmente svilupparsi a spese di un singolo uovo parassitizzato	p.17
3.5. Analisi dei Dati	p.18
4. Risultati ed Analisi dei Dati	p.19
4.1. Longevità degli Individui	p.19
a) Longevità a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura) in cella climatica	p.20
b) Longevità a condizioni di allevamento non controllate	p.27
c) Longevità dei due sessi a condizioni di allevamento non controllate a confronto	p.29
4.2. Prova di Parassitizzazione	p.32
a) Entità dalla parassitizzazione a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura): prove non choice	p.32
b) Entità dalla parassitizzazione: prove "choice" per la preferenza dello stadio dell'uovo	p.36
c) Entità dalla parassitizzazione: capacità di deporre all'interno di più uova	p.38
d) Preferenza per la specie ospite valutata con prove "choice" e "no choice"	p.39

4.3.	Numero di individui che possono potenzialmente svilupparsi a spese di un singolo uovo parassitizzato e <i>sex ratio</i>	p.40
4.4.	Altre osservazioni	p.42
5.	Prospettive Future	p.44
6.	Conclusione	p.46
	Bibliografia	p.48

Abstract

The term "biological control" means "*the use of living organisms to reduce the population density or the impact of a specific pest, making it less abundant or less harmful than it could otherwise be*". The recent discovery of the parasitic activity of *Platystethynium triclavatum* against *Barbitistes vicetinus* is particularly interesting. In addition to some biological parameters, it was decided to investigate the relationship between the parasitoid and *B. vicetinus*. In order to determine the specificity or not of the parasitization relationship, *Pholidoptera aptera*'s eggs were also used. The data obtained suggests that *P. triclavatum* feeds during its short adult life (1-8 days depending on the temperature) despite its strongly reduced mouthparts. The highest parasitization level (45.76%) were obtained at 20° C. The parasitization levels of the tests at uncontrolled temperature (22-24° C) were found to be quite variable. None of the *P. aptera* eggs used were parasitized. Despite the persistence of some gaps, *P. triclavatum* appears to be a good candidate for the biocontrol of *B. vicetinus*.

Riassunto

Con il termine "lotta biologica" si intende «*l'utilizzo di organismi viventi per ridurre la densità di popolazione o l'impatto di una specifica specie nociva, rendendola meno abbondante o meno dannosa di quanto potrebbe altrimenti essere*». Di particolare interesse è risultata la recente scoperta dell'attività parassitaria nei confronti di *Barbitistes vicetinus* di *Platystethynium triclavatum*. Oltre ad alcuni parametri biologici, si è deciso di investigare i rapporti tra il parassitoide e *B. vicetinus*. Al fine di determinare la specificità o meno del rapporto di parassitizzazione sono state utilizzate anche uova di *Pholidoptera aptera*. I dati ottenuti suggeriscono che *P. triclavatum* si nutra nell'arco della sua breve vita adulta (1-8 giorni a seconda della temperatura) nonostante il suo apparato boccale fortemente ridotto. I livelli di parassitizzazione più elevati (45,76%) si sono ottenuti con cella climatica a 20°C. I livelli di parassitizzazione delle prove a temperatura non controllata (22-24°C) sono risultati alquanto variabili. Nessuna delle uova di *P. aptera* utilizzate è risultata parassitizzata. Nonostante la permanenza di alcune lacune, per cui si auspicano future prove ulteriori, *P. triclavatum* sembra essere un buon candidato per il biocontrollo di *B. vicetinus*.

1. Introduzione

Con il termine "lotta biologica" si intende «l'utilizzo di organismi viventi per ridurre la densità di popolazione o l'impatto di una specifica specie nociva, rendendola meno abbondante o meno dannosa di quanto potrebbe altrimenti essere».¹ Il suo utilizzo, sia singolarmente che all'interno di programmi di difesa integrata, sta man mano aumentando come conseguenza di diverse necessità che sono insorte negli anni a livello ambientale (necessità di riduzione dell'utilizzo dei fitofarmaci per contenerne gli effetti dannosi sull'ambiente²), sociale-sanitario (aumentata sensibilità di parte della popolazione alle tematiche ambientali; diffidenza e percezione di un rischio elevato per la propria salute), economico (non sempre l'elevato costo di composti fitosanitari viene compensato dai risultati ottenuti) e scientifico (appare sempre più difficile la scoperta di nuove molecole da utilizzare nei programmi di lotta).

Per quanto riguarda il biocontrollo degli Orthoptera numerosi sono gli esempi, a livello globale, di piani di lotta che sfruttano l'utilizzo di organismi appartenenti a diversi ordini che si potrebbero citare: nematodi per il controllo del grillotalpa (*Gryllotalpa gryllotalpa*, L.) in Egitto³, i funghi *Paranosema locustae* (Canning, 1953) e *Beauveria bassiana* ((Bals.) Vuill., 1912) negli Stati Uniti, diverse specie del genere *Metarhizium* in Africa ed Australia⁴, e molti altri.

Nonostante l'ampia disponibilità di antagonisti, non sempre questi sembrano però essere utilizzabili con successo su larga scala³, per cui risulta necessario proseguire con la ricerca di nuove specie più efficienti sotto questo aspetto, considerato anche l'impatto che possono avere questi insetti sulle colture e sulle aree boschive.

Anche nei nostri areali diverse specie di Orthoptera possono risultare particolarmente dannose: ne è un esempio *Barbitistes vicetinus* (Galvagni & Fontana, 1993), specie che negli ultimi anni a seguito di alcuni *outbreak* ha causato danni sia in ambito forestale che agrario⁵.

Considerando la scoperta relativamente recente della specie ed il numero ancora limitato di *outbreak* che si sono verificati fin'ora, ancora poche sono le conoscenze riguardo ad

1 Eilenberg J., Hajek A., Lomer C., 2001. Suggestion for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387–400.

2 Si veda a puro titolo d'esempio la "Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi".

3 Nouh G.M., Adly D., 2021. Evaluation of the virulence of entomopathogenic nematodes as a biological control agents against *Gryllotalpa gryllotalpa* (Gryllotalpidae). *Journal of Applied Entomology*. 2021;00:1–7

4 Dakhel W.H., Jaronski S.T., Schell S., 2020. Control of Pest Grasshoppers in North America. *Insects* 2020,11, 566.

5 Mazzon, L., Tirello, P., Mori, N., Fontana, P. & Rosa, R. (2011) Esplosioni demografiche di *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae) in Veneto. XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Atti, 228 pp., Genova, Italy.

eventuali agenti di biocontrollo.

Di particolare interesse è risultata la recente scoperta dell'attività parassitaria nei confronti di questa specie di *Platystethynium triclavatum* (Donev & Huber, 2002)⁶, in grado di parassitizzarne le uova.

Platystethynium triclavatum (Donev & Huber, 2002) è un imenottero mimaridae del quale, fino a pochi anni fa, si conoscevano solamente esemplari di sesso femminile. Recentemente è stato scoperto anche il maschio, sfarfallato da alcune uova di *Barbitistes vicetinus*, ed in seguito a ciò si è proceduto con una ri-descrizione della specie.

Le femmine, alate, presentano una lunghezza variabile tra 0,8-0,88mm, apparato boccale fortemente ridotto ed un ovopositore di circa 0,3mm.

I maschi, atteri, si distinguono per una lunghezza maggiore, 0,99-1,08mm, antenne più corte rispetto a quelle degli esemplari femminili, capo e mandibole di grandi dimensioni. Specie arrenotoca, la *sex ratio* è fortemente sbilanciata a favore delle femmine.

La fecondazione sembra avvenire quando gli esemplari si trovano ancora all'interno dell'uovo dell'ospite.

Giunti a maturità gli adulti sfarfallano dall'uovo parassitizzato uscendo da alcuni fori creati dai maschi. Da ogni uovo possono sfarfallare fino a più di un centinaio di esemplari. Una volta sfarfallate, le femmine iniziano la ricerca di uova da parassitizzare nelle



Immagine 1.1: femmina di *P.triclavatum* intenta a saggiare un uovo con il suo ovopositore

6 Ortis G., Triapitsyn S.V., Cavaletto G., Martinez-Sañudo I., Mazzon L., 2020. Taxonomic identification and biological traits of *Platystethynium triclavatum* (Donev & Huber, 2002), comb. n. (Hymenoptera, Mymaridae), a newly recorded egg parasitoid of the Italian endemic pest *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae). PeerJ 8:e9667 DOI 10.7717/peerj.9667

vicinanze. Compie una generazione l'anno.

La specie sembra essere presente, oltre che nell'areale dei Colli Euganei, anche in alcune aree della Bulgaria e della Repubblica Ceca. Gli esemplari di queste zone presentano delle lievi differenze fenologiche, probabilmente dovute in parte anche a fattori ambientali ed alle specie ospiti, al momento non ancora identificate. Per quanto riguarda la popolazione dei Colli Euganei, l'unico ospite attualmente conosciuto risulta essere *B. vicetinus*.

Si è deciso di investigare i rapporti tra il parassitoide e *B. vicetinus* per identificare le modalità e le condizioni ambientali nelle quali avviene la parassitizzazione.

2. Scopo della Tesi

Il Parassitoide *P. triclavatum* è una specie nota solo dal punto di vista sistematico. Ad oggi, infatti, nulla è conosciuto circa la biologia e l'etologia di questo parassitoide oofago.

Con questo lavoro si è voluto indagare per colmare queste lacune anche nell'ottica di un suo possibile impiego nel controllo biologico di pullulazioni di ortotteri.

Nella tesi si sono in particolare studiati i seguenti aspetti:

- longevità a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura);
- entità della parassitizzazione a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura);
- preferenza per la specie ospite, valutata con prove "*choice*" e "*no choice*";
- preferenza per lo stadio dell'uovo ospite, valutata con prove "*choice*" e "*no choice*";
- approfondimento su alcuni aspetti della biologia della specie, quali:
 - capacità di parassitizzazione di più uova da parte di una singola femmina;
 - numero di individui che possono potenzialmente svilupparsi a spese di un singolo uovo parassitizzato;
 - *sex ratio*.

3. Materiali e metodi

Per le diverse prove effettuate sono stati utilizzati, in diverse combinazioni tra loro:

- individui di *P. triclavatum* neosfarfallati (approssimativamente 1-12h dallo sfarfallamento), ottenuti da uova di *B. vicetinus* parassitizzate lo scorso anno rinvenute in diverse aree dei Colli Euganei. Ai diversi individui è stato attribuito un codice alfanumerico facente riferimento al luogo di rinvenimento dell'uovo parassitizzato ed all'evento di sfarfallamento;
- uova di *B. vicetinus* in diapausa iniziale rinvenute in diverse località dei Colli Euganei;
- uova di *B. vicetinus* neodeposte (massimo 2 giorni) da individui allevati presso le serre-laboratorio del Campus di Agripolis dell'Università di Padova a Legnaro (Pd);
- uova di *P. aptera* neodeposte (massimo 2 giorni) da individui allevati presso le serre-laboratorio del Campus di Agripolis dell'Università di Padova a Legnaro (Pd).



Immagine 3.1: alcune delle uova di *B. vicetinus* utilizzate nelle prove di laboratorio



Immagine 3.2: alcune delle uova di *P. aptera* utilizzate nelle prove di laboratorio

Prima di passare alla descrizione delle singole prove svolte, sembra doveroso riportare una breve descrizione delle due specie di Orthoptera utilizzate.

3.1 Specie ospiti utilizzate per i test

3.1.a *Barbitistes vicetinus*

Barbitistes vicetinus (Galvagni & Fontana, 1993) è un ortottero tettigonide diffuso in alcune aree del nord-est d'Italia, in particolare nei Colli Berici e nei Colli Euganei. Specie molto rara, è stata descritta per la prima volta nel 1993⁷.

È specie univoltina che sverna come uovo nel terreno. È possibile osservare una diapausa che può durare per più anni⁸. La schiusa avviene in primavera, tra i mesi di marzo ed aprile, mentre la deposizione delle uova avviene tra i mesi di giugno e luglio.

È specie ampiamente polifaga, ma sembra preferire essenze boschive come orniello (*Fraxinus ornus*, L.) e roverella (*Quercus pubescens*, Willd., 1805).

In caso di *outbreak* (il primo è stato segnalato nel 2008), può spostarsi alla ricerca di cibo anche al di fuori dell'area boschiva, andando ad infestare frutteti e vigneti⁹.

Proprio questo ultimo aspetto può far sì che *B. vicetinus* possa risultare, in caso di infestazioni di particolare intensità, dannoso economicamente per le aree coltivate in prossimità del suo habitat naturale, motivo per cui si stanno valutando diversi metodi di lotta all'insetto, in particolare quello di lotta biologica che verrà di seguito riportato.



Immagine 3.3: esemplare adulto di *B. vicetinus*

7 Galvagni A., Fontana P., 1993. *Barbitistes vicetinus* sp.n. dell'Italia nord-orientale (Insecta, Orthoptera, Tettigoniidae). Atti dell'Accademia Roveretana degli Agiati, A,242, 1992, Ser. VII, Vol. II, B, 199–206.

8 Cavaletto G., Faccioli M., Marini L. e Mazzon L., 2019. Emergence phenology and temperature effect on the post-diapause egg development in the bush cricket *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae). Bulletin of Entomological Research (2020) 110, 161–168.

9 Mazzon, L., Tirello, P., Mori, N., Fontana, P. & Rosa, R. (2011) Esplosioni demografiche di *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae) in Veneto. XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Atti, 228 pp., Genova, Italy.

3.1.b *Pholidoptera aptera*¹⁰

Pholidoptera aptera (Fabricius, 1793) è un ortottero tettigonide ampiamente diffuso a livello europeo, in particolare in Italia e nei paesi dell'Est Europa, negli areali montani e submontani. Colonizza solitamente le aree marginali e cespugliose dei boschi.

Attualmente non sembrano essere disponibili studi approfonditi sulla biologia e l'ecologia di questa specie.

La specie è stata scelta come possibile ospite alternativo da testare in quanto risulta essere attiva in un periodo parzialmente coincidente con la presenza di *B. vicetinus* (da fine giugno a metà settembre) e nei medesimi areali dello stesso (Colli Berici e Colli Euganei).

3.2 Longevità a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura)

Per questa prova sono stati utilizzati 180 individui di *P. triclavatum* (femmine) neosfarfallati.

Le prove sono state condotte all'interno di boccette cilindriche di plastica trasparente, di 9,5cm di altezza e 3,5cm di diametro, con tappo presentante un'apertura ricoperta da una rete a maglia stretta, atta a favorire la circolazione dell'aria ed impedire la fuga degli insetti.

Ogni individuo vi è stato posto all'interno assieme ad un pezzo di carta assorbente, giornalmente inumidito al fine di mantenere l'umidità interna costante. La prova è avvenuta inserendo un uovo di *B. vicetinus* neodeposto.

Per quanto riguarda la dieta, a metà degli individui è stata fornita solamente acqua, giornalmente apposta tramite l'utilizzo di una pipetta in 1-2 goccioline sulla rete presente sul tappo, mentre all'altra metà è stato fornito del miele, sempre depositato sulla rete.

Infine gli individui sono stati divisi in tre gruppi e riposti in tre celle climatiche ad umidità costante (60% UR) ed a tre temperature: 15°C, 20°C e 25°C; più precisamente:

- 61 individui, di cui 31 con dieta a base di miele e 30 a base di acqua, sono stati posti in cella climatica a 15°C;
- 59 individui, di cui 28 con dieta a base di miele e 31 a base di acqua, sono stati posti in cella climatica a 20°C;
- 60 individui, di cui 29 con dieta a base di miele e 31 a base di acqua, sono stati posti

¹⁰ IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org/species/47712216/74621887#threats>

in cella climatica a 25°C.

Ogni cella climatica è stata fornita di una luce regolabile tramite timer al fine di simulare un fotoperiodo di 12h/d, considerato che il periodo dell'anno in cui questi insetti si trovano a sfarfallare fornisce un fotoperiodo di durata simile.

Ogni 24h le boccette sono state controllate visivamente al fine di verificare la sopravvivenza degli individui.

Gli esemplari morti sono stati riposti, divisi per sito di provenienza, in provette contenenti alcool assoluto, per poter poi essere conservati ed utilizzati per eventuali analisi genetiche.

Una volta terminato l'esperimento le uova di *B. vicetinus*, avvolte da un retino a maglia stretta, opportunamente contrassegnate per dieta e temperatura della cella climatica, sono state riposte ad una profondità di alcuni centimetri (circa 10cm) nel terreno in un'area alberata all'interno del Campus di Agripolis, Legnaro, Padova, al fine di simulare una situazione ambientale naturale nella quale si dovrebbero venire a trovare le uova, in attesa di verificare il grado di parassitizzazione.



Immagine 3.4: Boccette pronte per essere poste in cella climatica

3.3 Entità della parassitizzazione

Per ottenere il livello di parassitizzazione sono stati utilizzati 517 individui, di cui 493 femmine e 24 maschi.

I maschi in questione sono stati posti uno per boccetta assieme ad una femmina ciascuno al fine di valutare un eventuale aumento dell'attività di ovideposizione di queste ultime rispetto alle femmine poste singolarmente all'interno delle boccette e quindi indirettamente una eventuale fecondazione esterna all'uovo dal quale gli individui sono sfarfallati, considerato che, stando a quanto riportato da Ortis *et al.* (2020), questa sembrerebbe

avvenire prima dell'evento di sfarfallamento e quindi internamente all'uovo di *Barbitistes*.

Ogni individuo (o coppia di individui) è stato posto all'interno di una boccetta assieme ad un pezzo di carta assorbente, giornalmente inumidito al fine di tenere l'umidità interna costante, e ad un uovo di *B. vicetinus*. Sono state utilizzate sia uova neodeposte che uova in diapausa iniziale. Tutte le prove sono state condotte a temperatura ambiente non controllata (22-24°C) e con dieta a base di acqua.

Alcune prove hanno invece previsto l'utilizzo di:

- uova di *B. vicetinus* neodeposte (massimo 2 giorni) ed in diapausa iniziale, al fine di valutare eventuali preferenze per quanto riguarda l'età delle uova nelle quali la femmina deciderà di ovideporre;
- uova di *P. aptera* neodeposte (massimo 2 giorni), al fine di valutare la capacità o meno di parassitizzare uova di altri Orthoptera;
- uova di *B. vicetinus* e di *P. aptera*, al fine di valutare una eventuale preferenza da parte del parassitoide della specie da parassitizzare.

Più precisamente, le prove sono state impostate come di seguito riportato:

- **Prova A1**, iniziata in data 21/06/21, in cui è stata utilizzata una femmina a cui è stato fornito un uovo neodeposto di *B. vicetinus*, per un totale di 92 repliche;
- **Prova B1**, iniziata in data 22/06/21, in cui è stata utilizzata una femmina a cui sono state fornite due uova, una di *B. vicetinus* in diapausa iniziale ed una neodeposta, per un totale di 34 repliche;
- **Prova C**, iniziata in data 22/06/21, in cui sono stati utilizzati un maschio ed una femmina a cui sono state fornite due uova, una di *B. vicetinus* in diapausa iniziale ed una neodeposta, per un totale di 3 repliche;
- **Prova D**, iniziata in data 22/06/21, in cui è stata utilizzata una femmina a cui sono state fornite due uova, una di *B. vicetinus* neodeposta ed una di *P. aptera* neodeposta, per un totale di 52 repliche;
- **Prova E**, iniziata in data 22/06/21, in cui sono stati utilizzati un maschio ed una femmina a cui sono state fornite due uova, una di *B. vicetinus* neodeposta ed una di *P. aptera* neodeposta, per un totale di 21 repliche;

Ogni 24h le boccette sono state controllate visivamente al fine di verificare la sopravvivenza degli individui. Gli esemplari deceduti sono stati riposti, divisi per sito di provenienza, in provette contenenti alcool assoluto, per poter poi essere conservati ed utilizzati per eventuali analisi genetiche.

Parallelamente a queste prove ne sono state impostate delle altre analoghe, durante le quali però, per motivi organizzativi, non è stato possibile rilevare la durata di vita degli insetti utilizzati. In particolare queste prove consistevano in:

- **Prova A2**, in cui è stata utilizzata una femmina a cui è stato fornito un uovo di *B. vicetinus* neodeposto, per un totale di 102 repliche;
- **Prova B2**, in cui è stata utilizzata una femmina a cui sono state fornite due uova, una di *B. vicetinus* in diapausa iniziale ed una neodeposta, per un totale di 77 repliche;
- **Prova F**, in cui è stata utilizzata una femmina a cui è stato fornito un uovo di *P. aptera* neodeposto, per un totale di 20 repliche;
- **Prova G**, in cui è stata utilizzata una femmina a cui sono state fornite due uova di *B. vicetinus* neodeposte, per un totale di 62 repliche;
- **Prova H**, in cui è stata utilizzata una femmina a cui è stato fornito un uovo di *B. vicetinus* in diapausa iniziale, per un totale di 30 repliche.

Una volta terminato l'esperimento le uova delle prove in cui queste venivano testate singolarmente sono state sotterrate come già riportato nel paragrafo 3.2.

Le uova delle prove in cui queste venivano utilizzate a coppie (quindi le prove B1, C, D, E, B2 e G), al fine di poter essere analizzate in base alla replica di provenienza, sono state

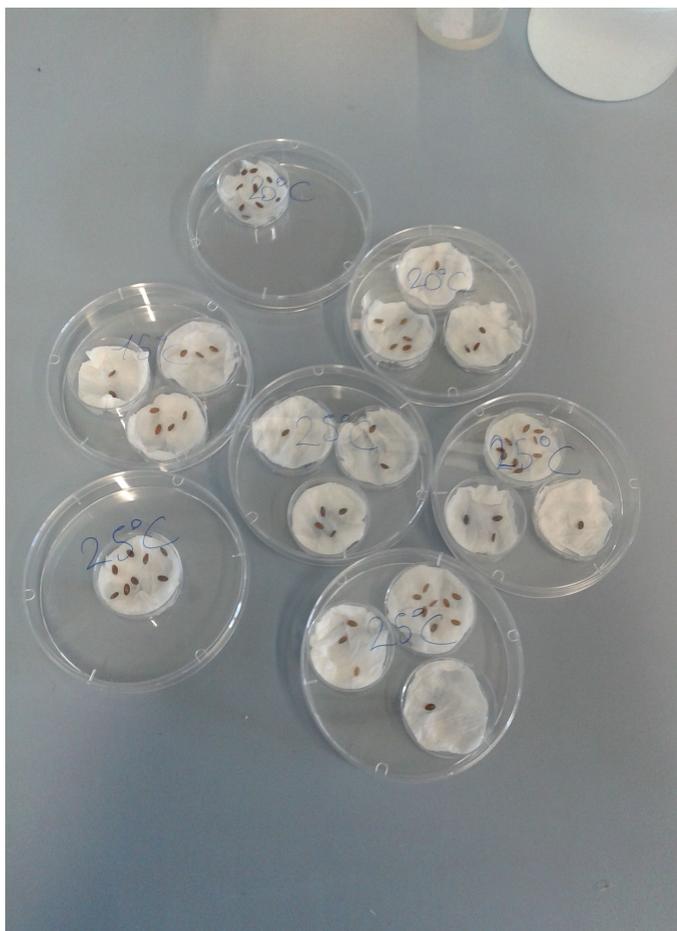


Immagine 3.5: uova utilizzate nelle diverse prove in attesa di essere interrate

poste in un contenitore per provette in polistirolo forato da ambo i lati e ricoperto da una rete a maglia stretta; le uova di ogni singola replica sono state poste nello stesso pozzetto nei casi in cui queste appartenessero alle due specie di Orthoptera, mentre per distinguere tra le uova di *B. vicetinus* neodeposte e quelle già in diapausa iniziale, queste sono state poste in due pozzetti adiacenti contrassegnati con un codice per identificare la relativa prova.

Anche questi contenitori sono stati poi posti nel terreno assieme a quelli delle altre repliche.



Immagine 3.6: uova divise in base alla replica ed alla relativa prova in attesa di essere interrate

3.4 Numero di individui che possono potenzialmente svilupparsi a spese di un singolo uovo parassitizzato

Per ottenere una stima del numero medio di individui che possono sfarfallare da un singolo uovo parassitizzato e della loro *sex ratio*, si è proceduto alla conta degli esemplari conservati in alcool a seguito delle prove sopra descritte, ai quali si sono aggiunti eventuali individui non sfarfallati dalle relative uova parassitizzate.

A questi si sono aggiunti gli individui sfarfallati da altre uova che non sono stati

utilizzati in nessuna delle precedenti prove.

In totale sono stati contati gli individui sviluppatasi da 24 uova di *B. vicetinus*, parassitizzate la stagione precedente a quella in cui sono stati eseguiti i rilevamenti ed in ambiente naturale.

Si è inoltre proceduto alla conta dei fori di sfarfallamento tramite osservazione al microscopio.

3.5 Analisi dei Dati

Per l'analisi dei dati riguardanti le curve di sopravvivenza in base alle diverse temperature è stato utilizzato il metodo Kaplan-Meier¹¹.

Come si sarà notato, le diverse prove sono state svolte con numerosità degli individui utilizzati diverse.

Per quanto riguarda le prove in cella climatica ciò è dovuto a degli errori durante lo spostamento delle boccette dal laboratorio alle celle climatiche.

Per quanto riguarda invece le prove effettuate a temperatura ambiente, le prove sono risultate con un numero di repliche diverso l'una dall'altra a causa della imprevedibilità del momento dello sfarfallamento dalle uova parassitizzate e del numero di esemplari sfarfallati: si è deciso di utilizzare tutti gli esemplari disponibili al fine di raccogliere una maggiore quantità di dati anche se ciò ha reso in parte più complesso la loro analisi.

Per analizzare i dati ottenuti sono stati utilizzati i seguenti metodi¹²:

- per il confronto dell'aspettativa di vita media tra le varie prove si è scelto di utilizzare due vie:
 - l'utilizzo di un test F ($F = \sigma^2_{\text{Maggiore}} / \sigma^2_{\text{Minore}}$) seguito da un test z ($z = (x_1 - x_2) / \text{errore standard}$); nei casi in cui F calcolato fosse risultato superiore ad F tabulare (con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$) non si è proceduto a nessun ulteriore controllo, in quanto questo indica già la presenza di differenze significative. Nei casi in cui invece questo fosse risultato inferiore, si è proceduto con il calcolo di z, confrontando il valore ottenuto con quello di z tabulare con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$.

11 Tripepi G., Gatalano F., 2004. L'analisi di sopravvivenza con il metodo Kaplan-Meier. *Giornale Italiano di Nefrologia*, Anno 21, pp 540-546.

12 Fowler J., Cohen L.. *Statistica per ornitologi e naturalisti*. Franco Muzzio Editore, Roma 2010.

- l'utilizzo del test di Analisi della Varianza (ANOVA) seguito dal test di Tukey;
- per il confronto del tasso di parassitizzazione tra le varie prove si è utilizzato il test del χ^2 con tabella di contingenza.

Al fine di ottenere un risultato il più preciso possibile, si è deciso di esprimere l'aspettativa di vita degli individui in ore.

Per quanto riguarda il confronto tra aspettativa di vita in base al sesso, si è deciso di confrontare i dati ottenuti dagli esemplari maschi solamente con quelli ottenuti dalle femmine utilizzate nelle stesse prove, al fine di escludere la possibilità che il risultato venisse in qualche modo alterato da uno qualsiasi tra i parametri considerati che potesse risultare diverso nelle altre prove.

4. Risultati ed Analisi dei dati

4.1 Longevità degli individui

Vengono di seguito riportati i dati relativi alla longevità degli individui rilevata sia nelle prove svolte in cella climatica, sia delle prove svolte in condizioni non controllate di temperatura (da A1 ad E). Si è deciso di analizzare anche questi dati nonostante la longevità degli individui non fosse lo scopo primario di queste ultime prove al fine di ottenere uno spettro d'informazioni più ampio riguardo all'influenza che l'ambiente può avere sulla vita di questi imenotteri.

4.1.a Longevità a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura) in cella climatica

L'esperimento ha avuto inizio in data 08/06/2021 ed è terminato il 16/06/2021, per un totale di 8 giorni.

Gli individui tenuti in cella climatica a 25°C risultavano già tutti deceduti al 12/06/2021 (4° giorno), mentre quelli tenuti a 20°C e 15°C sono sopravvissuti rispettivamente fino al 15/06/2021 (7° giorno) ed al 16/06/2021 (8° giorno).

Il 13/06/2021 (una domenica, corrispondente al controllo a 120h) non sono stati effettuati controlli, sono stati calcolati quindi dei valori medi tra quelli del giorno precedente e del giorno successivo al fine di ottenere un quadro generale completo e plausibile che rappresentasse al meglio l'andamento della sopravvivenza del campione.

13 individui, distribuiti tra le tre prove, sono stati ritrovati deceduti invischiati nella goccia di miele o di acqua che era stata posta sul tappo: nonostante non siano deceduti per morte naturale, i loro decessi sono comunque stati valutati analogamente agli altri.

Al controllo non è stato possibile invece reperire, sempre distribuiti nelle tre prove, 23 individui: si presume che, viste le ridotte dimensioni degli insetti, questi siano riusciti a farsi strada nello spazio che intercorre tra la boccetta ed il tappo e, al momento dell'apertura della boccetta per il controllo, siano stati schiacciati e sia stato quindi impossibile rinvenirne i resti. Anche le loro morti sono state valutate analogamente alle altre.

Nelle seguenti tabelle vengono riportati i dati rilevati direttamente in cella climatica relativi alla sopravvivenza giornaliera alle diverse temperature:

	15°C					
	Miele		H ₂ O		Totale	
	Vivi	Morti	Vivi	Morti	Vivi	Morti
0h	31		30		61	
24h	30	1	24	6	54	7
48h	27	4	18	12	45	16
72h	16	15	13	17	29	32
96h	3	28	2	28	5	56
120h	3	28	1,5	28,5	4,5	56,5
144h	3	28	1	29	4	57
168h	3	28	0	30	3	58
192h	0	31	-	-	0	61

Tabella 4.1: dati relativi alla sopravvivenza degli individui posti in cella climatica a 15°C.

	20°C					
	Miele		H ₂ O		Totale	
	Vivi	Morti	Vivi	Morti	Vivi	Morti
0h	28		31		59	
24h	25	3	27	4	52	7
48h	16	12	18	13	34	25
72h	7	21	5	26	12	47
96h	0	28	2	29	2	57
120h	-	-	1,5	29,5	1,5	57,5
144h	-	-	1	30	1	58
168h	-	-	0	31	0	59

Tabella 4.2: dati relativi alla sopravvivenza degli individui posti in cella climatica a 20°C.

	25°C					
	Miele		H ₂ O		Totale	
	Vivi	Morti	Vivi	Morti	Vivi	Morti
0h	29		31		60	
24h	20	9	23	8	43	17
48h	8	21	5	26	13	47
72h	3	26	1	30	4	56
96h	0	29	0	31	0	60

Tabella 4.3: dati relativi alla sopravvivenza degli individui posti in cella climatica a 25°C.

Da notare come, a 96 ore dall'inizio della prova, gli individui posti in cella a 25°C risultino tutti deceduti, mentre nelle celle a 20°C e 15°C si rilevi una sopravvivenza rispettivamente del 3,39% e dell'8,20%.

Nei seguenti grafici vengono riportate le aspettative di vita giornaliere percentuali,

divise per temperatura e dieta somministrata, ottenute con il metodo Kaplan-Meier:

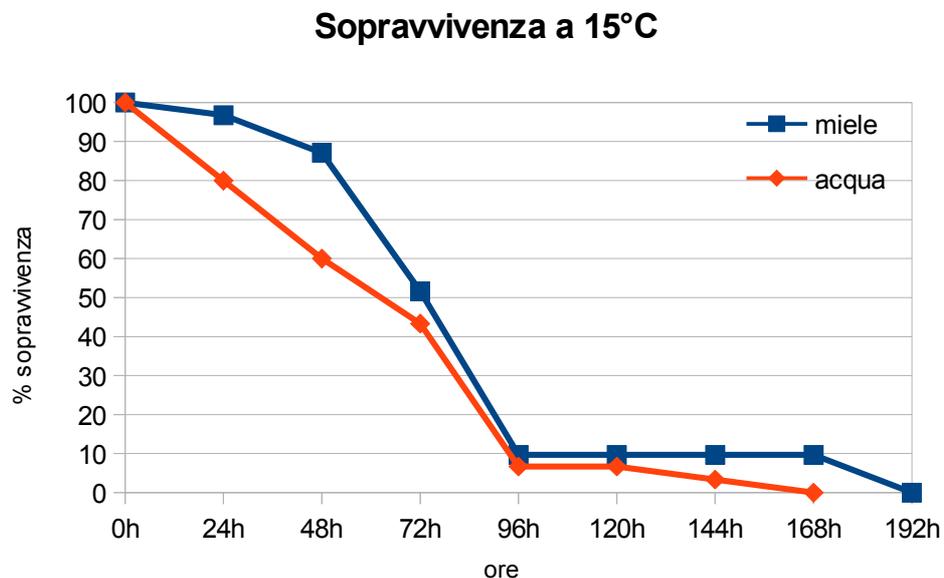


Grafico 4.1: aspettativa percentuale giornaliera di vita degli individui posti a 15°C in base alla dieta somministrata

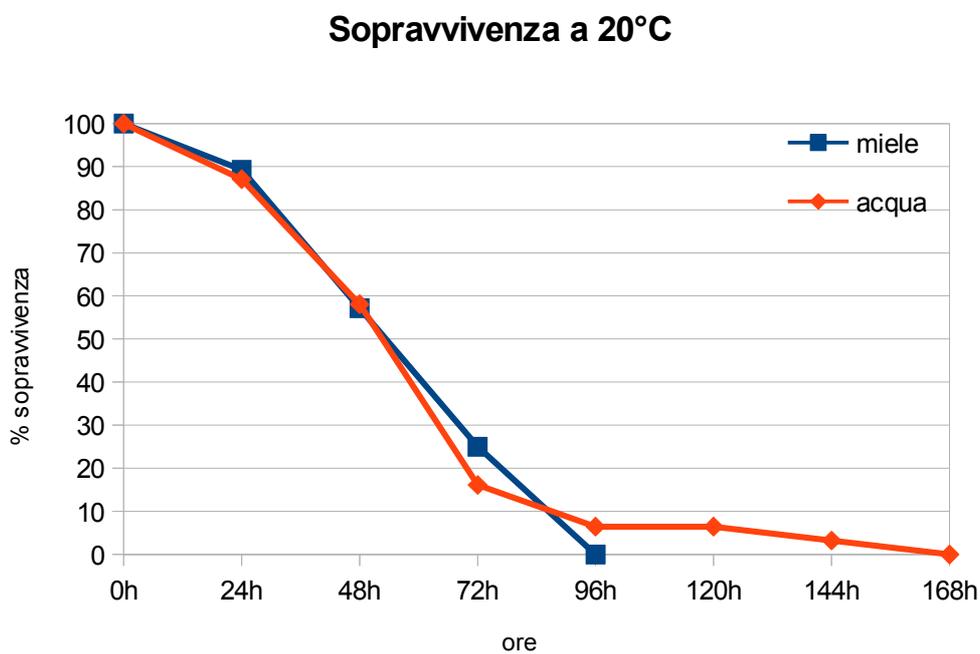


Grafico 4.2: aspettativa percentuale giornaliera di vita degli individui posti a 20°C in base alla dieta somministrata

Sopravvivenza a 25°C

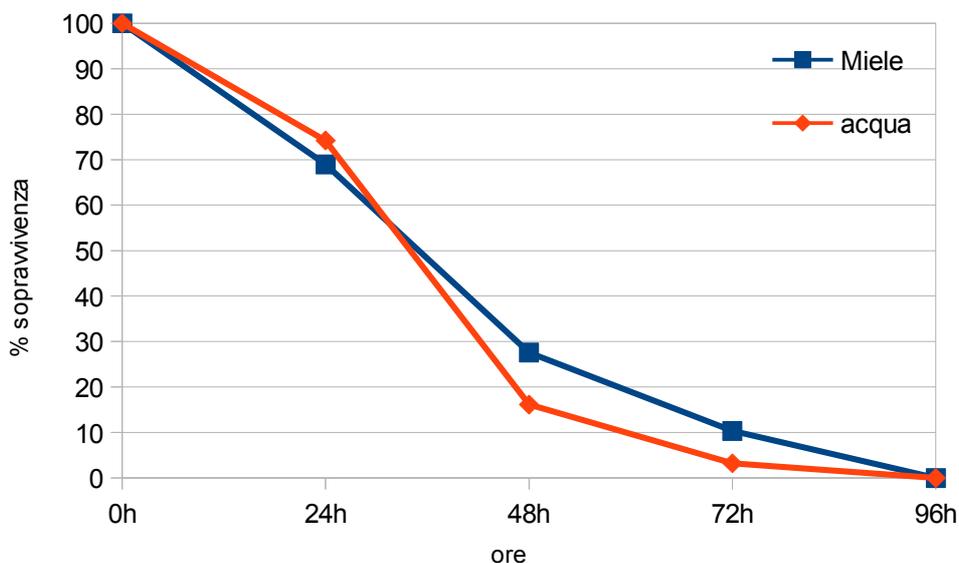


Grafico 4.3: aspettativa percentuale giornaliera di vita degli individui posti a 25°C in base alla dieta somministrata

Si può notare come le percentuali di sopravvivenza tra le due diete, indipendentemente dalla temperatura, abbiano in tutti e tre i casi un andamento molto simile, il che andrebbe apparentemente a supportare l'ipotesi che, nell'arco della sua breve vita adulta, *P. triclavatum* non si nutra.

Andiamo ora ad analizzare i dati rilevati più nel dettaglio, iniziando dall'analisi effettuata tramite **test F** ($F = \sigma^2_{\text{Maggiore}} / \sigma^2_{\text{Minore}}$) seguito da un **test z** ($z = (x_1 - x_2) / \text{errore standard}$).

I valori relativi alle aspettative medie di vita degli imenotteri espressi in ore sono riportati nella seguente tabella:

Sopravvivenza media a diverse temperature espressa in ore			
	Acqua	Miele	Totale
15°C	89,81	120	96,39
20°C	65,14	66,58	65,9
25°C	49,66	46,45	48

Tab. 4.4: aspettative medie di vita espressa in ore in base alla temperatura ed alla dieta somministrata

Vediamo ora i risultati ottenuti dall'analisi tramite test F e z.

Per quanto riguarda le differenze relative alle diete nella medesima cella climatica:

- per la cella climatica a 15°C: F calcolato risulta essere di 1,86, superiore a quello tabulare $P_{0,05}$, ma inferiore a quello tabulare con $P_{0,01}$ (rispettivamente 1,85 e 2,41, con gradi di libertà 30 e 29). Il seguente calcolo di z ha fornito un valore di 4,34, che risulta superiore a quelli tabulari (rispettivamente 1,96 e 2,58 per $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$);
- per la cella climatica a 20°C: F calcolato risulta essere di 1,80, inferiore a quello tabulare con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ (rispettivamente 1,88 e 2,47, con gradi di libertà 30 e 27). Il seguente calcolo di z ha fornito un valore di 0,2, che risulta inferiore a quelli tabulari (rispettivamente 1,96 e 2,58 per $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$);
- per la cella climatica a 25°C: F calcolato risulta essere di 1,746, inferiore a quello tabulare con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ (rispettivamente 1,85 e 2,41, con gradi di libertà 28 e 30). Il seguente calcolo di z ha fornito un valore di 0,6, che risulta inferiore a quelli tabulari (rispettivamente 1,96 e 2,58 per $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$)

I risultati ottenuti a 15°C ci suggeriscono una differenza altamente significativa tra le aspettative di vita in base alla dieta a questa temperatura, mentre a 20°C e 25°C questa differenza nel trattamento non sembra aver influito.

Per quanto riguarda il confronto tra le medie ottenute da tutte le repliche nelle diverse celle climatiche:

- confronto tra le celle climatiche impostate a 15°C e 20°C: F calcolato risulta essere di 2,18, superiore quindi a quello tabulare con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ (rispettivamente 1,54 e 1,85, gradi di libertà 60 e 58). Non risulta quindi necessario procedere con il calcolo di z: esiste una differenza statisticamente significativa: gli insetti hanno una vita media più lunga a 15°C;
- confronto tra le celle climatiche impostate a 20°C e 25°C: F calcolato risulta essere di 1,87, superiore quindi a quello tabulare con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ (rispettivamente 1,54 e 1,85, gradi di libertà 58 e 59). Nemmeno in questo caso risulta necessario procedere con il calcolo di z: esiste una differenza statisticamente significativa: gli insetti hanno una vita media più lunga a 20°C.

Passiamo ora all'analisi dei dati tramite test ANOVA, analizzando anche in questo caso dapprima i dati ottenuti da ogni singola cella climatica e poi nel complesso.

Per quanto riguarda le differenze relative alle diete nella singola cella, per la cella climatica a 15°C si ottiene un valore di 0,0002, nettamente inferiore a 0,05, mentre per le celle climatiche a 20°C e 25°C si ottengono dei valori rispettivamente di 0,8441 e 0,54, superiori quindi a 0,05.

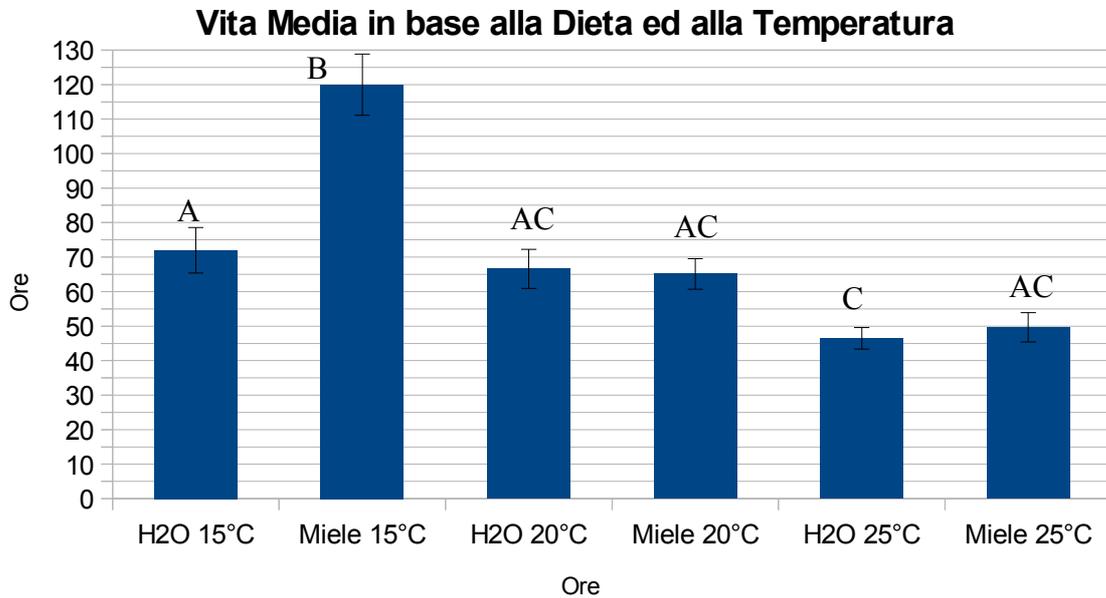


Grafico 4.4: aspettative medie di vita a diverse temperature e diete a confronto

L'analisi dei dati relativi alle diverse temperature, indipendentemente dalla dieta somministrata, ha fornito un valore di $5,69e^{-11}$, quindi più basso di 0,05, che indica la presenza di una differenza statisticamente significativa tra i tre trattamenti; il successivo test di Tukey ci conferma che i tre trattamenti sono tutti significativamente diversi l'uno dall'altro.

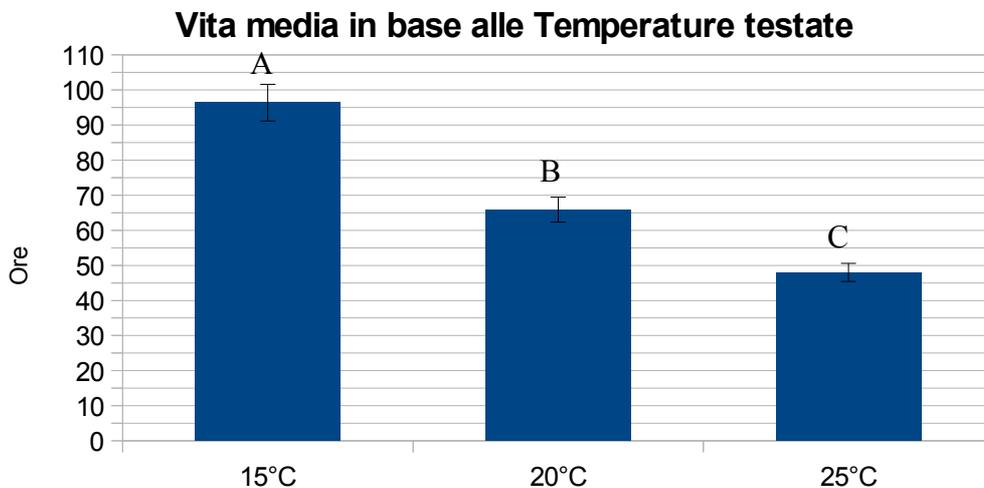


Grafico 4.5: aspettative medie di vita in base alle temperature testate

Per quanto riguarda le differenze relative alle diete indipendentemente dalla temperatura testata (per cui si hanno le medie di 61,57h per gli esemplari alimentati ad acqua e di 79,36h per quelli alimentati a miele), l'elaborazione dei dati ha fornito un valore di 0,038, nettamente inferiore a 0,05, il che indica che esiste una differenza significativa tra i due trattamenti.

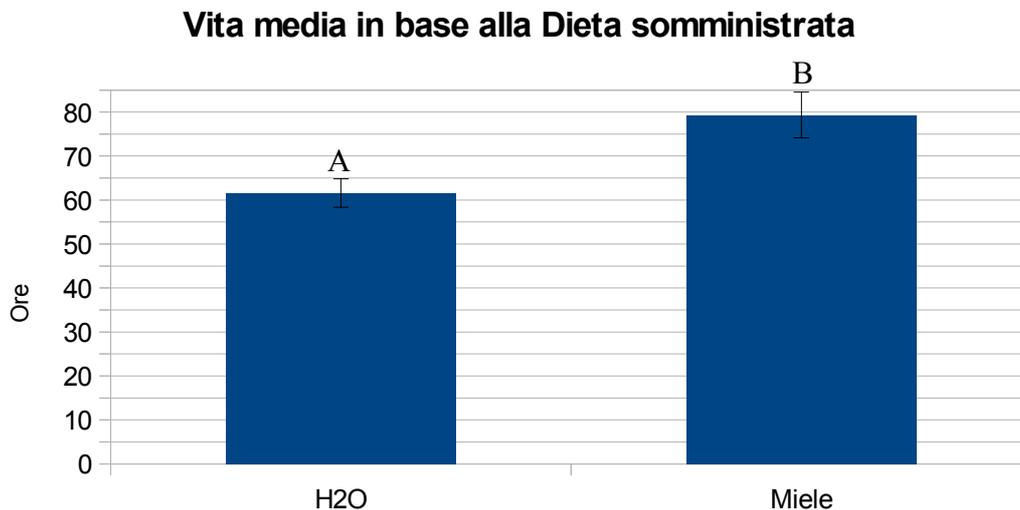


Grafico 4.6: aspettativa media di vita in base alla dieta somministrata

L'analisi tramite test ANOVA ci conferma quanto già ottenuto dall'analisi tramite il test F. A quanto pare esiste una differenza nell'aspettativa media di vita alle tre diverse temperature testate, aspettativa che aumenta al diminuire della temperatura.

Questo dato potrebbe risultare interessante in particolare nel caso in cui si dovesse programmare un allevamento in massa dei parassitoidi e la seguente loro distribuzione nell'ambiente: l'utilizzo di basse temperature potrebbe, per esempio, risultare utile nel momento in cui si dovessero trasportare gli insetti dalla località di produzione a quella di rilascio.

Per quanto riguarda la dieta, anche in questo caso sembra esserci una differenza tra i due trattamenti; gli insetti a cui viene somministrato del miele sembrano vivere più a lungo di quelli a cui viene fornita solo acqua. C'è però da dire che in realtà questa differenza sembra essere marcata solo al 15°C, mentre alle altre temperature ciò non sembra avvenire in maniera significativa: questo, accostato al fatto che le femmine sono provviste di un apparato boccale ridotto, ci porta a ritenere necessario lo svolgimento di ulteriori prove per

verificare che il risultato ottenuto sia corretto.

4.1.b Longevità a condizioni di allevamento non controllate

Ai dati sopra analizzati si possono affiancare quelli ottenuti dagli esemplari utilizzati nelle prove di parassitizzazione a temperatura ambiente (22-24°C), in particolare dalle prove A1, B1 e D.

I dati relativi alle prove C ed E, in cui erano presenti anche individui maschi, verranno trattati nel paragrafo 4.1.c.

Si noti che l'aspettativa di vita dei parassitoidi risulta essere apparentemente molto simile a quella degli insetti posti in cella climatica a 25°C, in quanto nessuna femmina supera le 96h di vita.

Di seguito vengono riportati i dati relativi alla sopravvivenza giornaliera. Considerando che le prove, se si esclude la tipologia di uovo somministrato, sono state svolte tutte alle medesime condizioni ambientali, si possono riassumere i dati rilevati in un'unica tabella per poterli poi analizzare complessivamente.

Longevità delle femmine a condizioni di temperatura non controllata								
	A1		B1		D		Totale	
	Vivi	Morti	Vivi	Morti	Vivi	Morti	Vivi	Morti
0h	92	-	34	-	52	-	178	0
24h	49	43	23	11	34	18	106	72
48h	11	81	6	28	5	47	22	156
72h	0	92	1	33	0	52	1	177
96h	-	-	0	34	-	-	0	178

Tab. 4.5: longevità delle femmine rilevata a temperatura non controllata (22-24°C) a cui è stata somministrata solamente acqua

Questi dati ci forniscono un'aspettativa media di vita espressa in ore di 41,39, inferiore addirittura alla media calcolata sui dati ottenuti a 25°C (49,66h per le femmine a cui è stata fornita solamente acqua a questa temperatura). Considerato che queste ultime prove si sono svolte ad una temperatura si variabile, ma sempre compresa tra i 20°C ed i 25°C, ci si sarebbe aspettati un valore intermedio rispetto a quelli ottenuti dalle prove in cella climatica.

Anche il calcolo della percentuale di sopravvivenza giornaliera ci fornisce un andamento

che può richiamare quello ottenuto a 25°C.

Nel seguente grafico vengono messe a confronto le percentuali di sopravvivenza delle femmine poste a 20°C, 25°C ed a temperatura non controllata.

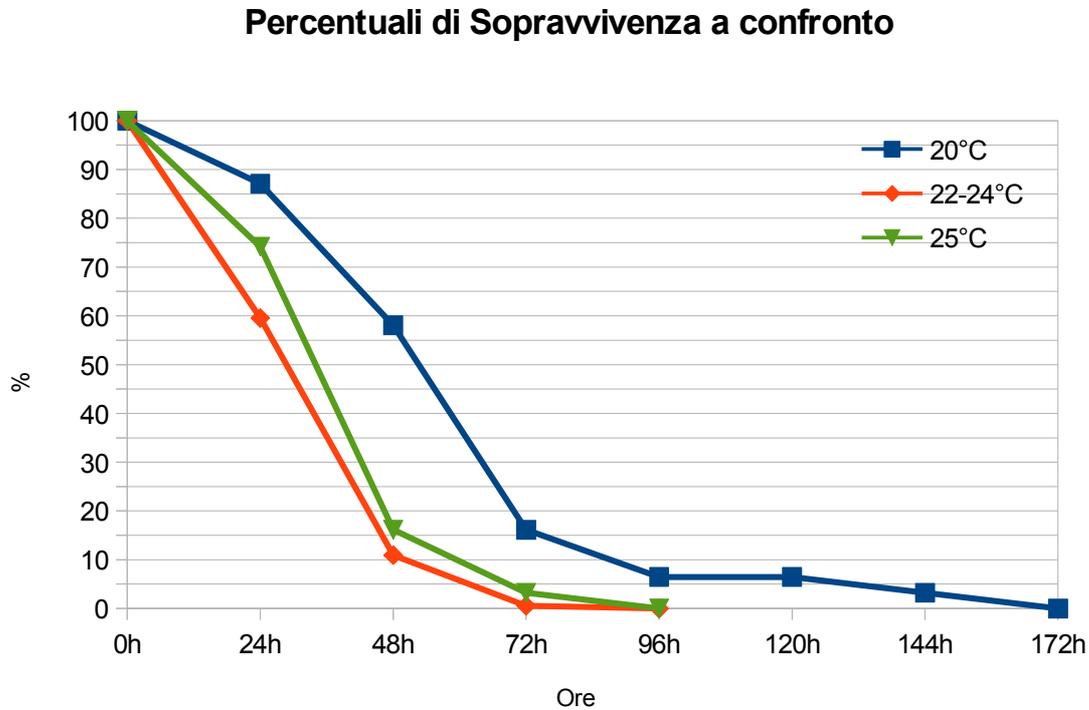


Grafico 4.7: confronto tra le percentuali di sopravvivenza delle femmine allevate a temperatura ambiente con quelle delle femmine allevate in cella climatica a 20°C e 25°C

Volendo confrontare statisticamente questi dati con quelli ottenuti dalle femmine in cella climatica a 20°C e 25°C alimentate con acqua utilizzando il test F otteniamo che:

- per quanto riguarda il confronto tra 20°C e temperatura non controllata: esiste una differenza altamente significativa tra i due trattamenti, in quanto F calcolato risulta essere 3,63, maggiore di quelli tabulari per $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ con 30 e 177 gradi di libertà (rispettivamente 1,52 ed 1,81);
- per quanto riguarda il confronto tra 25°C e temperatura non controllata: esiste una differenza significativa tra i due trattamenti, in quanto F calcolato risulta essere 1,121, inferiore rispetto a quello tabulare per $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ con 30 e 177 gradi di libertà (rispettivamente 1,52 e 1,181). Il seguente test z fornisce un valore di 1,5, inferiore quindi ai valori per $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ (rispettivamente 1,96 e 2,58): non vi è quindi differenza significativa tra le due tesi.

Andando a confrontare i risultati tramite test ANOVA si ottiene anche in questo caso che esiste una differenza tra almeno una coppia di trattamenti (in quanto il valore di P_{calc} è di $7.9803e^{-10}$, quindi inferiore a 0,05). Il successivo test di Tukey ci dice che la differenza si riscontra tra le tesi a 20°C e temperatura non controllata, mentre tra quest'ultima e 25°C non vi è alcuna differenza.

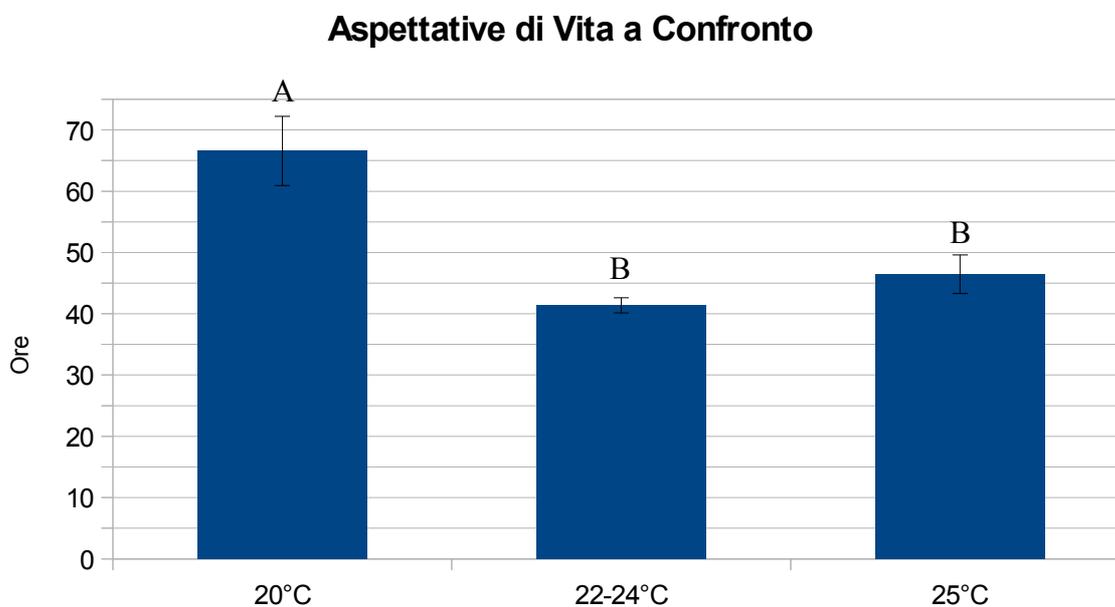


Grafico 4.8: confronto tra le aspettative medie di vita degli esemplari posti a 20°C e 25°C a cui è stata fornita solamente acqua e quelli posti a temperatura non controllata

Considerando questi risultati, appare evidente come, nel caso in cui dovesse essere per qualche motivo necessario allevare gli insetti ad una temperatura compresa tra i 22°C ed i 25°C, risulterebbe più economico il loro allevamento al di fuori di una cella climatica.

L'analisi ci rivela anche che l'*optimum* di temperatura per questi parassitoidi allo stadio adulto (considerato anche quanto riportato successivamente nel paragrafo 4.2.a) risulta essere 20°C: superata questa soglia, l'attività di questo insetto inizia subito a ridursi.

4.1.c Longevità dei due sessi a condizioni di allevamento non controllate a confronto

Nelle prove in cui sono stati utilizzati in combinazione individui di entrambi i sessi (prove C ed E), non si sono rilevate differenze che possano far pensare ad una diversa aspettativa di vita in base al sesso:

- nella prova C sia maschi che femmine risultavano tutti deceduti dopo 48 ore;
- nella prova E i maschi risultavano tutti deceduti dopo 72 ore, mentre l'ultima femmina è stata rinvenuta deceduta al controllo a 96 ore.

Di seguito vengono riportati i dati rilevati. Considerando che le prove, se si esclude la tipologia di uovo somministrato, sono state svolte tutte alle medesime condizioni ambientali, si possono riassumere i dati in un'unica tabella per poterli poi analizzare complessivamente:

Longevità dei due sessi a temperatura non controllata						
	maschi		femmine		totale	
	vivi	morti	vivi	morti	vivi	morti
0h	24		24		48	
24h	13	11	15	9	28	20
48h	2	22	2	22	4	44
72h	0	24	1	23	1	47
96h			0	24	0	1

Tab. 4.6: confronto della sopravvivenza dei due sessi a temperatura non controllata

Da questi si può calcolare un'aspettativa di vita media di 39h per i maschi e di 42h per le femmine.

L'analisi Kaplan-Meier ha fornito le seguenti percentuali di sopravvivenza giornaliera:

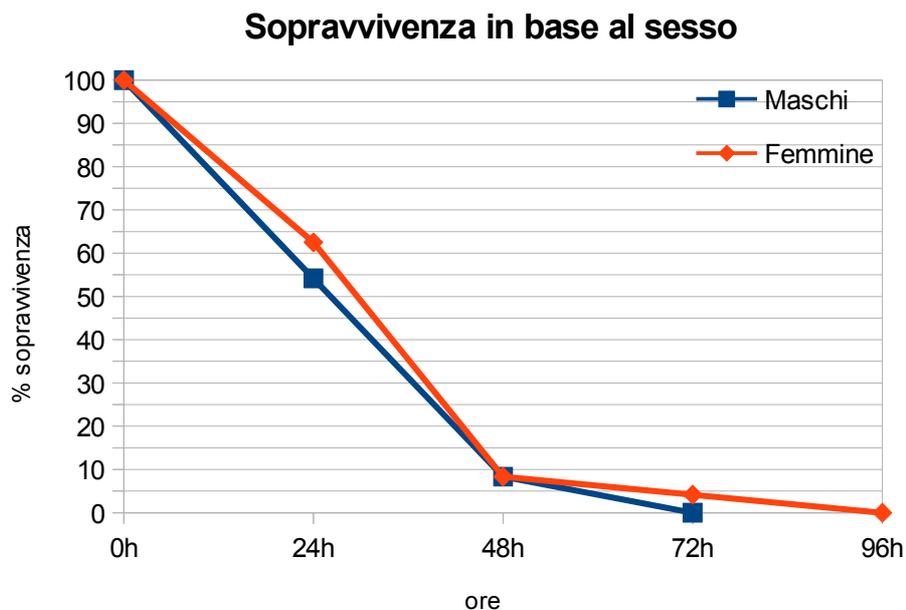


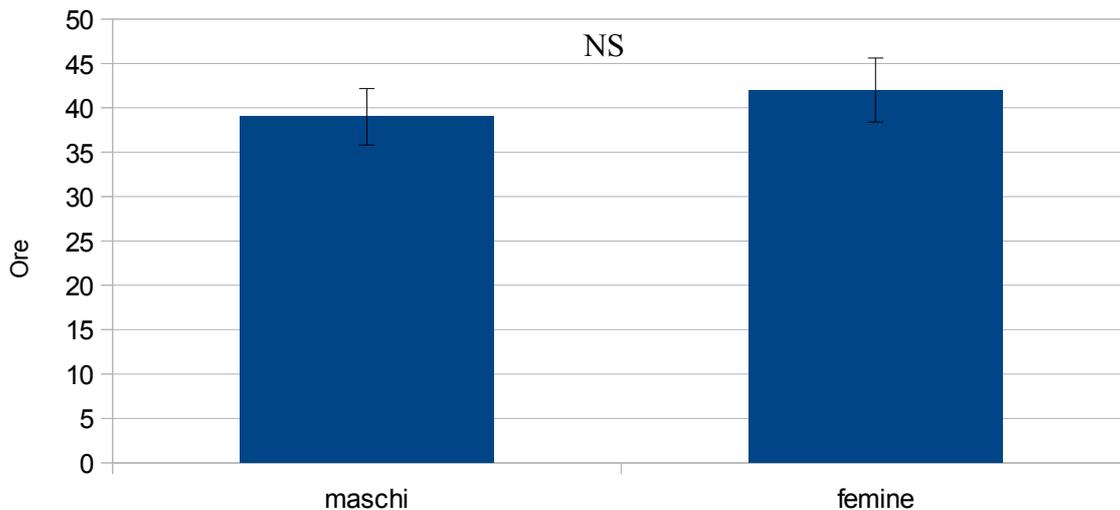
Grafico 4.9: andamento della sopravvivenza percentuale giornaliera degli individui allevati a temperatura non controllata in base al sesso.

Ad una prima osservazione questi dati sembrerebbero suggerire che, alle condizioni testate, non vi siano differenze tra le aspettative di vita dei due sessi.

Confrontando le medie dei due sessi con il test F, si ottiene un valore calcolato di 1,299, inferiore a quello tabulare con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ (rispettivamente 2,01 e 2,72, gradi di libertà 23 e 23). Il seguente calcolo di z ha fornito un valore di 0,62, che risulta inferiore a quelli tabulari (rispettivamente 1,96 e 2,58 per $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$).

Il test ANOVA ci fornisce un valore di 0,5355, superiore quindi a 0,5.

Longevità dei due sessi a confronto



Rafico 4.10: confronto della'aspettativa media di vita dei maschi e delle femmine allevati a temperatura non controllata

Basandoci sui risultati ottenuti da entrambi i test, possiamo concludere che, a parità di trattamento, non esiste alcuna differenza statisticamente apprezzabile nell'aspettativa di vita media dei due sessi di *P. triclavatum*.

Questo dato risulta interessante probabilmente solo a fini conoscitivi della biologia del parassitoide, in quanto la fecondazione sembrerebbe avvenire prima dello sfarfallamento degli adulti e quindi non risulterebbe necessario, nel caso di produzione in massa, l'allevamento degli esemplari maschi.

4.2 Prova di Parassitizzazione

I rilevamenti sono stati effettuati ad inizio febbraio 2022 (quindi circa 8 mesi dopo il posizionamento delle uova nel sottosuolo) tramite l'utilizzo di un microscopio.

Per ogni prova effettuata, è stato rilevato il numero di uova parassitizzate, in diapausa o rotte e/o mancanti (si presume per azione della microfauna presente nel suolo).

Sono stati analizzati sia i dati rilevati nelle prove svolte in cella climatica che quelli ottenuti a temperatura non controllata.

Le uova parassitizzate erano distinguibili a microscopio grazie al riflesso causato dalle larve dell'imenottero visibile attraverso l'involucro esterno dell'uovo.

Dopo dissezione delle uova parassitizzate, si può osservare che i parassitoidi, in questo stadio, presentano una forma sferica ed un colore giallastro.



Imm. 4.1: un uovo di *B. vicetinus* parassitizzato. Si possono osservare gli embrioni del parassitoide, che appaiono come piccole sfere scure



Imm. 4.2: uovo di *B. viceinus* parassitizzato dopo rottura. Gli embrioni del parassitoide presentano una forma sferica ed un colore giallastro

4.2.a Entità dalla parassitizzazione a diverse condizioni di allevamento (alimentazione e temperatura): prove non choice

Per quanto riguarda i dati ottenuti dalle prove in cella climatica, di seguito riportati, possiamo vedere come gli individui posti a 15°C siano riusciti a parassitizzare solamente 3 uova su 61 (cioè il 4,92%), quelli posti a 20°C 27 uova su 59 (il 45,76%), quelli posti a 25°C 15 uova su 60 (il 25%).

Parassitizzazione in CellaClimatica		
	Parassitizzate	Non Parassitizzate
15°C	3	58
20°C	27	32
25°C	15	35

Tab. 4.7: uova parassitizzate a diverse temperature in cella climatica

Per verificare una eventuale differenza statisticamente significativa del livello di parassitizzazione alle diverse temperature si è deciso di utilizzare il test del χ^2 . Considerata la diversa numerosità dei campioni utilizzate nelle tre prove, si è ricorsi all'utilizzo di una tabella di contingenza ed all'applicazione della correzione di Yates.

Le prove sono state confrontate a coppie:

- confronto tra i dati ottenuti a 15°C ed a 20°C: elaborando i dati si è ottenuto un χ^2 di 26,71. Considerando che i valori critici con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ corrispondenti ad 1 grado di libertà sono rispettivamente di 3,84 e 6,63, si può concludere che esiste una differenza altamente significativa: a di 20°C si ha un livello di deposizione maggiore rispetto ad una temperatura ambientale di 15°C.
- confronto tra i dati ottenuti a 20°C ed a 25°C: elaborando i dati si è ottenuto un χ^2 di 6,65. Essendo i valori critici di riferimento i medesimi dell'analisi precedente ($P_{0,05} = 3,84$; $P_{0,01} = 6,63$, gradi di libertà 1), si può concludere che esiste una differenza statisticamente significativa, ma non altamente significativa, tra i risultati ottenuti: a 20°C si ha un livello di deposizione maggiore rispetto ad una temperatura ambientale di 25°C.

A questi dati vanno affiancati quelli delle prove A1 ed A2 (una femmina a cui è stato sottoposto un uovo di *B. vicetinus* neodeposto) hanno dato i seguenti risultati:

- prova A1: 32 uova parassitizzate su 92 utilizzate (il 34,78%);
- prova A2: 24 uova parassitizzate su 102 utilizzate (il 23,53%).

Prese nel complesso, le due prove hanno fornito 56 uova parassitizzate su 194 utilizzate (il 28,86%).

Prove di parassitizzazione: 1 uovo/1 femmina			
	Non Parassitizzate	Parassitizzate	Totale
Prova A1	60	32	92
Prova A2	78	24	102
Totale	138	56	194

Tab. 4.8: uova parassitizzate nelle prove a temperatura non controllate in cui veniva fornito un singolo uovo appena deposto

La prova H (una femmina a cui è stato sottoposto un uovo in diapausa iniziale) ha fornito 5 uova parassitizzate su 30 utilizzate (il 16,67%).

Prove di parassitizzazione: 1 uovo/1 femmina			
	Non Parassitizzate	Parassitizzate	Totale
Prova H	25	5	30

Tab. 4.9: uova parassitizzate a temperatura non controllate in cui veniva fornito un singolo uovo di *B. vicetinus* in diapaus iniziale

Si è deciso di considerare i risultati delle prove A1, A2 ed H come ottenuti da un'unica prova, considerato che sono state svolte tutte nelle medesime condizioni di temperatura ed alimentazione e l'unica differenza riscontrabile tra le tesi era l'età dell'uovo che veniva somministrato. Ad ogni modo si è proceduto anche con un'analisi che escludesse il coinvolgimento delle uova in diapausa iniziale:

- elaborando i dati ottenuti a 20°C ed a temperatura ambiente (22-24°C) si è ottenuto un χ^2 di 7,32. Considerando che i valori critici con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ corrispondenti ad 1 grado di libertà sono rispettivamente di 3,84 e 6,63, si può concludere che esiste una differenza altamente significativa tra i risultati ottenuti nelle due prove: ad una temperatura ambientale di 20°C si ha un tasso di deposizione maggiore rispetto ad una temperatura ambientale di 22-24°C;
 - nel caso in cui non venga considerata la prova H (uova in diapausa iniziale) si ottiene un χ^2 di 5,74: anche questo risultato dimostra che esiste una differenza significativa (ma non altamente significativa) tra i dati ottenuti nelle due condizioni ambientali;
- analizzando i dati ottenuti a 25°C ed a temperatura ambiente si è ottenuto un χ^2 di

0,18. Considerando che i valori critici con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ corrispondenti ad 1 grado di libertà sono rispettivamente di 3,84 e 6,63, si può concludere che non esiste alcuna differenza statisticamente rilevante tra i risultati ottenuti nelle due prove: a 25°C si ha un tasso di deposizione statisticamente uguale a quello che si può ottenere a 22-24°C.

- nel caso in cui non si consideri la prova H (uova in diapausa iniziale) il risultato ottenuto rimane il medesimo: un χ^2 di 0,41 conferma che non ci sono differenze significative tra le prove.

Si è deciso anche di valutare una eventuale differenza statistica nella parassitizzazione di uova di diversa età quando queste vengono fornite singolarmente alle femmine.

Elaborando i dati delle prove A1,A2 ed H si è ottenuto un χ^2 di 2,99. Considerando che i valori critici con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ corrispondenti ad 1 grado di libertà sono rispettivamente di 3,84 e 6,63, si può concludere che non esiste alcuna differenza tra i risultati ottenuti nelle due prove: una femmina a cui verrà sottoposto un singolo uovo potrà parassitizzarlo indipendentemente dal fatto che questo sia stato appena deposto o che si trovi in diapausa iniziale. Questi ultimi dati verrenno ripresi di seguito nel paragrafo 4.2.b

Percentuali di Parassitizzazione a diverse condizioni ambientali

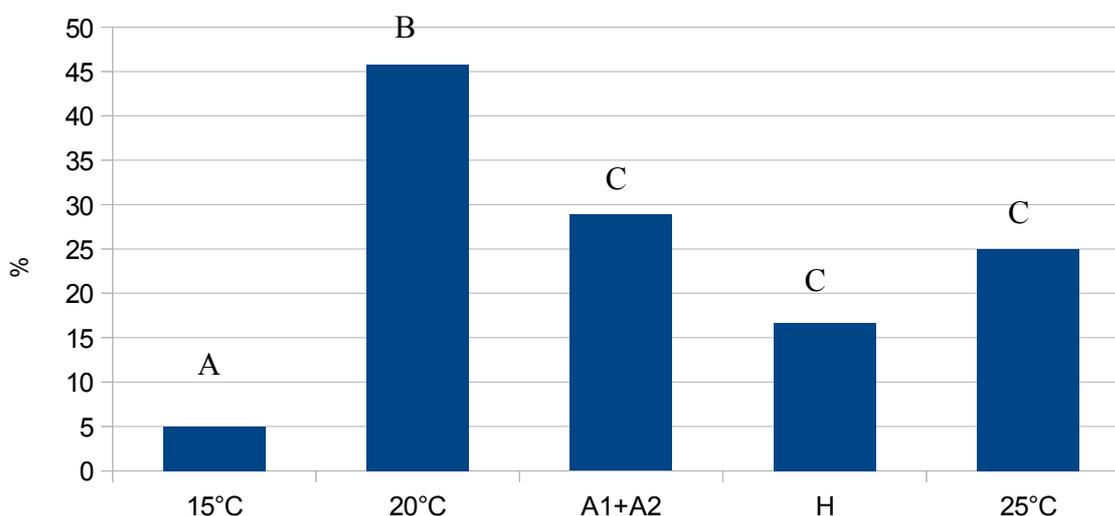


Grafico 4.11: percentuali di parassitizzazione a diverse condizioni ambientali a confronto

Nonostante quanto riportato nel capitolo 4.1.b riguardante l'aspettativa di vita a diverse temperature, si nota qui che l'attività di deposizione a temperatura non controllata di 22-

24°C corrisponde statisticamente a quella rilevabile a 25°C.

La temperatura ottimale al fine di ottenere il maggior numero possibile di uova parassitizzate in un eventuale allevamento massale risulta quindi essere, per lo meno tra le temperature testate, 20°C.

La conoscenza delle percentuali di parassitizzazione alle altre temperature potrebbe invece risultare utile nel momento in cui si dovesse andare a rilasciare gli esemplari adulti nell'ambiente, per poter programmare modalità e tempistiche del rilascio in base, per esempio, alle previsioni meteorologiche dell'area interessata.

4.2.b Entità dalla parassitizzazione: prove "choice" per la preferenza dello stadio dell'uovo

Le prove B1 e B2 (una femmina a cui sono state sottoposte due uova, una in diapausa iniziale ed una neodeposta) e la prova C (in cui è stato utilizzato anche il maschio) hanno fornito complessivamente, su in totale di 228 uova utilizzate (ossia 114 repliche), 39 uova parassitizzate (il 34,21%), di cui 29 in diapausa iniziale e 10 neodeposte (rispettivamente il 74,36% ed il 25,64% delle uova parassitizzate ed il 25,44% e 8,77% sul totale delle uova utilizzate per questa prova). Solo in 3 repliche si sono riscontrate entrambe le uova parassitizzate.

Oltre al fatto che le prove sono state svolte alle medesime condizioni, le uova sono state valutate complessivamente e non in base alla singola prova poichè al momento dell'estrazione dei contenitori in polistirolo dal suolo risultavano visibili sugli stessi solamente i tratti di pennarello che erano stati fatti per suddividere le diverse repliche, mentre i codici delle prove risultavano per lo più illeggibili o comunque di difficile identificazione.

Prove "choice" per l'età dell'uovo				
Non Parassitizzate		Parassitizzate		Totale
Diapausa Iniziale	Nuove	Diapausa Iniziale	Nuove	
85	104	29	10	228

Tab. 4.10: livello di parassitizzazione delle uova di diversa età poste all'interno della stessa boccetta

Risulta interessante notare come, se si considerano solo le uova parassitizzate, le repliche in cui queste sono state parassitizzate entrambe rappresentino solamente l'8,33% del totale.

Percentuale di repliche in cui è avvenuta la parassitizzazione in base allo stadio dell'uovo parassitizzato

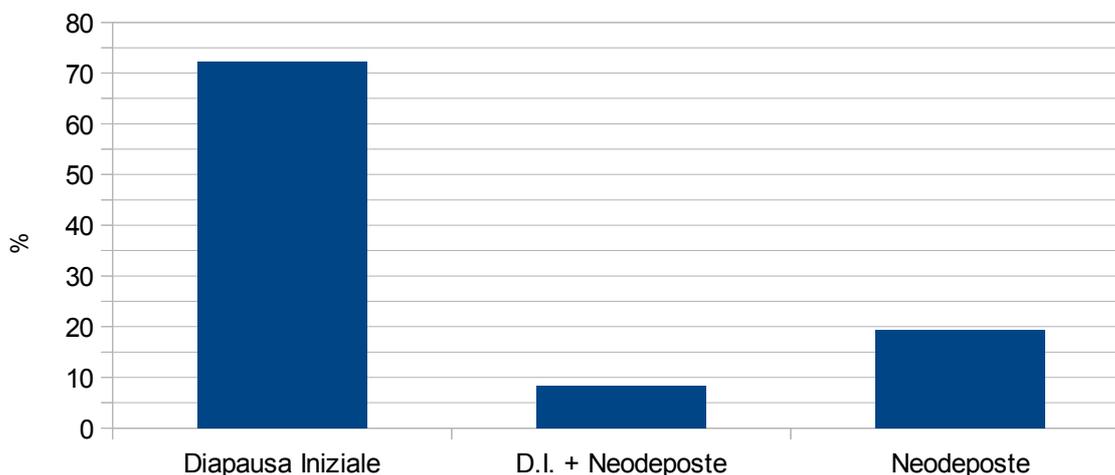


Grafico 4.12: si noti la bassa percentuale di repliche nelle quali sono state rinvenute entrambe le uova parassitizzate

Se non ci fosse alcun tipo di discriminazione da parte della femmina per quanto riguarda le uova da parassitizzare, ci si aspetterebbe che queste risultassero parimenti parassitizzate.

I dati rilevati hanno però fornito delle percentuali di parassitizzazione che per lo meno in un primo momento possono apparire discordanti con questa tesi.

Elaborando i dati si è ottenuto un χ^2 di 11,2. Considerando che i valori critici con $P_{0,05}$ e $P_{0,01}$ corrispondenti ad 1 grado di libertà sono rispettivamente di 3,84 e 6,63, si può concludere che esiste una differenza altamente significativa: le femmine di *P. triclavatum* sono in grado di distinguere uova di diversa età e di effettuare una scelta riguardante l'uovo all'interno del quale andranno ad ovideporre, che sarà preferibilmente quello che si trova in diapausa iniziale.

Questo fatto in se non risulta particolarmente strano considerato che molte specie di ooparassitoidi tendono preferenzialmente a deporre all'interno di uova di una piuttosto che di un'altra determinata età¹³.

13 Si veda ad esempio: "Krugner R., Johnson M.W., Morgan D.J.W. and Morse J.G., 2009. Production of *Anagrus epos* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) on *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera: Cicadellidae) eggs. *Biological Control* 51 (2009) 122–129."

In ogni caso questo dato risulterebbe di scarso valore in un eventuale allevamento di parassitoidi in quanto, come riportato nel paragrafo 4.2.a, e visti gli scarsi risultati riportati nel paragrafo 4.2.c, nel momento in cui si va somministrare un singolo uovo, questo ha la stessa possibilità di essere parassitizzato indipendentemente dalla sua età.

Inoltre, vista la grande quantità di uova che potrebbe rendersi necessario parassitizzare, queste si otterrebbero prevalentemente (come successo per le prove svolte) da un allevamento di *B. vicetinus* in laboratorio, per cui sarebbero a disposizione molto più facilmente uova appena deposte che non in diapausa iniziale.

Come per le altre prove, anche in questo caso l'elevato numero di uova devitalizzate potrebbe aver influito sui risultati ottenuti.

Si sottolinea anche come siano in grado di parassitizzare contemporaneamente, anche se successo in maniera limitata durante i test svolti, almeno due uova anche a diverso stadio di sviluppo.

4.2.c Entità dalla parassitizzazione: capacità di deporre all'interno di più uova

La prova G (una femmina a cui sono state sottoposte due uova di *B. vicetinus* appena deposte) ha fornito 8 uova parassitizzate su 62 utilizzate (il 12,90%).

Di queste solo le uova utilizzate in due repliche, quindi 4 uova, (ossia nel 3,23% delle repliche) sono risultate entrambe parassitizzate; altre due repliche hanno riportato un uovo parassitizzato ed uno in diapausa, mentre altre due un uovo parassitizzato ed uno non più vitale.

Stando a questi dati, e considerando anche quanto visto nel paragrafo 4.2.b, appare evidente come la femmina possa essere in grado di parassitizzare almeno due uova distinte di *B. vicetinus*, anche se ciò sembra accadere in maniera molto limitata.

Questo dato risulta più che altro interessante da un punto di vista biologico anziché da un punto di vista applicativo, in quanto non risulterebbe vantaggioso sotto alcun punto di vista la somministrazione di più uova ad una singola femmina in programmi di allevamento.

4.2.d Preferenza per la specie ospite valutata con prove "choice" e "no choice"

Le prove D ed E (una femmina a cui sono state sottoposte due uova neodeposte, uno di *B. vicetinus* ed uno di *P. aptera*) hanno riportato, su un totale di 73 repliche, 18 uova di *B. vicetinus* parassitizzate (il 24,66% delle uova utilizzate). Per quanto riguarda le uova di *P. aptera*, tramite dissezione ed analisi a microscopio, non si sono riscontrate uova parassitizzate.

Preferenza per la specie ospite				
Non Parassitizzate		Parassitizzate		Totale
Pholidoptera	Barbitistes	Pholidoptera	Barbitistes	
73	55	0	18	146

Tab. 4.11: risultati della prova choice per la scelta della specie ospite

Anche in questo caso si è ricorso ad una valutazione globale delle prove a causa della difficoltà di identificazione delle singole prove a seguito del deterioramento dei contenitori in polistirolo utilizzati e quindi dei codici identificativi apposti.

Anche per quanto riguarda la prova F (una femmina a cui è stato fornito esclusivamente un uovo di *P. aptera*), nessun uovo è risultato parassitizzato.

È comunque il caso di notare che in diverse repliche non sempre l'uovo di *B. vicetinus* è risultato parassitizzato, il che, assieme ad alcune osservazioni fatte su alcuni esemplari che saggiavano con antenne ed ovopositore le uova di *P. aptera*, potrebbe far pensare che la femmina possa ad ogni modo decidere se ovideporre all'interno di uova di altre specie, anche se poi gli embrioni potrebbero non essere in grado di svilupparsi a spese dell'uovo per ragioni da determinare.

Si possono suggerire alcune ipotesi riguardanti questo risultato:

- mancato interesse delle femmine per le uova di Pholidoptera: è possibile che, nonostante le osservazioni effettuate, le femmine abbiano poi deciso di non deporre all'interno delle uova e che si siano limitate esclusivamente a saggiarle;
- tegumento esterno dell'uovo: è possibile che il tegumento esterno dell'uovo di *P. aptera* risulti troppo spesso per il parassitoide, per cui anche se la femmina dovesse

essere decisa a parassitizzarlo, questo le risulterebbe meccanicamente impossibile;

- meccanismi di difesa delle uova di *P. aptera*: è possibile che all'interno delle uova di Pholidoptera agiscano meccanismi di difesa in grado di ostacolare lo sviluppo di parassitoidi non specializzati, similmente a quanto avviene nell'incapsulamento di parassitoidi non compatibili all'interno di adulti di diverse specie¹⁴.

È bene far presente che molte delle uova utilizzate nelle diverse prove sono risultate non più vitali al momento del controllo in laboratorio, per cui non è da escludere che anche parte di queste potesse risultare, in un momento precedente al controllo, parassitizzata.

Dovendoci basare ad ogni modo su questi risultati, dobbiamo concludere che *P. triclavatum* sembri essere un ooparassitoide specifico di *B. vicetinus*. Risulterebbe interessante sapere se la specie sia in grado di parassitizzare specie, se non di altri generi, per lo meno tra quelle appartenenti al genere *Barbitistes*.

Sembrirebbe comunque ragionevole ipotizzare che la specie, comprendente quindi le popolazioni rinvenute in Repubblica Ceca ed Ungheria, sia in grado di parassitizzare almeno un'altra specie, in quanto in queste zone non risulta la presenza di *B. vicetinus*.

4.3 Numero di individui che possono potenzialmente svilupparsi a spese di un singolo uovo parassitizzato e sex ratio

Per quanto riguarda il numero di individui che possono potenzialmente sfarfallare da un singolo uovo parassitizzato, questo varia, stando ai dati raccolti, da un minimo di 40 ad un massimo di 135 individui/uovo, con una media di 97,58.

Il numero di individui non sfarfallati (ritrovati deceduti all'interno dell'uovo parassitizzato) è molto variabile, andando da 0 ad 85 individui/uovo.

Per quanto riguarda le differenze tra i sessi, il numero di femmine è variato da un minimo di 36 ad un massimo di 126 (sia sfarfallate che non



Imm. 4.3: si possono notare i fori di sfarfallamento aperti dai maschi

14 Gullan P. J., Cranston P. S.. Lineamenti di Entomologia. Zanichelli Editore, Bologna 2010.

sfarfallate complessivamente), in media 90,61, mentre per i maschi si va da un minimo di 1 ad un massimo di 39 (sia sfarfallati che non sfarfallati complessivamente), in media 7,96.

Solamente in un caso (uovo P, non considerato nei calcoli precedenti) si è riscontrata la presenza di soli maschi, per un totale di 75 individui.

Esemplari sviluppatisi a spese di un singolo uovo								
Uovo	Maschi			Femmine			Totale	Fori
	<i>sfarfallati</i>	<i>non sfarfallati</i>	Totale	<i>sfarfallate</i>	<i>non sfarfallate</i>	Totale		
A	12	1	13	72	27	99	112	1
B	5	0	5	35	35	70	75	1
C	4	2	6	51	6	57	63	4
D	4	0	4	12	52	68	68	1
E	4	0	4	16	20	36	40	3
F	2	1	3	107	6	113	116	3
G	5	0	5	68	14	82	87	3
H	17	0	17	107	0	107	124	9
I	9	2	11	88	36	124	135	4
J	9	0	9	67	0	67	76	?
K	2	0	2	104	0	104	106	6
L	9	0	9	110	0	110	119	6
M	7	0	7	66	17	83	90	3
N	3	1	4	121	0	121	125	2
O	6	0	6	28	85	113	119	1
P	68	7	75	0	0	0	75	2
Q	1	1	2	17	85	102	104	1
R	36	3	39	41	21	62	101	9
S	4	0	4	86	35	121	125	3
T	3	17	20	71	37	108	128	1
U	2	2	4	29	67	96	100	1
V	1	1	2	27	40	67	69	2
W	6	0	6	126	0	126	132	4
X	1	0	1	9	43	52	53	1
Tot	220	38	258	1458	626	2084	2342	-

Tabella 4.12: dati relativi agli esemplari sfarfallati ed a quelli rinvenuti senza vita all'interno delle uova analizzate. Si può notare come le cifre siano alquanto variabili a seconda dell'uovo considerato. Anche il numero di fori prodotti per lo sfarfallamento è variabile.

Queste uova hanno fornito un campione di 2342 individui, di cui 258 maschi e 2084 femmine, composto per l'11,02% da individui maschi e per l' 88,98% da femmine, con una

sex ratio di 12,38, ossia 1 maschio ogni 8,08 femmine. Questa condizione è favorita da una partenogenesi arrenotoca molto diffusa tra i membri della famiglia dei Mymaridae¹⁵

I fori di sfarfallamento variano da 1 a 9 a seconda dell'uovo considerato.

Questi dati portano a considerare come corretto quanto riportato da Ortis (2020) sia per quanto riguarda la potenziale numerosità di individui che possono crescere a spese di un singolo uovo, sia per quanto riguarda la capacità della specie di riprodursi oltre che per via sessuale anche tramite partenogenesi arrenotoca.

4.4 Altre osservazioni

Sono state fatte alcune osservazioni, durante l'esecuzione dei test, che possono risultare interessanti, come quelle relative al momento dello sfarfallamento degli individui adulti da un uovo.

Durante un sopralluogo mattutino, per verificare se nella notte fossero sfarfallati nuovi adulti da utilizzare nelle prove, ho notato la presenza di un paio di adulti all'interno di una boccetta contenente un uovo (poi identificato come l'uovo M). Ad un esame più attento ho notato che dallo stesso stavano continuando ad uscire nuovi individui.

Dopo circa 45 minuti dall'inizio dell'osservazione è diventato pressochè impossibile, visto l'elevato numero di insetti in movimento all'interno della boccetta, valutare se stessero ancora fuoriuscendo dall'uovo o no.

Una volta sfarfallati gli adulti risultano essere subito molto attivi, andando immediatamente alla ricerca di un uovo da parassitizzare: si è infatti osservato che numerose femmine sondavano, con antenne ed ovopositore, lo stesso uovo dal quale erano appena uscite pur di trovare dove deporre. L'evento è stato registrato su supporto video.



Imm. 4.4: Femmina di *P. triclavatum* intenta a saggiare un uovo di *P. aptera*

15 Viggiani G.. Lotta Biologica e Integrata nella Difesa Fitosanitaria, Volume 1. Liguori Editore, Napoli 2000.

Un'altra osservazione che potrebbe risultare di rilievo è quella di alcune femmine delle prove D, E ed F che sondavano uova di *P. aptera* con il loro ovopositore. Anche questo evento è stato registrato su supporto video.



Imm. 4.5: molte delle uova di *B. vicetinus* utilizzate al momento del controllo si trovavano già in diapausa finale, con al loro interno un embrione già ben sviluppato e distinguibile nelle sue parti

5. Prospettive Future

Nonostante i dati ottenuti ci forniscano un quadro interessante riguardo la biologia di questo insetto, diverse rimangono le lacune da colmare.

Ciò detto e considerando alcune delle possibili necessità che si possono riscontrare in programmi di allevamento, si auspica nuovamente lo svolgimento di ulteriori prove:

- che abbiano come scopo quello di verificare l'effetto delle temperature sui parassitoidi prima della loro fuoriuscita dall'uovo parassitizzato, quindi sul loro sviluppo allo stadio embrionale e poi larvale, al fine di valutare la possibilità, qualora fosse necessario, di avere a disposizione esemplari adulti anche al di fuori del periodo naturale di sfarfallamento ed avere di conseguenza un maggior periodo utile per il loro utilizzo;
- in cui si vada a verificare la capacità di ovideposizione della femmina in un ambiente naturale o simil-naturale, in quanto nelle prove svolte non vi era alcun tipo di impedimento che si ponesse tra la femmina e l'uovo che le veniva somministrato, fatto questo che difficilmente si verificherebbe in natura, considerato che le uova di *B. vietinus* vengono deposte nel suolo, anche se ad una profondità di pochi millimetri. Inoltre in questo modo si avrebbero dati in grado di fornire risultati più accurati a proposito del livello di parassitizzazione nel momento in cui la specie venisse utilizzata in programmi di lotta;
- in cui si vadano a valutare le capacità di spostamento su brevi e medie distanze delle femmine: nonostante queste siano dotate di ali, non sembrano in grado di utilizzarle se non per spiccare brevi voli di appena qualche centimetro. Questa verifica potrebbe rivelarsi molto importante per andare a valutare le modalità di rilascio in natura degli adulti e la distanza massima utile perchè siano poi in grado di ricercare e parassitizzare le uova di *B. vicetinus*;
- in cui si vada a verificare la capacità di parassitizzazione delle uova di specie diverse da quelle usate nei test eseguiti.

Potrebbe risultare interessante indagare le motivazioni che spingono le femmine di questa specie a preferire uova di una determinata età piuttosto che di un'altra.

A proposito di temperature, potrebbe essere interessante valutare gli effetti che il riscaldamento globale può avere su questi insetti. È ormai risaputo che l'aumento delle

temperature ha effetto anche sull'attività degli insetti, effetto che può essere positivo (purtroppo molto spesso a favore di insetti comunemente considerati dannosi per l'attività umana¹⁶) o negativo (molto spesso a scapito di insetti considerati utili¹⁷).

Se si dovesse riscontrare un qualche effetto negativo significativo, questo potrebbe verosimilmente andare in parte a spiegare i numerosi *outbreak*, verificatisi negli ultimi anni, di *B. vicetinus* (specie che, tra l'altro, sembra possa trarre vantaggio dal previsto aumento di temperatura¹⁸). Inoltre questo dato ci potrebbe fornire preventivamente un'idea sulla possibile efficacia nell'utilizzo dell'imenottero nella prospettiva di un aumento generalizzato delle temperature.

16 Si veda ad esempio: "Estay S A, Lima M, Labra F A. 2009. Predicting insect pest status under climate change scenarios: combining experimental data and population dynamics modelling. *Journal of Applied Entomology*, 133, 491-499."

17 Si veda ad esempio: "Ming-yong MA, Zhao-pu PENG, Yuan HE, 2012. Effects of Temperature on Functional Response of *Anagrus nilaparvatae* Pang et Wang (Hymenoptera: Mymaridae) on the Eggs of Whitebacked Planthopper, *Sogatella furcifera* Horváth and Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, *Journal of Integrative Agriculture*, Volume 11, Issue 8, Pages 1313-1320."

18 Ortis G., Marini L., Cavaletto G. And Mazzon L., 2022. Increasing temperatures affect multiyear life cycle of the outbreak bush-cricket *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae). *Insect Science* (2022) 0, 1–9.

8. Conclusione

Con le prove effettuate in laboratorio e precedentemente riportate si è riusciti ad ampliare in parte la conoscenza della biologia di *P. triclavatum* e del suo ruolo in natura.

I dati rilevati possono però, inoltre, risultare molto interessanti anche per quanto riguarda un eventuale utilizzo dell'insetto in programmi di lotta contro *B. vicetinus*.

Tramite l'impostazione di alcune prove si è riusciti ad avere un'idea della possibile *life span* di questi parassitoidi a diverse temperature, identificando quella che sembra essere la più adatta alla loro breve vita adulta: se si considera anche la capacità di ovideposizione, questa temperatura risulta essere 20°C.

Questa temperatura risulta tra l'altro essere abbastanza in linea con le temperature medie dei mesi di giugno e di luglio che si possono riscontrare in diverse località dei Colli Euganei¹⁹, per cui è verosimile ipotizzare che anche in natura si possano avere un'aspettativa di vita ed un tasso di parassitizzazione per lo meno simili a quelli ottenuti in laboratorio.

Stando all'analisi dei dati, sembra che la somministrazione di miele alle femmine adulte possa aumentarne l'aspettativa media di vita. Questo dato però risulta alquanto controverso, considerando che le femmine possiedono un apparato boccale fortemente ridotto e che ciò sia avvenuto significativamente solamente a 15°C

Si è infine valutata la capacità di deposizione a scapito di un'altra specie, la *P. aptera*, senza però ottenere risultati positivi in questo senso; ciò ci indica, almeno per il momento, l'attività specie-specifica di questo imenottero.

Considerando che quelli fin qui riportati sono ad oggi gli unici test che sono stati eseguiti su questa specie, e considerando la difficoltà nello svolgimento di questi test dovuta principalmente alle ridotte dimensioni dell'imenottero ed alla conseguente sua difficile manipolazione, moltiri mancano i parametri biologici che andrebbero valutati, sia per un fine meramente conoscitivo, sia per il loro possibile utilizzo in azioni di lotta contro *B. vicetinus*, qualora ve ne fosse bisogno.

Per gli stessi motivi, si suggerisce lo svolgimento di ulteriori prove che possano andare ad avvalorare ed eventualmente ad approfondire ancor più nel dettaglio quanto finora riportato.

¹⁹ Si vedano i dati relativi ad alcune stazioni situate all'interno dell'area dei Colli Euganei presenti sul sito internet di ARPAV, in cui vengono riportate le temperature medie rilevate dal 1994 al 2021. I dati sono reperibili al seguente link: <https://www.arpa.veneto.it/dati-ambientali/open-data/clima/principali-variabili-meteorologiche>

Nonostante ciò, possiamo concludere che *P. triclavatum*, oltre a risultare un organismo naturalmente in grado di contenere, seppur entro certi limiti, le esplosioni demografiche di *B. vicetnus*, possa essere considerato un buon candidato anche come agente di biocontrollo da utilizzare in programmi di lotta nei confronti di questo ortottero.

Bibliografia

1. Aeschlimann J. P., 1977. Notes on *Patasson lameerei* [Hym.: Mymaridae], an egg parasitoid of *Sitona* spp. [Col.: Curculionidae] in the mediterranean region. *Entomophaga*, 22 (I), 1977, 111-114.
2. Agboka K., Tounou A.K., Al-Moaalem R., Poehling H.M., Raupach K. And Borgemeister C., 2004. Life Table Study of *Anagrus atomus*, an Egg Parasitoid of the Green Leafhopper *Empoasca decipiens*, at four different Temperatures. *BioControl* 49: 261–275, 2004.
3. ARPAV – Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto. <https://www.arpa.veneto.it/dati-ambientali/open-data/clima/principali-variabili-meteorologiche>
4. Cavaletto G., Faccioli M., Marini L., Martinez-Sañudo I. e Mazzon L., 2018. Oviposition site preference of *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae) during outbreaks. *Agricultural and Forest Entomology* (2018), 20, 414–419.
5. Cavaletto G., Faccioli M., Marini L. e Mazzon L., 2019. Emergence phenology and temperature effect on the post-diapause egg development in the bush cricket *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae). *Bulletin of Entomological Research* (2020) 110, 161–168.
6. Cavaletto G., Faccioli M., Marini L. e Mazzon L., 2019. Habitat loss and alien tree invasion reduce defoliation intensity of an eruptive forest pest. *Forest Ecology and Management* 433 (2019) 497–503.
7. Chinery M.. Guida degli Insetti d'Europa. Franco Muzzio Editore, Padova 1987.
8. Comunicazione 640 del 2019 della Commissione al Parlamento Europeo, al Consiglio, al Comitato Economico e Sociale Europeo e al Comitato delle Regioni".
9. Dakhel W.H., Jaronski S.T., Schell S., 2020. Control of Pest Grasshoppers in North America. *Insects* 2020,11, 566.
10. Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi.
11. Dorková M., Krištín A., Jarčuška B. e Kaňuch P., 2020. The mosaic distribution pattern of two sister bush-cricket species and the possible role of reproductive

- interference. *Ecology and Evolution*. 2020;10:2570–2578.
12. Estay S A, Lima M, Labra F A. 2009. Predicting insect pest status under climate change scenarios: combining experimental data and population dynamics modelling. *Journal of Applied Entomology*,133, 491-499.
 13. Eilenberg J., Hajek A., Lomer C., 2001. Suggestion for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387–400.
 14. Fowler J., Cohen L.. *Statistica per ornitologi e naturalisti*. Franco Muzzio Editore, Roma 2010.
 15. Galvagni A., Fontana P., 1993. *Barbitistes vicetinus* sp.n. dell'Italia nord-orientale (Insecta, Orthoptera, Tettigoniidae). *Atti dell'Accademia Roveretana degli Agiati*, A,242, 1992, Ser. VII, Vol. II, B, 199–206.
 16. Gullan P. J., Cranston P. S.. *Lineamenti di Entomologia*. Zanichelli Editore, Bologna 2010.
 17. Gurr G.M., Liu J., Catindig J.L.A., Cheng J.A., Lan L.P. And Heong K.L., 2011. Parasitoids of Asian rice planthopper (Hemiptera: Delphacidae) pests and prospects for enhancing biological control by ecological engineering. *Annals of Applied Biology* 158 (2011)149–176.
 18. Hochkirch, A., Nieto, A., García Criado, M., Cálix, M., Braud, Y., Buzzetti, F.M., Chobanov, D., Odé, B., Presa Asensio, J.J., Willemse, L., Zuna-Kratky, T., Barranco Vega, P., Bushell, M., Clemente, M.E., Correas, J.R., Dusoulier, F., Ferreira, S., Fontana, P., García, M.D., Heller, K-G., Iorgu I.Ş., Ivković, S., Kati, V., Kleukers, R., Krištín, A., Lemonnier-Darcemont, M., Lemos, P., Massa, B., Monnerat, C., Papapavlou, K.P., Prunier, F., Pushkar, T., Roesti, C., Rutschmann, F., Şirin, D., Skejo, J., Szövényi, G., Tzirkalli, E., Vedenina, V., Barat Domenech, J., Barros, F., Cordero Tapia, P.J., Defaut, B., Fartmann, T., Gomboc, S., Gutiérrez-Rodríguez, J., Holuša, J., Illich, I., Karjalainen, S., Kočárek, P., Korsunovskaya, O., Liana, A., López, H., Morin, D., Olmo-Vidal, J.M., Puskás, G., Savitsky, V., Stalling, T. and Tumbrinck, J. 2016. European Red List of Grasshoppers, Crickets and Bush-crickets. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
 19. Huber J.T. And Read J., 2021. A new, remarkable species of *Platystethynium* (*Platypatasson*) (Hymenoptera: Mymaridae) from New Zealand. *Zootaxa* 5052 (2):

215–232.

20. IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org/species/47712216/74621887#threats>
21. Krugner R., Johnson M.W., Morgan D.J.W. and Morse J.G., 2009. Production of *Anagrus epos* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) on *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera: Cicadellidae) eggs. *Biological Control* 51 (2009) 122–129.
22. Landmann A., 2017. Alpen-Strauchschrecke *Pholidoptera aptera* (Fabricius 1793). https://www.researchgate.net/publication/321318811_Alpen-Strauchschrecke_Pholidoptera_aptera_FABRICIUS_1793
23. Martinez-Sañudo I., Perin C., Cavaletto G., Ortis G., Fontana P. e Mazzon L., 2021. Studying genetic population structure to shed light on the demographic explosion of the rare species *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae). *PLoS ONE* 16(5): e0250507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250507>.
24. Mazzon, L., Tirello, P., Mori, N., Fontana, P. & Rosa, R. (2011) Esplosioni demografiche di *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae) in Veneto. XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Atti, 228 pp., Genova, Italy.
25. Ming-yong MA, Zhao-pu PENG, Yuan HE, 2012. Effects of Temperature on Functional Response of *Anagrus nilaparvatae* Pang et Wang (Hymenoptera: Mymaridae) on the Eggs of Whitebacked Planthopper, *Sogatella furcifera* Horváth and Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, *Journal of Integrative Agriculture*, Volume 11, Issue 8, Pages 1313-1320.
26. Mutitu E. Et al., 2013. Biology and Rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an Egg Parasitoid for the Biological Control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Journal of economic entomology* 106(5): 1979-1985 (2013).
27. Nouh G.M., Adly D., 2021. Evaluation of the virulence of entomopathogenic nematodes as a biological control agents against *Gryllotalpa gryllotalpa* (Gryllotalpidae). *Journal of Applied Entomology*. 2021;00:1–7
28. Ortis G., Triapitsyn S.V., Cavaletto G., Martinez-Sañudo I., Mazzon L., 2020. Taxonomic identification and biological traits of *Platystethynium triclavatum* (Donev & Huber, 2002), comb. n. (Hymenoptera, Mymaridae), a newly recorded egg

- parasitoid of the Italian endemic pest *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae). PeerJ 8:e9667 DOI 10.7717/peerj.9667.
29. Ortis G., Marini L., Cavaletto G. And Mazzon L., 2022. Increasing temperatures affect multiyear life cycle of the outbreak bush-cricket *Barbitistes vicetinus* (Orthoptera, Tettigoniidae). Insect Science (2022) 0, 1–9.
 30. Pandey M., Suwal B., Kayastha P., Suwal G. e Khanal D., 2021. Desert locust invasion in Nepal and possible management strategies: A review. Journal of Agriculture and Food Research 5 (2021) 100166.
 31. Pilkington L.J. And Hoddle M.S., 2006. Reproductive and developmental biology of *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). Biological Control 37 (2006) 266–275.
 32. Sahin Y. S., Bouhari A., Ulu T. C., Sadic B. e Susurluk I. A., 2018. New application method for entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) (Rhabditida: Heterorhabditidae) HBH strain against *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae). Türk. entomol. Derg., 2018, 42 (4).
 33. Stenberg J. A., Sundh I., Becher P. G., Björkman C., Dubey M., Egan P. A., Friberg H., Gil J. F., Jensen D. F., Jonsson M., Karlsson M., Khalil S., Ninkovic V., Rehermann G., Vetukuri R. R. e Viketoft M., 2021. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. Journal of Pest Science (2021) 94:665–676.
 34. Treiber R. und Stephan U., 1995. Nachweis von *Pholidoptera aptera* (Fabricius, 1793) im östlichen Elbsandstein-Gebirge (Sachsen). Articulata 1995 10(1): 93 – 95.
 35. Tripepi G., Gatalano F., 2004. L'analisi di sopravvivenza con il metodo Kaplan-Meier. Giornale Italiano di Nefrologia, Anno 21, pp 540-546.
 36. Viggiani G.. Lotta Biologica e Integrata nella Difesa Fitosanitaria, Volume 1. Liguori Editore, Napoli 2000.
 37. Warchałowska-Śliwa E., 1988. Karyotype of *Pholidoptera aptera Karnyi* Ebner. From Bulgaria and its Comparison with that of *Pholidoptera aptera Aptera* (Fabr.) from Poland (Orthoptera, Decticinae), Caryologia, 41:2, 161-168.