



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI, RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE (DAFNAE)**

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE**

**Indagini etologiche ed efficacia di parassitizzazione di *Habrobracon hebetor*  
(Hymenoptera, Braconidae) nei confronti delle tignole delle derrate**

**Relatore:** Prof. Luca Mazzon

**Correlatore:** Dott. Samuele Morao

Dott. Michele Ruzza

**Laureando:** Andrea Tedesco

**Matricola:** 1225279

**Anno Accademico 2022/2023**



# SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1.1 Gestione delle derrate alimentari tramite metodi biologici</b> .....	3
<b>1.2 <i>Habrobracon hebetor</i></b> .....	4
<b>1.3 <i>Ephestia kuehniella</i> ed <i>Ephestia cautella</i></b> .....	6
<b>1.4 Scopo della tesi</b> .....	7
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	8
<b>2.1 Gestione dell'allevamento</b> .....	8
<b>2.2 Test choice</b> .....	9
<b>2.3 Analisi dei dati</b> .....	9
<b>3. RISULTATI</b> .....	10
<b>4. DISCUSSIONE</b> .....	16
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	18
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	19

## RIASSUNTO

*Habrobracon hebetor* (Say) è un ectoparassitoide della famiglia Braconidae, antagonista di diverse specie di Lepidotteri, tra cui le comunemente conosciute tignole delle derrate che recano danno a semole, farine, frutta secca, cioccolato e molti altri alimenti. Il controllo di infestanti quali le tignole è un aspetto fondamentale per le fasi di produzione e trasformazione degli alimenti da molti punti di vista: igienico, economico e normativo, date le numerose, e ancora in aumento, limitazioni sull'utilizzo di biocidi di natura chimica. Infatti, i metodi tradizionali ovvero trattamenti insetticidi, per quanto ottimizzati in tempi recenti, presentano numerose criticità, resistenze ed effetti collaterali sulla salute umana e sull'ambiente. L'interesse scientifico si è quindi spostato sulla fattibilità di integrare questi metodi, con misure fisiche e biologiche, riservando l'uso di pesticidi di natura chimica solo come ultima risorsa. Questo approccio si concretizza nell'*Integrated Pest Management* (IPM) che combina l'uso di molteplici strategie simultanee per ottimizzare il controllo degli infestanti in una maniera ecologica ed economicamente sostenibile. La resistenza delle piante, l'uso di trappole e di predatori naturali sono alcuni dei metodi biologici utilizzati. Il lavoro presentato in questa tesi tratta appunto dell'utilizzo di un predatore naturale, *H. hebetor*, come agente per il controllo biologico e la valutazione della sua efficacia di parassitizzazione nei confronti di due specie di Piralidi dannose alle derrate: *Ephestia cautella* ed *Ephestia kuehniella*.

## ABSTRACT

*Habrobracon hebetor* (Say) is an ectoparasitoid of the Braconidae family, an antagonist of several species of Lepidoptera including the commonly known commodity moths that cause damage to stored products. The control of pests such as moth is a fundamental aspect for the production and processing phases of food, from many points of view: hygienic, economic and regulatory, because of the numerous, and still increasing, limitations on the use of chemical biocides. In fact, traditional methods that is insecticide treatments, although optimized in recent times, show numerous critical issues, resistance and side effects on human health and the environment. This parasitoid can be used as a biological agent for pest control, reducing the use and collateral damage of traditional pesticides on human health and the environment. Scientific interest has therefore shifted to the feasibility of integrating these methods with physical and biological measures, reserving the use of chemical pesticides only as a last option. This approach takes the form of *Integrated Pest Management* (IPM) which combines the use of multiple simultaneous strategies to optimize pest control in an ecological and economically sustainable manner. Plant resistance, the use of traps and natural predators are some of the biological methods used. The work presented in this thesis considers a natural predator, *H. hebetor*, as an agent for biological control and the evaluation of its parasitization effectiveness against two species of borers: *Ephestia cautella* and *Ephestia kuehniella*.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Gestione delle derrate alimentari tramite metodi biologici

Le derrate alimentari possono essere soggette all'attacco di numerosi parassiti con danni a livello quantitativo e qualitativo (Stejskal *et al.*, 2021). Questi parassiti appartengono, per la maggior parte, all'ordine dei coleotteri e dei lepidotteri ma possono anche essere presenti tisanuri, blattoidei, imenotteri, ditteri, acari e roditori (Khare, 1994; Belcari, 2012). Questi organismi possono svilupparsi in qualsiasi fase del processo di lavorazione delle derrate alimentari: dai magazzini di stoccaggio delle materie prime, alla fase di lavorazione, alla fase di distribuzione e trasporto fino ai punti vendita. Possono inoltre infestare anche le abitazioni dei consumatori e ciò può avvenire tramite l'acquisto di prodotti già più o meno infestati. (Trematerra and Süss, 2007). Tutti questi ambienti sono favorevoli allo sviluppo di vari organismi dannosi dal momento che in ambienti chiusi, nello specifico nei magazzini alimentari, molte specie, in presenza di temperature costanti e sufficientemente elevate, non entrano in diapausa come solitamente avviene durante il periodo invernale (Süss and Locatelli, 2001). In passato, per il controllo di questi organismi, sono stati ampiamente utilizzati diversi prodotti di sintesi: a partire dal DDT dagli anni '40 (Tremblay 2003), ai cloro-derivati degli anni '50 e -'60, a fumiganti come il bromuro di metile, ai fosfororganici come il Malathion (Dubey *et al.*, 2008; Stejskal *et al.*, 2021; Barbagallo 2019). Nonostante l'efficacia elevata, questi prodotti hanno subito progressive restrizioni a causa di numerosi svantaggi (Mahmood *et al.*, 2016). Infatti, l'esposizione al biocida o ai suoi residui può indurre possibili danni acuti o cronici negli operatori e nei consumatori (Damalas *et al.*, 2011) e può portare alla contaminazione degli ecosistemi (Barzman *et al.*, 2015). I prodotti più recenti come i piretroidi e i neonicotinoidi sono meno tossici ma purtroppo non specifici e quindi letali anche per l'entomofauna utile (Barbagallo 2019). L'uso frequente e ripetuto dei biocidi può causare lo sviluppo di ceppi resistenti ai principi attivi utilizzati mediante il noto meccanismo della pressione selettiva, per cui soccombono gli esemplari più sensibili al fitofarmaco usato, mentre sopravvivono quelli più capaci di detossificare la molecola dannosa assunta (Trematerra and Süss, 2007; Champ *et al.* 1977; Franklin e Phillips, 2003; Tremblay 2003). Gli insetti dannosi divenuti resistenti sono stati indicati oggi in oltre 500 specie in tutto il mondo (Barbagallo 2019). Attualmente in Europa la lotta integrata, nota come *Integrated Pest Management* (IPM), si sta affermando come approccio di riferimento contro diversi organismi dannosi (Mbata and Shapiro-Ilan, 2010) e l'applicazione dei suoi principi è stata resa obbligatoria con la Direttiva Europea 128/2009/CE. Vengono così introdotte diverse metodiche di gestione di tipo igienico, fisico, biologico e chimico, dove i prodotti fitosanitari di sintesi sono applicati nel minimo quantitativo possibile o come ultima alternativa (Dent 2000, Trematerra and Süss, 2007, Peshin and Dhawan 2009). L'obiettivo di questa lotta integrata non è l'eradicazione completa dei parassiti ma la loro gestione in modo da contenere il danno economico e garantire al contempo la salute umana e dell'ambiente

(Reichmuth 1996; Albajes *et al.*, 2017; Stern *et al.*, 1958). L'uso di predatori naturali, considerato tra le misure appropriate per ridurre lo sviluppo di popolazioni nocive (Smith, 2015) è alla base del lavoro di questa tesi che valuta l'impiego del parassitoide *Habrobracon Hebetor* nella lotta a due specie di Tignole delle derrate alimentari: *Ephestia cautella* ed *Ephestia kuehniella*.

## **1.2 *Habrobracon hebetor***

*Habrobracon hebetor* è un parassitoide cosmopolita della famiglia Braconidae, che parassitizza le larve di molte specie di lepidotteri della famiglia Pyralidae, come ad esempio: *Ephestia cautella*, *Ephestia kuehniella* e *Plodia interpunctella* (Pezzini *et al.*, 2017; Ghimire and Philips, 2014). Mediamente, lo sviluppo è di circa 12 giorni da uovo ad adulto, con metamorfosi che avviene dentro un bozzolo e la durata dello stadio pupale è di circa una settimana. Le dimensioni dell'adulto raggiungono appena i 2 mm di lunghezza e pesa meno di 1 mg (Mbata and Warsi, 2019); presenta dorso scuro e addome ventralmente più chiaro, testa e zampe marrone giallastre, ali trasparenti e membranose (Pezzini *et al.*, 2017). I maschi adulti sono mediamente più piccoli e con antenne più lunghe rispetto alle femmine la differenza più evidente per distinguere i due sessi è, tuttavia, la presenza dell'ovopositore nella femmina. Essa inizia a cercare possibili ospiti da parassitizzare immediatamente dopo lo stadio di pupa (Mbata and Warsi, 2019). *H. hebetor* si riproduce per partenogenesi arrenotoca, questo significa che, nel caso in cui non venga fecondata, la femmina genera solamente figli maschi (Mbata, Warsi 2019). L'ovopositore è l'organo specializzato con il quale la femmina esplora e fora il tegumento dell'ospite, inietta le sostanze prodotte dalle ghiandole accessorie tra le quali una tossina insetticida che induce una paralisi e poi la morte nelle larve ospiti. Una volta avvenuta la paralisi, la femmina torna per deporre le uova (Dweck *et al.*, 2008; Mbata and Warsi, 2019). L'uovo appare di color bianco opaco, con una superficie liscia, allungato (com'è tipico degli imenotteri), più o meno di forma ellittica, con misure medie di 0,52 mm di lunghezza e 0,12 mm di larghezza, estremità anteriore (cefalica) arrotondata e l'opposta leggermente appuntita. La larva si sviluppa in quattro stadi che differiscono principalmente per forma e dimensioni dei segmenti. La fase pupale avviene in un bozzolo di seta protettivo creato grazie alle ghiandole labiali. Durante questa fase si evidenziano le differenze tra maschi e femmina già descritte nell'adulto e, in una media di cinque giorni dopo la trasformazione in pupa, l'adulto rompe il bozzolo ed esce all'esterno (sfarfallamento) (Pezzini *et al.*, 2017).



**Figura 1:** femmina di *H. hebetor* (foto di Samuele Morao)



**Figura 2:** Femmina di *H. hebetor* nella fase di puntura della larva (foto di Samuele Morao)



### 1.3 *Ephestia kuehniella* ed *Ephestia cautella*

*Ephestia kuehniella*, appartiene all'ordine dei Lepidotteri, famiglia Pyralidae ed è un infestante delle derrate alimentari. Per via della sua colorazione tipica e della propensione ad infestare semole e farine è nota anche con il nome di Tignola grigia della farina. Originaria dell'Asia, grazie agli scambi commerciali e alla sua elevata capacità di adattamento è ora diffusa ovunque anche se è presente principalmente nelle zone mediterranee e temperate. *E. kuehniella* è l'infestante chiave delle industrie di lavorazione e stoccaggio della farina provocando danni economici e sanitari e creando inoltre le condizioni favorevoli per lo sviluppo di muffe, batteri e funghi (Süss and Locatelli 2001). Come altri lepidotteri, *E. kuehniella* è un olometabolo, ovvero presenta una metamorfosi completa, che consiste in una successione di stadi larvali diversi dall'adulto poi segue la crisalide, avviene la metamorfosi e così segue lo stadio adulto. L'adulto presenta due paia di ali: le anteriori sono di colore grigio cenere mentre le posteriori sono di colore bianco o grigio chiaro. Ha un'apertura alare di 20-25 mm e un corpo di 10-14 mm di lunghezza con antenne filiformi, può sopravvivere tra 1 e 2 settimane a temperature ottimali (25-27°). La femmina può deporre dalle 100 alle 400 uova che si schiudono in 5 giorni in condizioni di temperatura favorevole, tra 18°C e 32°C. Lo sviluppo larvale passa attraverso cinque stadi, distinti per dimensione, tuttavia, a seconda della temperatura, della fonte di cibo e sua abbondanza; la durata dei diversi stadi è variabile (Pérez *et al* 2012) ma mediamente di circa 30-40 giorni prima di passare alla fase di crisalide che, a sua volta, può protrarsi per un tempo compreso tra 1 e 12 settimane. (Trematerra and Süss, 2007; Nencetti *et al.* 2012). *Ephestia cautella* è anch'essa un lepidottero appartenente alla famiglia Pyralidae. È di origine tropicale (Süss and Guerra, 2021) e risulta essere molto importante a livello economico mondiale per i danni che può causare alle derrate alimentari (Ryne *et al.*, 2006). È un parassita molto temibile nelle industrie dove viene lavorato il cioccolato e la nocciola di cui rappresenta il maggior infestante (Süss and Locatelli, 2001), per questo è nota anche come tignola della frutta secca. L'adulto ha un'apertura alare di 14-20 mm, le ali anteriori sono di color nocciola chiaro con delle sottili bande trasversali più scure, le ali posteriori invece hanno una colorazione grigiastra. La femmina può deporre dalle 100 alle 350 uova, disperse sul substrato alimentare, dove l'incubazione dura circa 4-5 giorni. Il periodo larvale può durare 3-4 settimane (Trematerra and Süss, 2007). Anche le larve di *E. cautella* si sviluppano in cinque stadi (Allotey and Goswami, 1990). Ad una temperatura favorevole di 25-30°C il ciclo biologico viene completato in 4-5 settimane; lo sviluppo si completa ad un range di temperatura da 15°C a 36°C. In genere in un anno ci possono essere 2-4 generazioni (Trematerra and Süss, 2007). Per entrambe le specie, la fecondità dipende da diversi fattori quali la tipologia di cibo, la grandezza delle femmine, l'approvvigionamento idrico e le condizioni fisiche della femmina (Hidayati and Juhaeti, 2016).

#### 1.4 Scopo della tesi

*Habrobracon hebetor* è un antagonista naturale di diverse specie di tignole che recano danno alle derrate alimentari. Il panorama del controllo degli infestanti è in continua evoluzione, date le numerose restrizioni delle normative europee sull'utilizzo di biocidi di natura chimica. Ciò ha spinto la ricerca a concentrarsi sull'applicazione di metodi più rispettosi dal punto di vista ambientale e sanitario, e l'uso di nuovi approcci come l'*Integrated Pest Management* (IPM). L'IPM è un approccio ecologico alla gestione che promuove l'uso di metodi di controllo alternativi, tra cui l'uso di parassitoidi naturali come *H. hebetor*, che può essere utilizzato come agente per il controllo biologico degli insetti infestanti, andando a ridurre l'uso e i danni collaterali degli insetticidi tradizionali sulla salute umana e l'ambiente. Lo studio riportato ha osservato alcuni aspetti della biologia ed etologia di *H. hebetor*, con lo scopo di ottimizzare l'allevamento in massa di quest'ultimo. Nello specifico sono state raccolte le seguenti informazioni:

- La preferenza della femmina del parassitoide nei confronti di due ospiti (*E. cautella* ed *E. kuehniella*)
- il tempo che intercorre tra l'inizio dell'esposizione del parassitoide e l'aggressione delle larve
- il numero di uova deposte sui due ospiti considerati
- il numero di adulti sfarfallati e la loro sex ratio

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Gestione dell'allevamento

Gli ospiti, *Ephestia cautella* ed *Ephestia kuehniella*, sono stati forniti, allo stadio larvale e di uova, dal laboratorio entomologico Entostudio (Viale del Lavoro, 66, 35020, Padova). Entrambi gli ospiti sono stati allevati all'interno di contenitori di plastica trasparente di 11 cm di altezza e 9 cm di diametro, riempiti per circa il 50% in volume con il substrato di alimentazione. I barattoli erano inoltre provvisti di un coperchio dotato di una retina anti-acaro per l'arieggiamento e impedire la fuga delle larve. Il substrato per lo sviluppo delle larve era composto da: farina di mais (50%), farina di frumento (25%), miele (20%), muesli tritato (2,5%), crusca (2,5%), lievito e il tutto amalgamato con glicerolo. Una volta messo il substrato di alimentazione, venivano inserite dalle 100 alle 200 uova della specie ospite. Dopo circa 25 giorni dalla schiusa delle uova, era possibile procedere a cercare esemplari di larve con dimensioni abbastanza grandi, che potessero fungere da ospiti per *H. hebetor*. Le larve restanti nel barattolo invece, una volta raggiunta la fase adulta venivano successivamente spostati in un altro barattolo di plastica trasparente (30 cm di altezza e 15 cm di diametro), posizionato con l'apertura verso basso, provvista di retina, per permettere la raccolta delle uova in un raccogliatore sottostante. Queste venivano successivamente raccolte con un ulteriore setaccio per filtrare residui non utili (scaglie alari e polveri varie) che erano passati attraverso la prima retina ed infine venivano utilizzate per continuare l'allevamento, in analoghi contenitori precedentemente descritti. Gli esemplari di *Habrobracon hebetor* sono stati forniti (allo stadio pupale) dalla ditta tedesca Biologische-Beratung (Storkower Str. 55a, 10409, Berlino). Le pupe sono state poste all'interno di un contenitore in plastica di dimensioni 18 x 13 x 7 cm, il coperchio è stato dotato di una retina anti-acaro per il ricircolo dell'aria ed una Eppendorf tagliata sul fondo, per permettere l'introduzione di individui dall'esterno tramite aspiratore. Una volta arrivati allo stadio adulto, i parassitoidi potevano accoppiarsi e nutrirsi attraverso una miscela di acqua e miele 1:1 somministrata in gocce sulla retina del contenitore. Parallelamente, posizionavamo 10-15 larve di larva ospite e 4 femmine di *H. hebetor* fecondate, all'interno di una piastra Petri, dopo 4 giorni le femmine venivano rimosse e le larve nate venivano lasciate libere di nutrirsi all'interno della Petri a 25°C. Dopo circa 11-12 giorni iniziavano a sfarfallare i primi adulti e questi venivano raccolti e inseriti in una nuova gabbia per l'accoppiamento per proseguire con l'allevamento.

## 2.2 Test choice

Lo scopo di questo esperimento è quello di valutare se vi sia una preferenza da parte di *Habrobracon hebetor* nella scelta dell'ospite su cui deporre le uova. Venivano quindi poste due larve, una di *Ephestia cautella* ed una di *Ephestia kuehniella*, di simili dimensioni (del quarto o quinto stadio larvale), all'interno di una piastra Petri. Successivamente veniva introdotta una femmina di *H. hebetor* la quale poteva pungere e deporre le uova sui due ospiti. Nella prima ora si prendeva nota del tempo trascorso dall'introduzione del parassitoide all'aggressione di ogni larva ospite. Passata l'ora, si rilevava con uno stereomicroscopio, il numero di uova deposte dopo 1, 4 e 24 ore. Una volta trascorse, la femmina di *H. hebetor* veniva rimossa dalla piastra Petri. Ulteriormente a questi dati, sono stati contati gli adulti dei parassitoidi sfarfallati. Sono state svolte 34 repliche in totale, i test choice sono stati svolti ad una temperatura di 25.4°C e le Petri sono state mantenute ad una temperatura di 25°C.

## 2.3 Analisi dei dati

Con il test choice si è andati a valutare: 1) il tempo in minuti dall'inserimento di *H. hebetor* alla prima puntura sulle larve di *E. cautella* e *E. kuehniella*, 2) il numero di uova presenti sulle larve ospite dopo 1 ora, 3) dopo 4 ore e 4) dopo 24 ore 5) il numero di parassitoidi adulti sfarfallati e la loro sex ratio. Per effettuare i confronti, si è utilizzato il test t di Student per dati appaiati. Le differenze tra i confronti vengono considerate significative qualora i p-value risultino minori di 0.05. Tutte le analisi sono state effettuate tramite il software R (R Code Team, 2021).

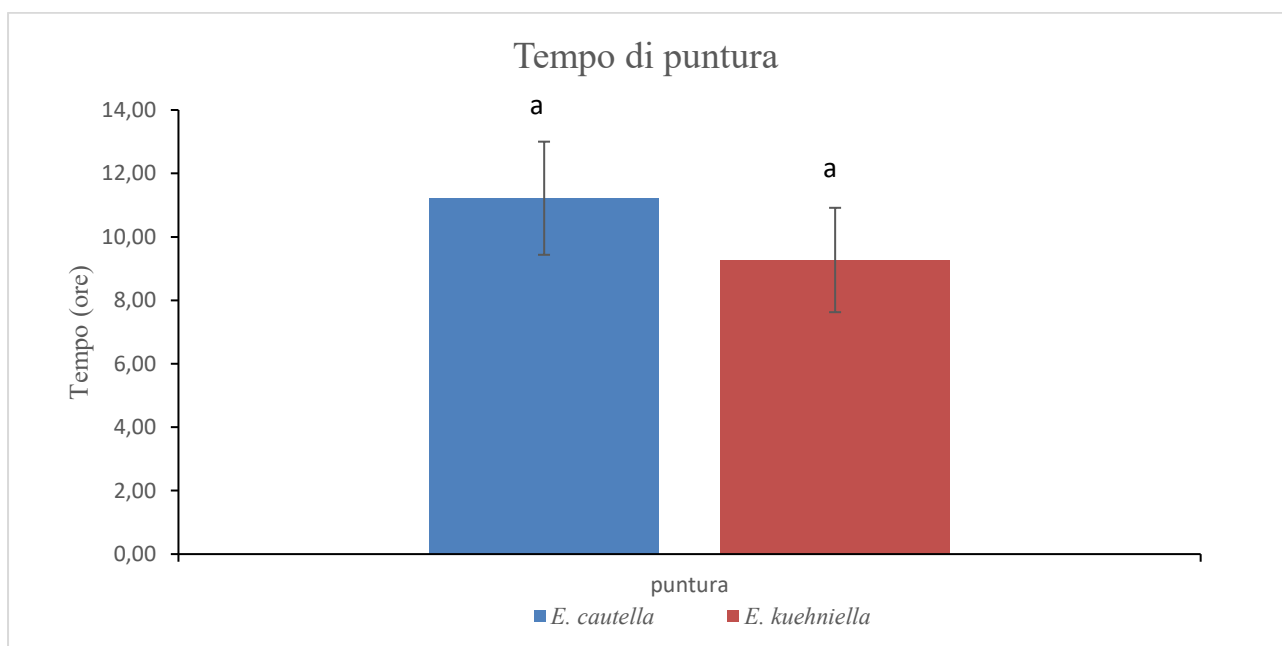
### 3. RISULTATI

L'obiettivo della prova era la valutazione della preferenza del parassitoide *Habrobracon hebetor* tra i due ospiti *Ephestia kuehniella* ed *Ephestia cautella*. Avendo notato che *H. hebetor* non aggrediva la larva nella prima ora e neppure deponeva uova, sono stati riportati solamente i dati riferiti a 4 e 24 ore; se l'aggressione avveniva nell'arco delle 4 o 24 ore si riportava il tempo di puntura equivalente al tempo in cui veniva eseguito il controllo. È stata osservata una percentuale di parassitizzazione dell' 80% per *E. cautella* e del 69% per *E. kuehniella*. Il numero totale di uova di uova è risultato 112 su *E. cautella* e 117 su *E. kuehniella*. Dalle uova deposte sono sfarfallati 23 femmine e 54 maschi per *E. cautella* e con una sex ratio (femmine/maschi) di 0,43; 10 femmine e 51 maschi per *E. kuehniella* con una sex ratio di 0,20 (tabella 1).

	<b>Ephestia cautella</b>	<b>Ephestia kuehniella</b>
<b>% larve parassitizzate</b>	80	69
<b>totale uova</b>	112	117
<b>femmine totali</b>	23	10
<b>maschi totali</b>	54	51
<b>Sex ratio (F/M)</b>	0,43	0,20

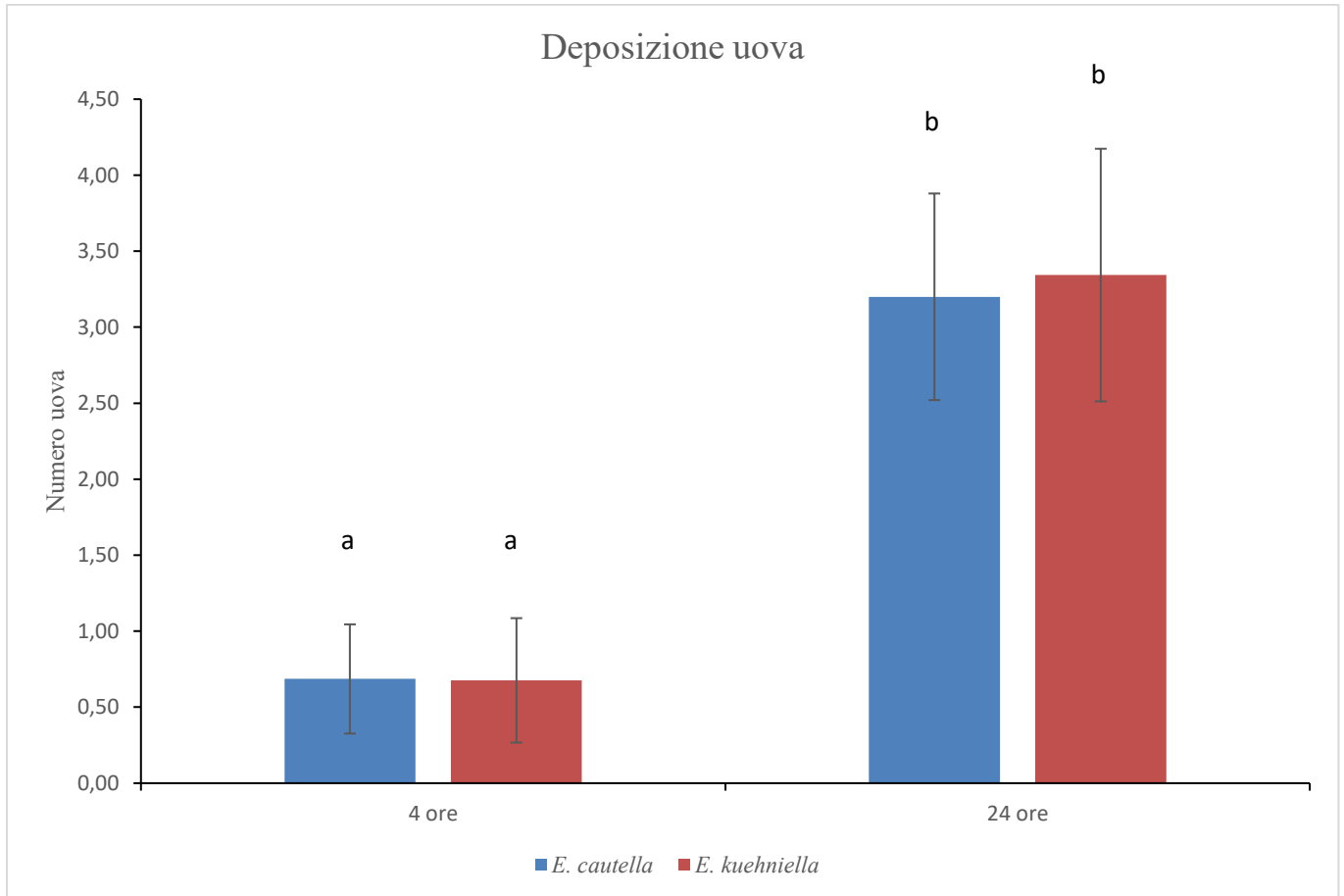
**Tabella 1**

Dalle prove sperimentali non risultano differenze significative ( $p > 0,05$ ) riguardo al tempo dall'inserimento della femmina di *H. hebetor* e la puntura degli ospiti: *E. cautella* ( $t = 11,22 \pm 1,78$  ore) ed *E. kuehniella* ( $t = 9,27 \pm 1,64$  ore) (fig.3).



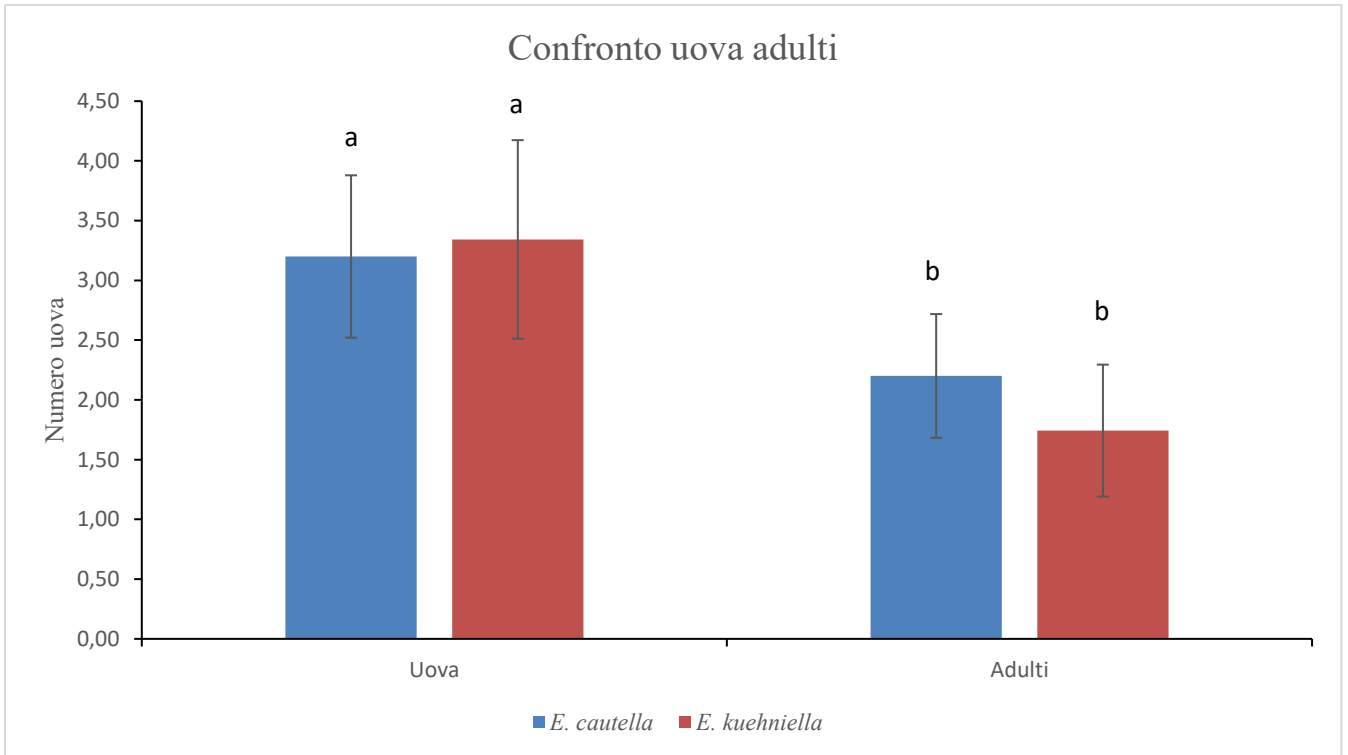
**Figura 3:** tempi medi ( $11,22 \pm 1,78$  ore per *E. cautella* e  $9,27 \pm 1,64$  ore per *E. kuehniella*) intercorsi dall'inserimento delle femmine di *H. hebetor* alla puntura ( $p > 0,05$ ).

Nessuna deposizione di uova è stata osservata nella prima ora. Analogamente al tempo di puntura, nessuna differenza significativa ( $p > 0,05$ ) si ottiene per il numero di uova deposte a 4 ore: *E. cautella* ( $0,68 \pm 0,35$  uova), *E. kuehniella* ( $0,67 \pm 0,41$  uova) e a 24 ore: *E. cautella* ( $3,20 \pm 0,68$  uova), *E. kuehniella* ( $3,34 \pm 0,83$  uova) (fig. 4).



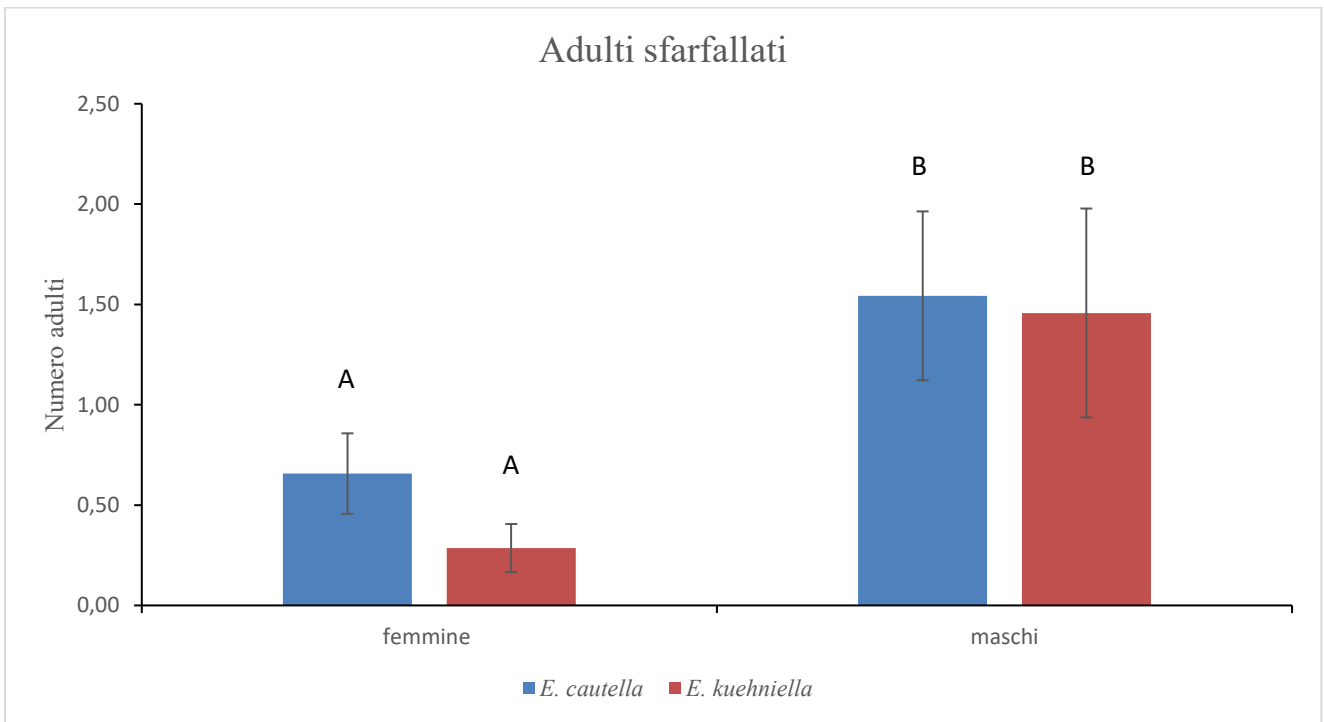
**Figura 4:** numero di uova deposte mediamente dopo 4 ore (*E. cautella*  $0,68 \pm 0,35$  uova, *E. kuehniella*  $0,67 \pm 0,41$  uova) e 24 ore (*E. cautella*  $3,20 \pm 0,68$  uova, *E. kuehniella*  $3,34 \pm 0,83$  uova) dalle femmine di *H. hebetor* sulle larve ospiti ( $p > 0,05$ ).

Lo studio del confronto tra uova deposte e adulti sfarfallati tra le specie ospiti non ha riscontrato differenza significativa, mentre risulta significativa ( $p < 0,05$ ) all'interno della stessa specie per entrambe le piralidi: *E. cautella* ( $3,20 \pm 0,68$  uova;  $2,20 \pm 0,52$  adulti), *E. kuehniella* ( $3,34 \pm 0,83$  uova;  $1,74 \pm 0,55$  adulti) (fig. 5).



**Grafico 5:** confronto uova deposte e adulti sfarfallati in media di *H. hebetor* dalle larve ospiti: *E. cautella* ( $3,20 \pm 0,68$  uova;  $2,20 \pm 0,52$  adulti), *E. kuehniella* ( $3,34 \pm 0,83$  uova;  $1,74 \pm 0,55$  adulti).

Si nota una tendenza alla significatività ( $p = 0,051$ ) nel numero di femmine sfarfallate tra le due specie in favore di *E. cautella* (fig.6).



**Grafico 6:** rappresentazione del numero medio di femmine e maschi di *H. hebetor* sfarfallati dalle uova deposte su *E. cautella* ed *E. kuehniella*.



**Tabella 2:** Risultati repliche sperimentali *E. cautella*

Repliche	t puntura (s)	N° uova 4 h	N° uova 24 h	Femmine	Maschi	Tot
1	4,00	0	4	1	1	2
2	4,00	0	0	0	0	0
3	24,00	0	0	0	0	0
6	NA	0	0	0	0	0
8	NA	0	0	0	0	0
9	NA	0	0	0	0	0
10	4,00	0	7	2	4	6
11	4,00	7	9	2	6	8
12	4,00	0	11	2	3	5
13	0,30	0	4	3	1	4
14	0,20	4	6	2	5	7
15	4,00	0	5	0	5	5
16	0,67	10	12	0	10	10
17	4,00	0	0	0	0	0
18	4,00	2	9	0	7	7
19	24,00	0	0	0	0	0
20	0,68	1	5	0	0	0
21	24,00	0	0	0	0	0
22	24,00	0	8	2	2	4
23	0,27	0	4	2	2	4
24	24,00	0	10	0	0	0
25	NA	0	0	0	0	0
26	24,00	0	9	2	4	6
27	24,00	0	0	0	0	0
28	NA	0	0	0	0	0
29	24,00	0	7	5	2	7
30	24,00	0	0	0	0	0
31	24,00	0	0	0	0	0
32	NA	0	0	0	0	0
33	NA	0	0	0	0	0
34	4,00	0	2	0	2	2
35	4,00	0	0	0	0	0
36	4,00	0	0	0	0	0
37	4,00	0	0	0	0	0
38	24,00	0	0	0	0	0

**Tabella 3:** Risultati repliche sperimentali *E. kuehniella*

Repliche	t puntura (s)	N° uova 4 h	N° uova 24 h	Femmine	Maschi	Tot
1	4,00	0	5	0	5	5
2	0,90	0	0	0	0	0
3	NA	0	0	0	0	0
6	NA	0	0	0	0	0
8	NA	0	0	0	0	0
9	NA	0	0	0	0	0
10	4,00	0	0	0	0	0
11	4,00	0	7	2	3	5
12	0,53	12	18	0	0	0
13	4,00	0	5	3	2	5
14	4,00	0	7	2	5	7
15	4,00	0	5	0	5	5
16	0,83	4	15	0	14	14
17	4,00	0	0	0	0	0
18	0,25	7	10	0	10	10
19	24,00	0	1	1	0	1
20	4,00	0	9	0	0	0
21	4,00	0	4	1	2	3
22	4,00	0	3	1	2	3
23	NA	0	0	0	0	0
24	24,00	0	15	0	0	0
25	NA	0	0	0	0	0
26	4,00	0	5	0	2	2
27	24,00	0	0	0	0	0
28	NA	0	0	0	0	0
29	24,00	0	3	0	1	1
30	24,00	0	0	0	0	0
31	4,00	0	5	0	0	0
32	NA	0	0	0	0	0
33	24,00	0	0	0	0	0
34	4,00	0	0	0	0	0
35	NA	0	0	0	0	0
36	NA	0	0	0	0	0
37	24,00	0	0	0	0	0
38	NA	0	0	0	0	0

#### 4. DISCUSSIONE

Dall'analisi dei dati sperimentali non emerge una differenza statisticamente significativa per il tempo trascorso dall'inserimento della femmina all'attacco delle larve delle specie ospite ( $p > 0,05$ ). Il numero di uova deposte dopo 4 e 24 ore non dimostra alcuna differenza statisticamente significativa tra *Ephestia cautella* ed *Ephestia kuehniella* ( $p > 0,05$ ), indicando che non c'è una preferenza verso una delle larve ospiti, con un numero di uova deposte mediamente dopo 4 ore (*E. cautella*  $0,68 \pm 0,35$  uova, *E. kuehniella*  $0,67 \pm 0,41$  uova) e 24 ore (*E. cautella*  $3,20 \pm 0,68$  uova, *E. kuehniella*  $3,34 \pm 0,83$  uova) ( $p > 0,05$ ). Prendendo in esame i dati dello studio di Farag *et al.* (2012), il numero di uova risulta essere 9,45 dopo 24 ore, un risultato maggiore di quello riscontrato in questa tesi. L'osservazione di queste differenze fa scaturire diverse ipotesi: una potrebbe essere che nello studio Farag *et al.* (2012), è stata sperimentata la fecondità di 20 femmine di *H. hebetor* in presenza di maschi in egual numero, su un totale di 40 larve di *E. cautella*, in modo da permettere la possibilità continua di fecondazione; invece, nel caso del nostro studio è stata inserita una sola femmina, prelevata a 5 giorni dopo lo sfarfallamento, con 2 larve di specie differenti e in assenza del maschio, data per assodata la fecondazione nei giorni precedenti. Si pone anche il quesito su quale sia il periodo del ciclo vitale in cui le femmine di *H. hebetor* siano più efficienti nella deposizione di uova. Tornando allo studio di Mbata e Warsi (2019), viene riportato infatti che il numero di uova deposte nell'arco di 22 giorni da una femmina di *H. hebetor* sia in media 173,7 uova, e quindi una media giornaliera di quasi 8 uova, un dato paragonabile a quello riscontrato da Farag *et al.* (2012), ma nessun dato viene fornito su andamento e picco di deposizione delle uova. Questo potrebbe rappresentare un ulteriore ambito di indagine e approfondimento al fine di identificare con più precisione il periodo di massima deposizione delle uova. La differenza tra uova deposte e adulti sfarfallati di *H. hebetor* risulta significativa all'interno della stessa specie: *E. cautella* ( $3,20 \pm 0,68$  uova;  $2,20 \pm 0,52$  adulti;  $p = 0,011$ ), *E. kuehniella* ( $3,34 \pm 0,83$  uova;  $1,74 \pm 0,55$  adulti;  $p = 0,029$ ). Non vi è alcuna differenza invece nel confronto degli stessi valori tra le specie ospite in esame. Questo potrebbe far presupporre che non vi siano differenze tra le specie ma, dato il numero ridotto di adulti sfarfallati rispetto alle uova, si potrebbe ipotizzare che, avendo solo due larve a disposizione, queste non fossero sufficienti per sostenere più individui scaturendo così una competizione tra le larve di *H. hebetor*. Altro parametro che potrebbe spiegare le scarse prestazioni dei parassitoidi tra cui: numero di uova deposte, adulti sfarfallati e sex ratio, è la temperatura a cui sono state conservate le larve ospiti ( $16^{\circ}\text{C}$ ). Questo è dovuto alla necessità, data la ridotta disponibilità di larve all'interno del laboratorio, di rallentarne la crescita e utilizzare larve prossime allo stadio di pupa, in modo da poterle utilizzare per la parassitizzazione. È possibile che i parassitoidi non le abbiano trovate come ospiti appropriati; sarebbe quindi interessante uno studio in cui si confronti la parassitizzazione di larve tenute a diverse temperature e tempi di esposizione a queste ultime. Un'altra ipotesi, anche se meno probabile,

potrebbe essere che durante la manipolazione della larva ospite per la conta delle uova di *H. hebetor*, esse siano state inavvertitamente danneggiate. Per dirimere tali dubbi si potrebbe provare, ad esempio, a testare le condizioni ideali per lo sviluppo delle larve e raccogliere dati sul periodo di massimo picco di deposizione di uova mature dallo sfarfallamento. Gli adulti sfarfallati mostravano una sex ratio (femmine/maschi) pari a 0,43 per *E. cautella* e; 0,20 per *E. kuehniella*, i valori di sex ratio riscontrati in altri studi variano notevolmente in base a molteplici fattori tra cui: il numero di larve ospiti disponibili, la loro dieta, lo stadio larvale e l'età dei parassitoidi. Ad esempio, nello studio di Jamil (2015) il valore di sex ratio (femmine/maschi) con due larve ospiti disponibili risulta 1,22 e scende all'aumentare del numero di larve. Un altro studio (Eliopoulos 2008), invece ha riscontrato 0,56 (femmine/maschi). La differenza del numero di femmine sfarfallate dalle specie ospiti mostra una tendenza alla significatività ( $p = 0,051$ ) in favore delle femmine di *E. cautella*. Un probabile fattore a spiegazione di questa sex ratio potrebbe essere il fatto che alcune femmine non siano state fecondate e quindi questo abbia causato la nascita di soli maschi in alcune repliche sperimentali. Le femmine, infatti, evitano l'accoppiamento con maschi prodotti nella stessa deposizione di uova (Mbata, Warsi 2019; Ode, Antolin *et al* 1995). Ulteriori studi potrebbero verificare tale ipotesi, ad esempio, ripetere le prove alle stesse condizioni ma con la presenza del maschio all'interno della piastra Petri per assicurare la fecondazione. In generale considerando anche i risultati sperimentali ottenuti in precedenza (Morao 2022, Gant 2023) gli *H. hebetor* risultano parassitizzare di meno rispetto a prove sperimentali di simile impostazione e svolte utilizzando gli stessi allevamenti di ospiti e parassitoidi. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che le femmine non sono più performanti a causa di un impoverimento del materiale genetico nella popolazione dell'allevamento. Una possibile prova per scartare quest'ipotesi potrebbe essere valutare l'efficacia di parassitizzazione di diverse generazioni di *H. hebetor* o comparare la fitness delle femmine delle diverse generazioni così da stabilire quando sarebbe il momento di integrare l'allevamento con degli esemplari provenienti da popolazioni esterne. Ulteriori studi sono necessari per la risposta alle numerose domande derivate da queste prove pilota.

## 5. CONCLUSIONI

Dai risultati sperimentali possiamo concludere che non c'è una differenza significativa per il tempo di puntura, numero uova, adulti sfarfallati di *H. hebetor*. Si rileva una tendenza alla significatività per il numero di femmine ottenute tra le due specie ospiti, che andrebbe approfondita con ulteriori prove. La differenza tra il numero di uova deposte e il numero di adulti sfarfallati all'interno della stessa specie potrebbe indicare una competizione negativa a livello larvale. Le due specie ospiti quindi si comportano in modo simile tra loro, di conseguenza, anche se i parassitoidi sono stati allevati con *E. cautella* per diverse generazioni, questi possono essere impiegati anche contro la specie *E. kuehniella*. Nello studio Ghimire and Phillips (2014) è stata valutata l'efficacia di *H. hebetor*, allevato per diverse generazioni su *Plodia interpunctella*, anche su altre specie ospiti tra cui *E. cautella* ed *E. kuehniella*. Per quanto le migliori performance del parassitoide si siano verificate con *P. interpunctella*, in quanto presumibilmente adattato ad essa, si sono verificate buone prestazioni, a volte anche migliori con altri ospiti. Questo dimostra che le specie ospiti possono avere un effetto significativo su molti aspetti dei parametri riproduttivi del parassitoide. Alcune ipotesi scaturite da queste analisi sono: la possibile deriva del pool genetico della popolazione dell'allevamento che potrebbe aver alterato la fecondazione da parte del maschio oppure, ancora più probabile, l'influenza della temperatura di conservazione delle larve che potrebbe aver alterato le prestazioni di *H. hebetor*: dalla deposizione delle uova della femmina, alla possibile schiusa e alla loro sex ratio. Appare necessario studiare in maniera approfondita la biologia e l'etologia degli antagonisti naturali come *H. hebetor* che, se usati in modo consapevole, si possono adattare al meglio a protocolli di azione, che rispettino l'IPM (*Integrated Pest Management*), riducendo così le popolazioni di piralidi infestanti, con minor utilizzo di prodotti chimici. Ricerche future permetteranno di raccogliere ulteriori informazioni necessarie a perfezionare queste nuove tecniche.

## BIBLIOGRAFIA

Albajes R., Madeira F., Current status of integrated pest management (IPM) in Europe. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, LXV: 45-51, 2017.

Allotey, J., Goswami, L., 1990. Comparative Biology of two Phycitid Moths, *Plodia interpunctella* (Hubn.) and *Ephestia cautella* (Wlk.) on some Selected Food Media. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 11, 209–215. <https://doi.org/10.1017/S1742758400010596>.

Antolin M. F. e Strand M. R., «Variable sex ratio and ovicide in an out breeding parasitic wasp, » *Animal Behaviour*, vol. 17, pp. 1-7, 1995.

Barbagallo S., «Il controllo degli insetti dannosi, un processo evolutivo tra chimica e biotecnologie» pp. 359-367.

Barzman, M., Barberi, P., Birch, A.N.E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., Graf, B., Hommel, B., Jensen, J.E., Kiss, J., Kudsk, P., Lamichhane, J.R., Messean, A., Moonen, A.-C., Ratnadass, A., Ricci, P., Sarah, J.-L., Sattin, M., 2015. Eight principles of integrated pest management. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 1199e1215.

Belcari A. *Gestione integrata degli animali infestanti nelle industrie alimentari*, Firenze: Firenze University Press, 2012.

Champ, B.R.; Dyte, C.E. FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. *FAO Plant Prot. Bull.* 1977, 25, 49–67.

Damalas Christos A. and Eleftherohorinos Ilias G., 2011, Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2011, 8, 1402-1419.

Dent, D. (2000) *Insect Pest Management*, CABI.

Dubey N. K., Bhawana Srivastava and Ashok Kumar, 2008, Current Status of Plant Products as Botanical Pesticides in storage pest management, *Journal of Biopesticides*, 1(2):182 - 186 (2008).

Dweck, H.K.M., Gadallah, N.S., Darwish, E., 2008. Structure and sensory equipment of the ovipositor of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). *Micron* 39, 1255– 1261. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.03.012>.

Eliopoulos P. A., G. J. Stathas, Life Tables of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) Parasitizing *Anagasta kuehniella* and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Effect of Host Density, *Journal of Economic Entomology*, Volume 101, Issue 3, 1 June 2008, Pages 982–988, <https://doi.org/10.1093/jee/101.3.982>.

Farag, M., Ahmed, S., El-Hussieni, M., 2012. Life history of *habrobracon hebetor* say (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Cadra (ephestia) cautella* (walker) (Lepidoptera: Pyralidae) on dried date fruits. *Egypt. J. Biol. Pest Control* 22, 73–77.

Franklin, A., Phillips, T.M., 2003. Stored-product insect pest management and control, in: *Food Plant Sanitation, Food Science and Technology*. New York, pp. 341–358.

Gant G. 2022/2023 Possibilità di controllo degli insetti infestanti le derrate alimentari mediante antagonisti naturali: indagini biologiche ed etologiche su *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae).

Ghimire, M.N., Phillips, T.W., 2014. Oviposition and reproductive performance of *Habrobracon hebetor* (hymenoptera: braconidae) on six different pyralid host species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 107, 809–817. <https://doi.org/10.1603/AN14046>.

Hidayati, N., Juhaeti, T., 2016. Biological diversity contribution to reduce CO<sub>2</sub> in the atmosphere 5: CO<sub>2</sub> absorption of highland and lowland tree species at different level of light intensities, in: *Proceedings the 6th International Symposium for Sustainable Humanosphere: Integrating Bio-Resources and Advanced Technology for Sustainable Development*. Bogor.

Jamil Anam, Abidin Zain ul, Arshad Muhammad, Falabella Patrizia, Abbas Saqi Kosar, Tahir Muhammad, Jamil Amer, Manzoor Atif and Shaina Hoor ; *Pakistan J. Zool.*, vol. 47(2), pp. 455-460, 2015. Multiple Effects of Host Density on Egg Density and the Sex Ratio of Progeny of *Bracon hebetor* (Say.) (Hymenoptera: Braconidae).

Khare, B.P. 1994. Pests of stored grain and their management. Kalyani Publishers, New Delhi. 304 pp.

Mahmood, I., Imadi, S.R., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K.R., 2016. Effects of pesticides on environment, in: Hakeem, K.R., Akhtar, M.S., Abdullah, S.N.A. (Eds.), Plant, Soil and Microbes. Springer International Publishing, Cham, pp. 253–269. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13).

Mbata, G.N., Shapiro-Ilan, D.I., 2010a. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biol. Control* 54, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.04.009>.

Mbata, G., Warsi, S., 2019. *Habrobracon hebetor* and *Pteromalus cerealellae* as tools in post-harvest integrated pest management. *Insects* 10, 85. <https://doi.org/10.3390/insects10040085>.

Morao S. 2021/2022 Messa a punto di tecniche di allevamento di *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae) e indagini sul comportamento riproduttivo.

Nencetti A., Bacciotti D., Macchione P. e Giancchetti U., I principali Artropodi parassiti degli alimenti, 2012, pp. 73-115.

Pérez J., Ramírez S. e Suris M., «Biología de *Plodia interpunctella* Hubner sobre garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones de laboratorio,» *Revista de Protección Vegetal*, vol. 27, n. 2, 2012.

Peshin, R. and Dhawan, A.K. (2009) *Integrated Pest Management: Volume 1: Innovation-Development Process*, Springer Science & Business Media.

Pezzini C., Mundstock S. Jahnke e Köhler A., «Morphological characterization of immature stages of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae) ectoparasitoid of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae), » *Journal of Hymenoptera Research*, vol. 60, pp. 157-171, 2017.

Reichmuth Ch. (1996) Stored product protection with alternative methods. In *Proceedings of the International 64 Forum on Stored Product Protection and Post-harvest Treatment of Plant Products* pp. 129-135.



Ryne, C., Ekeberg, M., Jonzén, N., Oehlschlager, C., Löfstedt, C., Anderbrant, O., 2006. Reduction in an almond moth *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) population by means of mating disruption. *Pest Manag. Sci.* 62, 912–918. <https://doi.org/10.1002/ps.1256>.

Smith, R., 2015. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009, in: *Core EU Legislation*. Macmillan Education UK, London, pp. 423–426. [https://doi.org/10.1007/978-1-137-54482-7\\_44](https://doi.org/10.1007/978-1-137-54482-7_44).

Stejskal, V., Vendl, T., Aulicky, R., Athanassiou, C., 2021. Synthetic and natural insecticides: gas, liquid, gel and solid formulations for stored-product and food-industry pest control. *Insects* 12, 590. <https://doi.org/10.3390/insects12070590>.

Stern, V.M. et al. (1959) The integrated control concept. *Hilgardia* 29, 81–101.

Süss, L., Locatelli, D.P., 2001. *I parassiti delle derrate. Riconoscimento e gestione delle infestazioni nelle industrie alimentari*. Edagricole, Bologna.

Süss, L., Guerra, P., 2021. *Gli infestanti nelle industrie alimentari: la gestione sulle derrate e nell'industria: riconoscimento, modalità di prevenzione, monitoraggio e lotta*. Avenue media, Bologna.

Trematerra, P., Süss, L., 2007. *Prontuario di entomologia merceologica e urbana*. Aracne, Roma.

Tremblay E. – *Entomologia Applicata – Vol. I*, Liguori editore, Napoli, 282 pp., 2003.

