

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Dipartimento Territorio e Sistemi Agro Forestali

Corso di laurea in Tecnologie Forestali e Ambientali

Indagini bioacustiche per l'identificazione di larve di coleotteri cerambicidi
(Coleoptera Cerambycidae)

Relatore

Prof. Massimo Faccoli

Correlatore

Dott. Riccardo Favaro

Laureanda: Francesca Eliana Rigato

Matricola n. 1005742

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

Indice

ABSTRACT	v
RIASSUNTO	vii
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Le specie "aliene"	1
1.2 Prevenzione	1
1.3 Metodi di ispezione	3
1.3.1 Ispezione visiva	3
1.3.2 Raggi X	3
1.3.3 Uso dell'olfatto dei cani	3
1.3.4 Rilevamento acustico	4
1.4 Acustica e insetti	4
1.4.1 Il suono	4
1.4.2 Fattori influenti	5
1.4.3 Suoni prodotti dagli insetti	5
1.5 Monitoraggio acustico e rilevamento automatico	6
1.5.1 Generalità sul monitoraggio acustico	6
1.5.2 Monitoraggio acustico d'insetti all'interno di piante e legno	6
1.5.3 Criteri nella scelta e nell'uso dei sensori	6
1.5.4 Rilevamento automatico	7
1.5.5 Analisi del suono	7
1.5.6 Spettrogramma	7
1.5.7 Come il suono appare in uno spettrogramma	8
1.5.8 Importanza dell'identificazione di <i>Anoplophora glabripennis</i>	8
1.6 Obiettivi del lavoro	9
2. MATERIALI E METODI	11
2.1 Specie oggetto di studio	11
2.1.1 <i>Anoplophora glabripennis</i>	11
2.1.2 Breve descrizione dell'insetto	11
2.1.3 Cenni di biologia	12
2.2 Raccolta del materiale biologico	12
2.3 Descrizione delle prove	14
2.3.1 Allevamento degli insetti	14
2.4 Registrazioni acustiche	16
2.4.1 Sensore, amplificatore, microfono	16

2.4.2	Scatola insonorizzata	17
2.4.3	Software Audacity	18
2.5	Analisi dei dati	19
2.5.1	Audacity	19
2.5.2	R statistics	19
3.	RISULTATI	23
3.1	Analisi <i>Crest</i>	23
3.2	Analisi <i>TH</i>	26
3.3	Analisi <i>TimeR</i>	27
3.4	Medie e SEM	28
3.5	Lunghezza e rappresentazione grafica dei segnali	28
4.	DISCUSSIONE	31
5.	Ringraziamenti	33
6.	BIBLIOGRAFIA	35

ABSTRACT

In recent years, alien species have an increasing relevance. Trade and human activities have accelerated and aggravated this situation with all the consequences on environments and ecosystems' equilibrium. European Union and other organizations such as the EPPO, established several laws on trade to control import and export. Prevention, early diagnosis, timely interventions should be the first instruments to avoid this kind of problem. Control and eradication are often difficult and expensive operations. Technology is becoming an important means of control and inspection to detect the presence of alien species in commercial infested material. The acoustic monitoring could be used not only for detection but also for monitoring of any outbreak. Between the insects' sounds, we detected sounds emitted by larvae during the feeding inside the host plant, which depend on physical properties of the material and larval behaviour. The sound detection occurs by placing a sensor on the wooden surface and connecting it to a microphone that records trophic larva signals and silences in a certain period of time. Our main studied species is *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky), the "Asian Longhorned Beetle (ALB)", which is a Coleoptera Cerambycidae from China and Korea, considered highly invasive and polyphagous on deciduous trees with a preference for plants growing in urban areas. It is important to check its presence on imports and trade in goods to prevent its spread through human activities. Bioacoustics aims to achieve this purpose. This study examined 5 Cerambycidae species within different wood species: each infested log was placed inside a soundproof box with the respective sensor and microphone. Sounds obtained were all analysed and processed with different softwares to determine the presence of differences between the different species in relation to three parameters: peak-to-average ratio of the wave, temporal entropy and temporal duration of the signal in relation to the silences. With ANOVA analyses and Tukey Test there were significant differences between species depending on the different parameters. This study, however, can be defined as a precursor to future works in the field of bioacoustics as a tool for insects detection.

RIASSUNTO

Il problema delle specie di insetti alloctoni sta avendo negli ultimi anni una rilevanza sempre maggiore; lo scambio commerciale e le attività antropiche hanno accelerato ed aggravato l'introduzione di specie non endemiche in diversi paesi del mondo con relative conseguenze sull'ambiente e sull'equilibrio degli ecosistemi. Sono state istituite diverse leggi sugli scambi commerciali da parte dell'Unione Europea e di diverse organizzazioni quali la EPPO, per controllare le importazioni e le esportazioni e così limitare questo fenomeno: la prevenzione e la diagnosi tempestiva con interventi rapidi devono essere i primi strumenti per evitare questo tipo di fenomeno. Il controllo e l'eradicazione ad invasione avvenuta sono spesso operazioni difficili e dispendiose. La tecnologia sta prendendo sempre più piede come strumento di controllo ed ispezione: dall'ispezione visiva e all'uso dell'olfatto dei cani si passa all'uso dei raggi x, fino ad arrivare ad oggi a voler servirsi della bioacustica per rilevare le specie aliene presenti nel materiale commerciale infestato. Il monitoraggio acustico potrebbe essere utilizzato non solo per il rilevamento ma anche per il monitoraggio di eventuali focolai. Tra i suoni prodotti dagli insetti sono stati rilevati quelli accidentali prodotti durante il nutrimento all'interno della pianta ospite, che dipendono dalle proprietà fisiche del materiale e dal comportamento larvale. Il rilevamento acustico dei segnali prodotti dalle larve avviene ponendo un sensore sulla superficie legnosa e collegandolo ad un microfono che registra in memoria segnali e silenzi dell'attività trofica della larva in un certo periodo di tempo. La principale specie oggetto di studio è *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) "Asian Longhorned Beetle (ALB) " un coleottero cerambicide proveniente da Cina e Corea, considerato altamente invasivo e polifago su latifoglie arboree con preferenza per piante in ambito urbano. È importante identificare la presenza dell'insetto sulle importazioni e lo scambio commerciale tra paesi per evitare la diffusione tramite vettori antropici. La bioacustica mira a raggiungere questo scopo. Lo studio è stato svolto prendendo in esame 5 specie di coleotteri cerambici all'interno di diverse specie legnose: ogni tronchetto è stato posto dentro una scatola insonorizzata con relativo sensore e microfono. I file sonori ottenuti sono stati tutti analizzati ed elaborati con diversi software per andare a determinare la presenza di differenze tra le diverse specie in relazione a 3 parametri: rapporto picco-media dell'onda, entropia temporale e durata del segnale in rapporto ai silenzi. A seguito dell'analisi ANOVA e del Test di Tukey sono state trovate differenze significative tra alcune specie che possono differenziarsi dalle altre a seconda dei diversi parametri considerati. Questo studio, essendo il primo svolto sulla bioacustica con un approccio statistico rispetto ai precedenti, può definirsi propedeutico a futuri lavori nel campo della bioacustica applicata alle specie esotiche.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le specie aliene

Nell'ultimo decennio il tema delle specie alloctone sta acquisendo rapidamente un peso sempre maggiore nei dibattiti per la conservazione della biodiversità stessa.

Come riportato negli esiti del tavolo tecnico in preparazione alla Strategia Nazionale per la Biodiversità, *“le specie “aliene” o alloctone sono quegli organismi introdotti al di fuori del naturale areale distributivo presente o passato attraverso un’azione diretta (intenzionale o accidentale) dell’uomo; in questa definizione vanno incluse non solo le specie, ma anche le sottospecie, ed ogni elemento, gamete, seme, uovo, propagulo che abbia la possibilità di sopravvivere e successivamente riprodursi in natura. Sono definite invasive, quelle specie alloctone la cui introduzione o diffusione minaccia la biodiversità, o può causare danni alla salute umana o avere serie conseguenze socio-economiche”* (A.A.V.V., 2009).

Con il termine “Specie Invasive”, dunque, sono intese in maniera più ampia tutte quelle specie non autoctone di un dato paese, in altri casi si comprendono specie autoctone ritenute dannose ad impatto negativo sul loro ambiente. Il termine è anche usato in riferimento a qualsiasi specie non indigena, a prescindere dall’impatto che potrebbe causare. In Italia per specie alloctona s’intende una specie vivente (animale, vegetale o fungo) che, per opera dell’uomo o di un evento naturale, si trova ad abitare e colonizzare un territorio diverso dal suo areale storico. Esse rappresentano una potenziale minaccia su scala enorme, ma si stima che già oltre 11.000 specie non autoctone siano entrate in Europa (DAISIE, 2009).

L’introduzione può avvenire naturalmente o, per la maggior parte dei casi, accidentalmente od intenzionalmente quando l’attività umana diventa un ottimo vettore per gli spostamenti e l’introduzione di nuove specie nei diversi paesi del mondo (commercio estero, viaggi, turismo, ...). Per quanto riguarda i coleotteri xilofagi, i principali vettori sono alberi e prodotti di legno.

1.2 Prevenzione

L’UE ha sviluppato diverse leggi in materia di importazione-esportazione di materiale (2000/29/CE). Questo include gli elenchi delle specie per le quali è vietata o limitata applicando certe misure specifiche l’importazione.

L’organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante EPPO effettua periodicamente pubblicazioni e raccomandazioni per quanto concerne il tema della salute delle piante contrastando l’introduzione e la diffusione di organismi nocivi e pericolosi non endemici ed applicando controlli sicuri ed efficaci. La EPPO ha istituito inoltre delle liste riguardo alle specie alloctone per le quali è necessario un controllo e una regolazione; in particolare l’elenco

A1 contiene specie non presenti all'interno della regione EPPO, l'elenco A2 contiene la lista delle specie già presenti (EPPO, 2010).

La Convenzione Internazionale per la Protezione delle Piante (IPPC) ha stabilito uno standard per il trattamento del materiale da imballaggi di legno, "NIMP15 - Regolamento di materiale da imballaggio di legno nel commercio internazionale " (IPPC, 2009), con il quale si deve applicare un trattamento con calore al legno e deve essere affissato un timbro prima dell'esportazione. Questo standard è stato incorporato nel piano legislativo fitosanitario europeo attraverso il consiglio direttivo della comunità europea con direttiva CE 2004/102/CE (Commissione Europea, 2004).

La continua evoluzione della tecnologia e del pensiero scientifico, fanno ricadere sulla tecnologia un ruolo via via più importante nella lotta alle specie alloctone. A oggi però lo sviluppo delle tecniche si concentra sui metodi di prevenzione, spesso unica scelta ragionevole nella lotta agli organismi alloctoni.

La prevenzione [...] può avvenire attraverso:

- L'introduzione di regolamentazioni del commercio per quelle specie che un'accurata analisi del rischio abbia identificato come potenzialmente invasive e per le quali l'importazione e/o l'immissione intenzionale rappresentino canali significativi di invasione [...];
- La promozione e lo sviluppo di codici volontari di buona pratica e/o regolamentazione della attività più "a rischio" (vivaistica, acquariologia, mercato animali d'affezione, commercio animali e piante esotiche, agricoltura, ingegneria ambientale, gestione forestale, immissioni a scopo venatorio e alieutico, allevamento, ...);
- Un'adeguata e capillare informazione per favorire condotte responsabili dei turisti sia in entrata che in uscita dal nostro Paese;
- [...]

(F.A., C.B., 2009)

È importante inoltre garantire diagnosi tempestive e risposte rapide, tramite:

- la formazione specifica sulle tecniche di controllo
- la semplificazione dei procedimenti autorizzativi e la chiara definizione di competenze in materia di eradicazione e controllo [...];
- la definizione di norme per garantire interventi di emergenza e straordinari;

- l'individuazione di risorse o strumenti per gli interventi di emergenza e straordinari;
- il chiarimento di ruoli e responsabilità per quei taxa o ambienti non coperti dall'attuale quadro normativo – istituzionale;
- il rapido scambio di informazioni;
- la promozione di meccanismi per la rapida pubblicazione delle nuove segnalazioni;
- l'assegnazione delle competenze per il rapido intervento (CFS, Corpi forestali regionali, personale aree protette [...] ...)

(F.A., C.B., 2009)

1.3 Metodi di ispezione

1.3.1 Ispezione visiva

In alcuni casi un'infestazione larvale può essere rilevata attraverso sola ispezione visiva ricercando segni evidenti quali fori di ovideposizione, fori di sfarfallamento e altro. È un metodo però che può risultare di scarsa efficacia in quando non è sempre facile individuare tali segni, per esempio quando gli adulti non sono ancora sfarfallati, oppure possono esserci larve non visibili in legno e pallet (Schofield, 2011).

1.3.2 Raggi X

Nel suo articolo del 1940 *The Detection of Wood-boring Insects by means of X-Rays*, Fisher evidenzia la diversa intensità del successo nella detenzione di larve nel legno utilizzando i raggi X. I campioni di legno utilizzato varia in spessore da 0,48 centimetri a 5,71 centimetri. Gli strumenti utilizzati e le piccole dimensioni dei campioni di legno però hanno comportato una scarsa e difficile applicazione del metodo al di fuori dell'ambiente di laboratorio.

1.3.3 Uso dell'olfatto dei cani

Cani addestrati in otto mesi di formazione si sono dimostrati in grado di rilevare diverse specie d'insetti, ad esempio *Lymantria dispar* (Wallner and Ellis, 1976), *Cimex lectularius* (Pfiester et al., 2008) e *Cochliomyia hominivorax* (Welch, 1990). La percentuale di successo ha toccato il 99,7%. Recentemente ci sono stati tentativi di rilevare scolitidi utilizzando cani addestrati, tale ricerca però è ancora in corso e priva di risultati. In futuro quindi, i cani potranno essere sfruttati anche per localizzare specie aliene in aree infestate, in piante importate e imballaggi di legno. All'Istituto per la Protezione delle Foreste BFW in Germania, sono in corso addestramenti di cani per rilevare la presenza di *Anoplophora* sp. (Hoyer-Tomiczek, Sauseng, 2009).

1.3.4 Rilevamento acustico

Lo sviluppo tecnologico ha portato, dagli anni '50 del secolo scorso, alla nascita ed evoluzione di una branca della zoologia denominata "bioacustica". Questa viene identificata come una scienza trasversale che si occupa della produzione, diffusione e ricezione dei suoni da parte degli animali, incluso l'uomo, e di come questi ultimi comunichino mediante gli stessi. In determinate condizioni, le larve di specie xilofaghe possono essere rilevate attraverso la bioacustica; naturalmente le larve devono essere in periodo di attività, in quanto impossibile localizzare la presenza di un insetto durante lo svernamento o durante la fase di pupa (Schofield, 2011). Uno dei primi metodi bioacustici per il rilevamento delle larve nel legno consisteva nell'uso di sensori che percepivano il movimento e l'attività trofica degli insetti (Colebrook, 1937). Il legno preso in esame doveva essere messo in una scatola insonorizzata. Si è dimostrato con questo metodo che le larve producono un suono sulla superficie del legno attraverso la loro attività trofica. Un metodo simile è stato applicato su legno strutturale, e ciò ha reso possibile il rilevamento di larve nel legno anche in ambienti rumorosi.

Negli ultimi quindici anni l'interesse per questa metodologia è cresciuto e sono state compiute molte ricerche e metodi di rilevamento, ovvero l'uso di ultrasuoni (Fleming et al., 2005), di sensori piezo-elettrici ed altri (Farr, 2007) e di accelerometri (Mankin et al., 2004), tutti in combinazione con diverse tecniche di elaborazione dei segnali per avere un rilevamento automatico (Schofield, 2011). Il monitoraggio acustico dunque potrebbe potenzialmente essere utilizzato per potenziare il controllo del focolaio. Tale sistema potrebbe essere combinato con l'approccio degli alberi sentinella per monitorare più efficacemente la diffusione delle specie in una data area. L'uso di una rete di sensori wireless in combinazione con un sistema di rilevamento acustico automatico potrà aprire la possibilità di una tecnica di monitoraggio automatizzato richiedendo poco o nessun intervento umano (Schofield, 2011).

1.4 Acustica e insetti

1.4.1 Il suono

Il suono è definito come la trasmissione delle vibrazioni attraverso le particelle di un materiale, che sia esso solido, liquido o gas: la sorgente sonora provoca la vibrazione delle particelle che fanno vibrare altre particelle confinanti, e così via fino alla progressiva e finale attenuazione dell'energia. Il periodo dell'onda sonora, noto anche come lunghezza d'onda, è il tempo tra periodi successivi di picco o di pressione minima. I suoni prodotti da parte di coleotteri e larve xilofaghe possono essere rilevati con strumenti bioacustici, tenendo conto della relazione che esiste tra i diversi comportamenti degli insetti, la morfologia e quindi il suono risultante (Schofield, 2011).

1.4.2 Fattori influenti

Ovviamente, le proprietà fisiche del materiale infestato influenza in modo diverso la capacità di rilevare la presenza degli insetti e la natura esatta dei suoni rilevati. Bisogna, infatti, tenere conto dell'attenuazione, ovvero la percentuale di energia che viene persa dall'onda sonora viaggiante nel materiale di propagazione, e della velocità dell'onda, che dipende principalmente dalla densità del materiale. La densità del legno varia da specie a specie, ma dipende anche da fattori esterni quali ad esempio l'umidità. Con l'aumentare del contenuto di umidità, densità del legno aumenta portando a una diminuzione nella velocità del suono (Unterwieser e Schickhofer, 2011).

1.4.3 Suoni prodotti dagli insetti

Gli insetti producono una vasta gamma di suoni, suddivisibili in due categorie principali: suoni accidentali e suoni non-accidentali. I primi sono il risultato di suoni prodotti come sottoprodotto di qualche altra azione compiuta dall'insetto (ad esempio il nutrimento). I secondi raggruppano tutte le categorie di suoni emessi intenzionalmente, come potrebbe essere la comunicazione, il corteggiamento, la difesa aggressiva, etc. La seconda categoria può essere ulteriormente suddivisa in due gruppi: suoni aerei e suoni su substrati; in quest'ultimo caso significa che l'insetto è dentro il materiale in questione, spesso una pianta. I mezzi di trasmissione hanno delle implicazioni da tenere conto durante l'applicazione dei metodi di rilevamento dei suoni. In entrambe le categorie, i suoni possono essere prodotti da diversi meccanismi fisici, nello specifico esistono cinque categorie di meccanismi utilizzati dagli insetti per la produzione di suoni, quali: stridio, ovvero il suono prodotto dallo sfregamento tra parti corporee (Hirschberger, 2011); *striking*, cioè il suono prodotto dallo strofinamento del corpo dell'insetto su un substrato oppure su un'altra parte del corpo, dove le varie parti del corpo dipendono dalla specie (Bell et al., 2007); vibrazione, ovvero produzione del suono attraverso la vibrazione di una parte del corpo; ad esempio la vibrazione delle ali può produrre un suono aereo (Schofield, 2011). Le frequenze prodotte dalla maggior parte delle ali degli insetti ricadono da 50 Hz a 2 kHz (Price, 1984); le api, per esempio, ricadono su un valore di circa 190Hz (Chapman, 1998), mentre farfalle e falene tendono ad essere più lente con frequenze a partire da 8 Hz (Corben, 1983)); espulsione di aria o fluidi (suono assimilabile a sibili o fischi dell'aria, possono essere suoni accidentali od intenzionali ad esempio per la difesa). Le larve xilofaghe nello specifico producono suoni accidentali durante il nutrimento all'interno della pianta ospite. I suoni quindi dipenderanno dalle proprietà fisiche del materiale e dal comportamento larvale. Dopo un determinato periodo, la larva crea un tunnel attraverso il legno derivante dall'attività trofica, le mandibole sono molto robuste e adatte per romperne le fibre. Ciò produce vibrazioni che possono essere rilevate sulla superficie del legno. Occorre inoltre tenere conto dello stadio larvale, della crescita e del ciclo vitale dell'insetto. Ci sono alcune larve che trascorrono

parecchio tempo prima dell'impupamento senza nutrirsi, il che potrebbe porre dei problemi nella rilevazione larvale con metodi bioacustici. Esistono altre incognite sul comportamento larvale di coleotteri xilofagi dato che il monitoraggio è difficile da eseguire quando si trovano in profondità dentro il legno.

1.5 Monitoraggio acustico e rilevamento automatico

Il rilevamento acustico si compone di due fasi: registrazione e raccolta di file audio con l'uso di un sensore acustico e in un secondo momento analisi dei dati con l'aiuto dei *software*.

1.5.1 Generalità sul monitoraggio acustico

La bioacustica è stata utilizzata per decenni per monitorare varie categorie di animali e relativi comportamenti. Esistono due tipi di approcci: approccio sul substrato e approccio aereo. Nel primo caso, il sensore è a contatto con il soggetto indagato, ed è proprio questo il metodo più frequente utilizzato per il monitoraggio degli insetti. Il secondo approccio è utilizzato maggiormente quando i soggetti tendono a muoversi maggiormente su una vasta area. I sensori utilizzati sono spesso specializzati per adattarsi al tipo di suono prodotto. Nel caso degli insetti xilofagi, viene applicato il metodo di registrazione sul substrato essendo questi all'interno del legno.

1.5.2 Monitoraggio acustico d'insetti all'interno di piante e legno

Nel tempo sono stati collaudati e utilizzati diversi metodi per registrare l'attività delle larve all'interno di piante e legno abbattuto. Un esempio di successo fu condotto e pubblicato da Colebrook che registrò larve di *Xestobium rufovillosum* usando un microfono elettronico e ponendo il sensore sulla superficie del legno, metodo per nulla invasivo o influente sull'attività larvale (Colebrook, 1937). Un altro metodo risultato di successo fu usato da Mankin et al. per rilevare *Anoplophora glabripennis* all'interno di piante infestate usando una combinazione di sensori piezoelettrici collegati a delle viti in seguito inserite nel legno. Lo svantaggio di questo metodo è che è invasivo e può non essere applicabile su alberi ad alto valore (Mankin et al., 2004). Rohitha et al. nel 1994 hanno usato dei microfoni elettronici per rilevare larve *Oemona hirta* (Rohitha et al., 1994). Quest'approccio pone i campioni in una camera insonorizzata per rilevare suoni prodotti dalle larve sopra rumore di fondo. Tale metodo, però, potrebbe essere usato solo in condizioni di laboratorio.

1.5.3 Criteri nella scelta e nell'uso dei sensori

I sensori devono essere a basso costo, semplici da collegare e applicabili facilmente al tipo di legno o albero. Il fissaggio va eseguito in modo non invasivo con l'aiuto di elastici o altro sulla superficie esterna, senza penetrare o danneggiare il campione. Con vari studi sono state portate

a termine indagini sull'efficienza di diversi tipi di sensori. Dai risultati è emerso che i migliori sensori da utilizzare sono quelli piezoelettrici (Schofield, 2011).

1.5.4 Rilevamento automatico

Il rilevamento automatico è la capacità di un sistema di estrarre determinati suoni al di fuori del rumore di fondo senza bisogno dell'intervento umano. In questo caso il segnale acustico che dovrà spiccare è quello risultante dall'attività trofica delle larve. Sono stati utilizzati vari approcci per elaborare i segnali d'insetti xilofagi. Il primo scopo di questo metodo è determinare la presenza della larva piuttosto che fare distinzione tra diverse specie d'insetti. È importante che il sistema rilevi suoni con la minor ampiezza possibile che possono però non contenere informazioni sufficienti riguardo al livello di rumore per permettere l'identificazione della specie.

1.5.5 Analisi del suono

L'analisi del suono è importante per visualizzare graficamente le caratteristiche del segnale acustico dal quale si possono capire e correlare alle diverse specie certi aspetti riguardo al comportamento, la situazione e altri parametri. La trasformazione digitale del segnale acustico è un processo veloce e di basso costo. Sono disponibili varie tecniche di analisi, normalmente basate su sistemi digitali oppure esportate e convertite dall'analogico al digitale con specifici DPS *software*. La rappresentazione più semplice è costituita dall'oscillogramma, che permette di visualizzare la forma d'onda del segnale e l'ampiezza rispetto al tempo. Tuttavia, l'analisi più rilevante riguarda lo spettro, giacché rappresenta la frequenza del segnale acustico: lo spettro istantaneo (frequenza-ampiezza) mostra le frequenze di brevi segmenti del segnale; la rappresentazione di più spettri, calcolati in segmenti consecutivi – oppure sovrapposizione del segnale – mostra l'evoluzione nel tempo della struttura di frequenza. Graficamente, tutto ciò è rappresentabile in uno spazio tridimensionale (frequenza-ampiezza-tempo). Di maggior uso per l'analisi di suoni prodotti da animali, è la rappresentazione frequenza-tempo, ovvero lo spettrogramma o SonaGram™. Sono stati comunque sviluppati anche altri sistemi per analizzare la struttura frequenza-tempo per segnali complessi o per svolgere compiti più articolati. Utilizzando rappresentazioni grafiche, si possono inoltre confrontare facilmente i vari segnali per trovare similitudini o differenze tra di loro, per classificare i segnali in relazione alla loro morfologia, i comportamenti correlati, i presunti significati o i singoli emettitori del suono.

1.5.6 Spettrogramma

Nel tempo sono stati collaudati e utilizzati diversi metodi per registrare l'attività delle larve all'interno di piante e legno abbattuto. Un esempio di successo fu condotto e pubblicato da Colebrook che registrò larve di *Xestobium rufovillosum* usando un microfono elettronico e

ponendo il sensore sulla superficie del legno, metodo per nulla invasivo o influente sull'attività larvale (Colebrook, 1937). Un altro metodo risultato di successo fu usato da Mankin et al. per rilevare *Anoplophora glabripennis* all'interno di piante infestate usando una combinazione di sensori piezoelettrici collegati a delle viti in seguito inserite nel legno. Lo svantaggio di questo metodo è che è invasivo e può non essere applicabile su alberi ad alto valore (Mankin et al., 2004). Rohitha et al. nel 1994 hanno usato dei microfoni elettronici per rilevare larve *Oemona hirta* (Rohitha et al., 1994). Quest'approccio pone i campioni in una camera insonorizzata per rilevare suoni prodotti dalle larve sopra rumore di fondo. Tale metodo, però, potrebbe essere usato solo in condizioni di laboratorio.

1.5.7 Come il suono appare in uno spettrogramma

Un suono con frequenza costante apparirà come una linea orizzontale la cui posizione verticale dipenderà dalla frequenza del tono. La linea sarà più inclinata al crescere della frequenza, mentre un suono con un tono modulato sarà rappresentato da una linea caratterizzata da movimenti verso l'alto e verso il basso. Al contrario, un impulso essendo un suono molto corto caratterizzato da energia in tutte le frequenze, apparirà come una linea verticale localizzata in un certo tempo t . Un altro tipo di suono è il "rumore". Nell'uso comune s'intende qualcosa di fastidioso. In biologia, invece, il "rumore" è considerato come l'insieme di suoni emessi da macchinari come eliche e motori. In termini tecnici, il rumore è un evento acustico con una struttura caotica composto di un ampio range di frequenze *a random*: il rumore per eccellenza è il cosiddetto "rumore bianco", un segnale che copre tutti i possibili spettri percettibili. Ovviamente, le cose sono ben più complesse rispetto a come sono state descritte, e le impostazioni applicate per ottenere uno spettrogramma possono influenzare pesantemente l'immagine prodotta e la struttura visualizzata. Ad esempio, una serie di suoni ripetuti in un tempo molto breve può apparire come un suono tonale o come una serie di suoni secondo la risoluzione temporale scelta.

1.5.8 Importanza dell'identificazione di *Anoplophora glabripennis*

È importante il controllo di *Anoplophora* per limitarne la diffusione in aree ancora indenni, essendo una specie molto invasiva con elevata dannosità. Pur avendo colpito finora piante in ambiente urbano, è necessario impedirle la possibilità di avere accesso ad aree boscate e foreste di latifoglie, dove potrebbe alterarne gravosamente l'equilibrio e minacciarne la biodiversità con serie conseguenze ambientali, economiche e sociali. A tale fine, risulta fondamentale poter comparare secondo comuni parametri e distinguere l'attività di *Anoplophora glabripennis* da quella di specie endemiche affini quali sono quelle considerate nel presente studio.

1.6 Obiettivi del lavoro

Il presente lavoro mira a verificare:

- a) la possibilità di utilizzare il monitoraggio acustico per l'individuazione di larve di coleotteri cerambicidi in attività trofica;
- b) la possibile differenza tra specie di coleotteri cerambicidi nei suoni emessi da larve in attività trofica.

L'approccio consiste in una comparazione statistica fra dati derivanti dall'analisi dei suoni e si prefigge di identificare alcuni parametri che possano risultare caratterizzanti di ogni specie e significativamente differenti dalle altre. I risultati ottenuti potranno essere un ulteriore contributo allo sviluppo di tecniche efficaci al riconoscimento di specie xilofaghe invasive.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Specie oggetto di studio

2.1.1 *Anoplophora glabripennis*

Anoplophora glabripennis (Motschulsky) "Asian Longhorned Beetle (ALB)" è un coleottero cerambicide proveniente da Cina e Corea, considerato altamente invasivo e polifago su latifoglie arboree con preferenza per le piante in ambito urbano. In Veneto è stato segnalato per la prima volta nel 2009 nel comune di Cornuda (TV), territorio sottostante alle normative europee dettate nella Direttiva 2000/29/CE. Esso è inoltre nella lista A1 della EPPO. Sono in corso di studio tecniche per l'eradicazione al di là dell'abbattimento e dell'eliminazione fisica delle piante infestate, ed è importante identificare la presenza dell'insetto sulle importazioni e lo scambio commerciale tra paesi per evitare la diffusione tramite vettori antropici.

2.1.2 Breve descrizione dell'insetto

L'adulto di *Anoplophora glabripennis* misura 20-35 mm di lunghezza e 7-12 mm di larghezza, di colore nero metallico con riflessi bluastrì ed elitre caratterizzate da macchie bianche di forma irregolare tra le 10 e le 20. Le antenne sono composte di 11 segmenti (antennomeri), ciascuno con parte basale bianco-azzurrognola e porzione distale nera. Il maschio è solitamente di dimensioni inferiori rispetto alla femmina, con antenne che superano di circa un terzo la lunghezza del corpo dell'insetto; nella femmina le antenne sono lunghe quanto il corpo. Le larve sono apode e glabre, di lunghezza tra i 30 mm ed i 50 mm una volta mature. Le pupe sono biancastre e lunghe 27-38 mm.



Figura 1.2: adulto maschio di *Anoplophora glabripennis* su rametto di *Acer campestre*.

2.1.3 Cenni di biologia

L'insetto è polifago su latifoglie, le femmine depongono 25-60 uova biancastre allungate (Li e Wu, 1993). La femmina individua il sito di ovideposizione in base al diametro del fusto e soprattutto allo spessore della corteccia, solitamente deposte nella parte medio-alta del fusto e sui rami principali (fino a diametri minimi di 3-5 cm). Generalmente attacca gli alberi alla base della chioma, nella parte alta del tronco e alla base delle branchie principali (Haack et al., 2006). L'incubazione dura 15 giorni, L1 e L2 all'inizio stanno a livello floematico, mentre L3 raggiunge progressivamente l'alburno e poi il duramen. L'impupamento avviene verso tarda primavera-inizio estate in una camera pupale nella parte più esterna dell'alburno e la fase di pupa dura circa 19 giorni (Yan e Qin, 1992). L'adulto sfarfalla da un foro perfettamente circolare di diametro 1-1,5 cm, con un picco di sfarfallamenti tra giugno e luglio. Il ciclo vitale può durare da 1 a 2 anni e l'insetto solitamente sverna come larva, in rari casi anche come uovo e pupa (Li e Wu, 1993). Gli adulti si alimentano per tutta la vita di foglie, ramoscelli e della corteccia dei rametti apicali più teneri, inizialmente per raggiungere la maturazione sessuale nelle femmine (Keena, 2002), successivamente solo come sostentamento (i maschi hanno invece fin da subito spermatozoi maturi ancor prima della metamorfosi) (Li e Liu, 1997). La riproduzione può avvenire sulla pianta ospite dalla quale sono sfarfallati maschi e femmine, oppure su piante ospiti vicine, entro un raggio massimo di 3 km. La riproduzione avviene tramite accoppiamento per anfigonia e con fecondazione interna delle uova. Entrambi i sessi si accoppiano più volte e con diversi partner (Morewood et al., 2004A).

2.2 Raccolta del materiale biologico

Nell'inverno 2012-13 diverse specie arboree infestate da coleotteri cerambicidi sono state campionate in boschi veneti. In particolare le specie arboree raccolte e considerate in questo studio sono *Pinus sylvestris*, *Ulmus glabra*, *Robinia pseudoacacia*, *Alnus glutinosa*, *Carpinus betulus*, *Acer negundo* e *Salix alba*, per ognuna delle quali sono stati raccolti da uno a tre tronchetti infestati (Tabella 2.1). Le caratteristiche dei tronchetti campionati sono riportate in Tabella 2.2

Specie legnosa	Periodo di raccolta	N. di tronchetti	Adulti sfarfallati
<i>Acer negundo</i>	Autunno/inverno 2012	3	<i>Anoplophora glabripennis</i>
<i>Alnus glutinosa</i>	Inizio aprile	1	<i>Neoclytus acuminatus</i>
<i>Carpinus betulus</i>	Seconda metà aprile	1	<i>Xylotreacus stebbingii</i>
<i>Pinus sylvestris</i>	Inizio aprile	3	<i>Monochamus galloprovincialis</i>
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Metà febbraio	3	<i>Xylotreacus stebbingii</i>
<i>Salix alba</i>	Autunno/inverno 2012	1	<i>Anoplophora glabripennis</i>
<i>Ulmus glabra</i>	Metà marzo	3	<i>Saperda punctata</i>

Tabella 2.1: specie legnose, periodo di raccolta, periodo d'inizio sfarfallamento degli adulti e specie sfarfallate.

Codice tronchetto	Specie ospite	Luogo di raccolta	Diametro	Lunghezza	Numero di segnali estratti
Acero 1	<i>Acer negundo</i>	Cornuda (TV)	13,5	32	33
Acero 2	<i>Acer negundo</i>	Cornuda (TV)	15	29,5	33
Acero 3	<i>Acer negundo</i>	Cornuda (TV)	16,25	36,5	34
Carpino 1	<i>Carpinus betulus</i>	Verona (VR)	7	21,5	30
Pino 1	<i>Pinus sylvestris</i>	Soverzene (BL)	8,5	21	21
Pino 2	<i>Pinus sylvestris</i>	Soverzene (BL)	16	27,5	18
Pino 3	<i>Pinus sylvestris</i>	Soverzene (BL)	16,7	23,5	44
Olmo 1	<i>Ulmus glabra</i>	S. Giorgio di Nogaro (UD)	14,2	33,5	56
Olmo 2	<i>Ulmus glabra</i>	S. Giorgio di Nogaro (UD)	15	50	26
Olmo 3	<i>Ulmus glabra</i>	S. Giorgio di Nogaro (UD)	20	24	57
Ontano 1	<i>Alnus glutinosa</i>	Legnaro (PD)	10,2	41	75
Robinia 1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Villorba (TV)	9	31	34
Robinia 2	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Villorba (TV)	9,5	30	33
Robinia 3	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Villorba (TV)	9	31	33
Salice 1	<i>Salix alba</i>	Cornuda (TV)	11,5	28	30

Tab. 2.2: informazioni sui tronchetti campionati.

Da ciascun tronchetto sono stati registrati un numero variabile di suoni emessi dall'attività trofica delle larve in essi presenti (Tabella 2.1), in seguito analizzate.

2.3 Descrizione delle prove.

2.3.1 Allevamento degli insetti

Inizialmente nel periodo invernale, i tronchi sono stati tenuti dentro le serre entomologiche della Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova (Regione Veneto), a Legnaro (PD). Nelle serre è stato possibile mantenere una temperatura costante per permettere alle larve di non riprendere la loro attività trofica. Con l'inizio della primavera e di temperature non troppo basse od influenti con la biologia delle larve, questi sono stati trasferiti all'esterno, esposti a temperatura ambiente al fine di favorire una quanto più possibile costante ed intensa attività larvale. I tronchi sono stati posti all'interno di tubi chiusi da retina metallica per evitare la fuga di eventuali adulti sfarfallati, e riposti su ripiani appositamente allestiti all'esterno delle serre.



Figura 2.2: serre sfruttate per l'allevamento delle larve nei tronchetti e tubi chiusi da retina utilizzati per evitare la fuga degli adulti sfarfallati dai diversi tronchetti.

Nel caso di tronchetti infestati da *Anoplophora glabripennis*, invece, essendo questa specie da quarantena, non sono stati trasferiti nelle serre del campus dal luogo d'infestazione, che interessa i comuni di Cornuda, Pederobba, Crocetta del Montello (provincia di Treviso), ma allevati direttamente a Pederobba (TV) entro l'area di quarantena in appositi laboratori di campo.



Figura 2.3: tronchetti di *Anoplophora glabripennis* in un laboratorio di quarantena nel comune di Pederobba (TV).

2.4 Registrazioni acustiche

2.4.1 Sensore, amplificatore e microfono

Da febbraio a fine maggio (mese coincidente con l'impupamento della maggior parte delle larve) sono state eseguite regolari registrazioni sui tronchi: ogni registrazione ha avuto una durata minima di 30 minuti fino a raggiungere anche i 120 minuti; durante tutti i giorni lavorativi sono stati presi in esame 2-4 tronchetti diversi al giorno, e così via a rotazione fino ad ottenere almeno quattro sessioni di registrazione per ogni tronco. I file audio sono stati scaricati periodicamente, verificati e analizzati con l'ausilio di diversi *software*. Il microfono ha il compito di convertire le variazioni di pressione (pressione sonora) in un segnale elettrico modulato. Esistono due principali tipi di trasduttori: dinamici e a condensatore. I microfoni dinamici sono molto robusti, affidabili e non richiedono alcuna alimentazione, ma sono meno sensibili dei microfoni a condensatore. I microfoni a condensatore sono più sensibili e con una più estesa risposta in frequenza, ma richiedono una certa alimentazione. I microfoni professionali sono normalmente alimentati con 48 V utilizzando i cavi di segnale (Alimentazione Phantom); solo pochi modelli hanno una batteria interna per fornire potenza. I principali parametri che caratterizzano un microfono sono il tipo di trasduzione, l'efficienza (o sensibilità), l'auto-rumore (rumore intrinseco), risposta in frequenza (gamma di frequenze che è in grado di ricevere) e diagramma polare (o direttività). Tutti questi parametri sono ugualmente importanti: tra questi il diagramma polare è una rappresentazione grafica della sensibilità del microfono rispetto alla frequenza e l'angolo di incidenza del suono. In genere, gli aumenti di direzionalità si hanno con maggiore frequenza, cioè diminuendo la lunghezza d'onda. Ci sono tre modelli direzionali di base: omnidirezionale, bidirezionale e unidirezionale, o semplicemente direzionale. Il modello direzionale di base è quello cardioide corrispondente al design più semplice per fare un microfono direzionale. Tra i microfoni direzionali, i più utili nelle registrazioni bioacustiche, ci sono microfoni con vari gradi di direzionalità. Il registratore usato per questo studio è il modello *Tascam DR90*. È munito di un sensore da porre a contatto con il tronco infestato e fissato con l'aiuto di un elastico come mostrato in fig. 2.3, collegato ad un amplificatore a comandi "on-off" per l'attivazione e la disattivazione; il tutto è collegato al registratore vero e proprio dotato dei comandi per l'avvio, lo stop e la gestione dei file di registrazione. Il sensore utilizzato, invece, è un *Murata PKLCS1212E2000-R1 Piezo Sensor 1 Square* con 2kHz di frequenza di risonanza.



Figura 2.4: esempio di applicazione sul tronchetto in esame del sensore collegato al registratore.

La procedura seguita per ogni registrazione consiste nel fissare il sensore sulla superficie del legno usando un elastico; non è importante che tutta la superficie inferiore del sensore sia a contatto con il legno. Si connette poi il sensore al *recorder* e si attiva spostando la levetta su “on”. Assicurarsi poi che il *recorder* abbia al suo interno la memoria *microSD* e infine accenderlo tenendo premuto il tasto “on/off”. Si avvia la registrazione premendo il pulsante “RECORD” due volte. A fine registrazione, premere una volta il pulsante “on/off”, per spegnere tutto tenere premuto il medesimo comando. Il *recorder* è stato settato per emettere le registrazioni in formato .wav 16 bit 44.1kHz. L’amplificatore del sensore si serve di pochissima energia (<0,2mA).

2.4.2 Scatola insonorizzata

Tutte le registrazioni per ogni diverso tronchetto sono state effettuate, ponendo microfono, sensori adeguatamente fissati sul tronco in esame e tronchetti stessi, all’interno di una scatola in legno con misure esterne di lunghezza 51cm, larghezza 42cm ed altezza 41 cm, adeguatamente foderata all’interno per garantire una buona insonorizzazione con 3cm di spessore di polistirolo applicato su tutta la superficie della scatola e del coperchio. Questo per rendere possibile la minimizzazione del rumore di fondo e dei disturbi esterni, al fine di ottenere netti il più possibile e facilmente distinguibili i suoni prodotti dalla larva.



Figura 2.5: scatola di legno insonorizzata utilizzata per le registrazioni.

2.4.3 Software Audacity

Audacity è un *editor* e registratore audio *free* distribuito sotto la GNU General Public License (GPL), utilizzato per la registrazione e la modifica di file audio. Il software libero offre la possibilità di usare un programma, di studiare come funziona e di migliorarlo condividendolo poi con gli altri. È di facile utilizzo, multilingua e compatibile con i Sistemi Operativi Windows, Mac OS X, GNU/Linux e altri. Tra le sue funzioni ci sono molte opzioni utili per un'analisi base dei file, ed è possibile usarlo per registrare audio dal vivo, convertire nastri e dischi in formato digitale, modificare file in formato .mp3, .wav, .au, .flac, .aiff ed altri.

Si possono eseguire inoltre operazioni di taglio, copia, unione o miscelare audio; si può cambiare la velocità o l'intonazione di una registrazione. Esiste un supporto per le frequenze di campionamento a 16-bit, 24-bit e 32-bit (*floating point*). Le frequenze di campionamento e i formati sono convertiti usando un ricampionamento di alta qualità e il *dithering*. Le tracce con differenti frequenze di campionamento o formati sono convertite automaticamente in tempo reale. È permessa l'apertura di clip multiple per ogni traccia, si possono applicare etichette a spezzoni della traccia; si possono modificare singoli punti di campionamento, applicare la dissolvenza del volume in apertura e in chiusura; è possibile inoltre un recupero automatico da crash nel caso di chiusura anomala del programma. Tracce e selezioni possono essere completamente manipolate usando la tastiera. Come effetti, è possibile cambiare l'intonazione senza alterare la velocità – e viceversa –, rimuovere rumori statici, fruscii, ronzii o altri tipi di rumore di fondo. Si possono alterare le frequenze con gli effetti di equalizzazione, esaltazione dei bassi ed altro. È possibile regolare i volumi in varie maniere, rimuovere le voci dalle tracce stereo, creare voci fuori campo con vari effetti. Come analisi, vi è la modalità di visione Spettrogrammi per visualizzare le frequenze, col comando “Disegna spettro” si può fare

un'analisi dettagliata delle frequenze. Il software permette anche di usare lo spettrogramma e di cambiarne alcune impostazioni sulla visualizzazione standard, come ad esempio l'ingrandimento della visualizzazione della frequenza (che modifica la risoluzione sia del tempo sia della frequenza) e il range della frequenza sullo schermo.

2.5 Analisi dei dati

Per ognuna delle cinque specie di coleotteri cerambicidi analizzati, sono stati estratti e considerati nelle analisi 100 segnali corrispondenti ai picchi sonori derivanti dall'attività trofica larvale, ad esclusione di *Neoclytus acuminatus* per il quale sono stati estratti 75 picchi a causa della scarsa attività dell'insetto e del minor numero di registrazioni effettuate.

2.5.1 Audacity

Per l'estrazione dalle onde sonore dei picchi è stato utilizzato il *software Audacity*. Con questo programma è stato possibile lavorare con ogni singolo file registrato per estrarre da ognuno solamente quelle parti dell'onda coincidenti con la presunta attività trofica delle varie larve. Tutti i pezzetti etichettati con un nome preciso (una o più lettere per etichettare la specie in questione; a fianco il numero di progressione del pezzetto selezionato) sono stati estratti e poi esportati in formato .wav per essere analizzati in un secondo momento con *R statistics*.

2.5.2 R statistics

Le analisi statistiche sono state realizzate con *R statistics*, un *free software* per l'analisi statistica e la realizzazione di grafici compatibile con UNIX, Windows e MacOS. Per l'analisi dei file .wav sono stati scaricati dal *mirror* CRAN "Italy (Padova)" ed installati su R sette pacchetti: *seewave*, *sound*, *tuneR*, *fftw*, *rgl*, *rpanel* e *lattice*.

Seewave: questo pacchetto elabora analisi sul tempo (oscillogrammi e buste), contenuto dello spettro, fattore di qualità della risonanza, entropia, correlazione incrociata ed autocorrelazione, frequenza dominante, segnale analitico, coerenza di frequenza, 2D e 3D spettrogrammi e molte altre funzioni.

TuneR: analizza la musica ed il linguaggio parlato. Si possono estrarre caratteristiche come MFCCs, gestione dei file .wav, leggere mp3, trascrizioni, etc. Contiene inoltre funzioni derivanti dal pacchetto *rastamat Matlab*.

Fftw: Fast FFT and DCT basati su FFTW.

Rgl: pacchetto con sistema di visualizzazione 3D.

Rpanel: fornisce un insieme di funzioni per costruire semplici controlli GUI per le funzioni di ricerca. Questi sono costruiti sul pacchetto tcltk. Gli usi potrebbero includere la modifica di un parametro su un grafico agendo con un cursore o un "doubleclick", fino ad arrivare a pannelli di controllo più sofisticati. Sono previste alcune funzioni per compiti grafici specifici, denominati 'cartoons'.

Lattice: è un sistema di visualizzazione dei dati di alto livello, potente ed elegante, pone un accento ai dati multivariati, che è sufficiente per le tipiche esigenze grafiche; è utilizzabile anche per gestire la maggior parte delle condizioni non standard.

Tutti i frammenti dei picchi delle onde sonore sono stati inizialmente analizzati con *R statistic*. Per ogni tronchetto sono state fatte tre analisi. Su ciascun picco estratto con *Audacity* sono stati analizzati i seguenti parametri:

Crest factor. Il fattore di cresta o rapporto picco-media (PAR), misura la forma dell'onda calcolata a partire dall'ampiezza del picco dell'onda in rapporto al valore dello scarto quadratico medio dell'onda. Si ottiene dalla seguente formula:

$$C = \frac{|x|_{\text{peak}}}{x_{\text{rms}}}$$

Il rapporto di potenza picco-media (PAPR) è una misura correlata definita come l'ampiezza di picco al quadrato (potenza del picco) diviso per il valore RMS al quadrato (potenza media):

$$PAPR = \frac{|x|_{\text{peak}}^2}{x_{\text{rms}}^2} = C^2$$

Si può capire, quindi, quanto il punto massimo del suono si discosta dalla media e il valore dell'ampiezza nel punto in cui c'è il valore massimo. I due fattori sono grandezze adimensionali. Il fattore di cresta è più comunemente espresso da un numero razionale positivo. Il PAPR viene più utilizzato in applicazioni di elaborazione dei segnali. Essendo un rapporto di potenza, esso viene normalmente espresso in decibel (dB). Il fattore minimo possibile di cresta è 1, 1:1 o 0 dB. Ad esempio, per un'onda sinusoidale il rapporto 1.414 è $20 \log(1.414)$ o 3 dB. La maggior parte del rumore ambientale ha un fattore di cresta di circa 10 dB, mentre i suoni impulsivi, come colpi di fucile possono avere fattori di cresta di oltre 30 dB. Nelle nostre analisi il *Crest factor* ottenuto

aveva quasi sempre valori molto inferiori allo 0. La funzione quindi fornisce i valori di tre parametri: *C* (crest factor), *Val* (valore della cresta) e *Loc* (collocazione della cresta nel tempo).

Temporal entropy. Calcola l'entropia di un *envelope* temporale, il disordine di un'onda. Viene calcolata secondo

$$S = -\sum(y \log y) / \log(N)$$

dove *y* = ampiezza relativa al punto *i* dell'*envelope*

N = numero di punti dell'*envelope*

Il valore varia da 0 a 1, non ci sono unità. L'entropia temporale di un segnale rumoroso con molte modulazioni dell'ampiezza tenderà verso il valore 1 mentre l'entropia temporale di un segnale piatto e regolare tenderà verso il valore 0. Nonostante ciò, si può notare che anche un suono sostenuto con un *envelope* quasi piatto mostrerà un'entropia temporale molto alta. In questo studio la maggior parte dei dati risultano più prossimi all'unità.

TimeR o durata dell'onda. Questa funzione calcola e mostra la durata di un periodo sonoro, delle relative pause e il rapporto tra lunghezza del suono e lunghezza della pausa. Si ottengono *s* (durata del segnale sonoro in secondi), *p* (durata della pausa in secondi), *r* (rapporto tra il segnale sonoro e il silenzio), nonché *s.start* (posizione d'inizio del segnale sonoro) e *s.end* (posizione in cui termina il segnale sonoro). Di questi, è stato isolato e considerato solamente il parametro *r*.

Per ogni gruppo di valori e per ognuna delle specie interessate, sono stati calcolati media e SEM. I valori medi dei parametri analizzati per le varie specie sono stati confrontati mediante analisi della varianza (ANOVA) ad una via. Il livello di significatività considerato è stato $p < 0,05$. L'impiego del test di Tukey ha consentito di distinguere le differenze significative all'interno dei gruppi. Anche in questo caso il livello considerato è stato $p < 0,05$.

3. RISULTATI

3.1 Analisi Crest

Monochamus galloprovincialis presenta un valore medio di *crest factor* significativamente superiore a quello delle altre specie (ANOVA F = 28,18; df = 4; P < 0,05), che risultano invece simili tra loro (Figura 3.1).

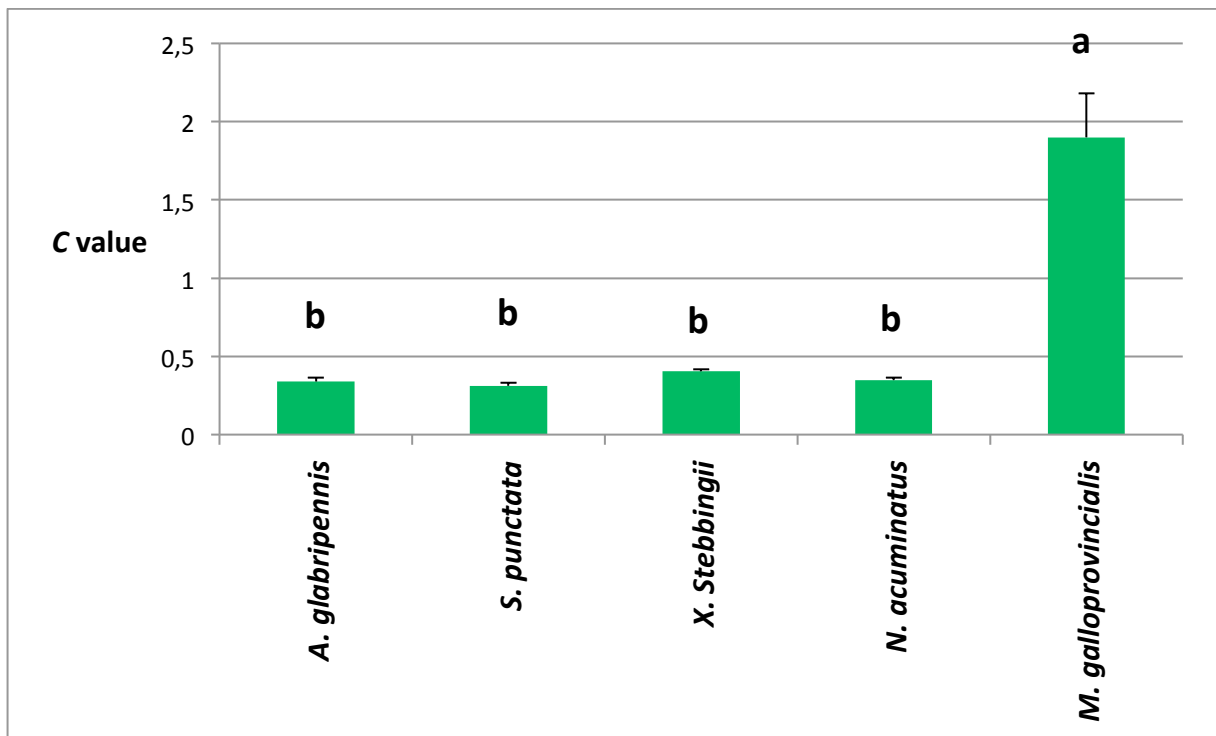


Figura 3.1: valori medi di *crest factor* per specie di cerambicidi analizzata. A lettere diverse corrispondono differenze significative all'ANOVA (P < 0,05).

Neoclytus acuminatus presenta un valore medio di *Val* significativamente inferiore a quello delle altre specie (ANOVA $F = 3,93$; $df = 4$; $P < 0,05$), che risultano invece superiori e simili tra loro (Figura 3.2).

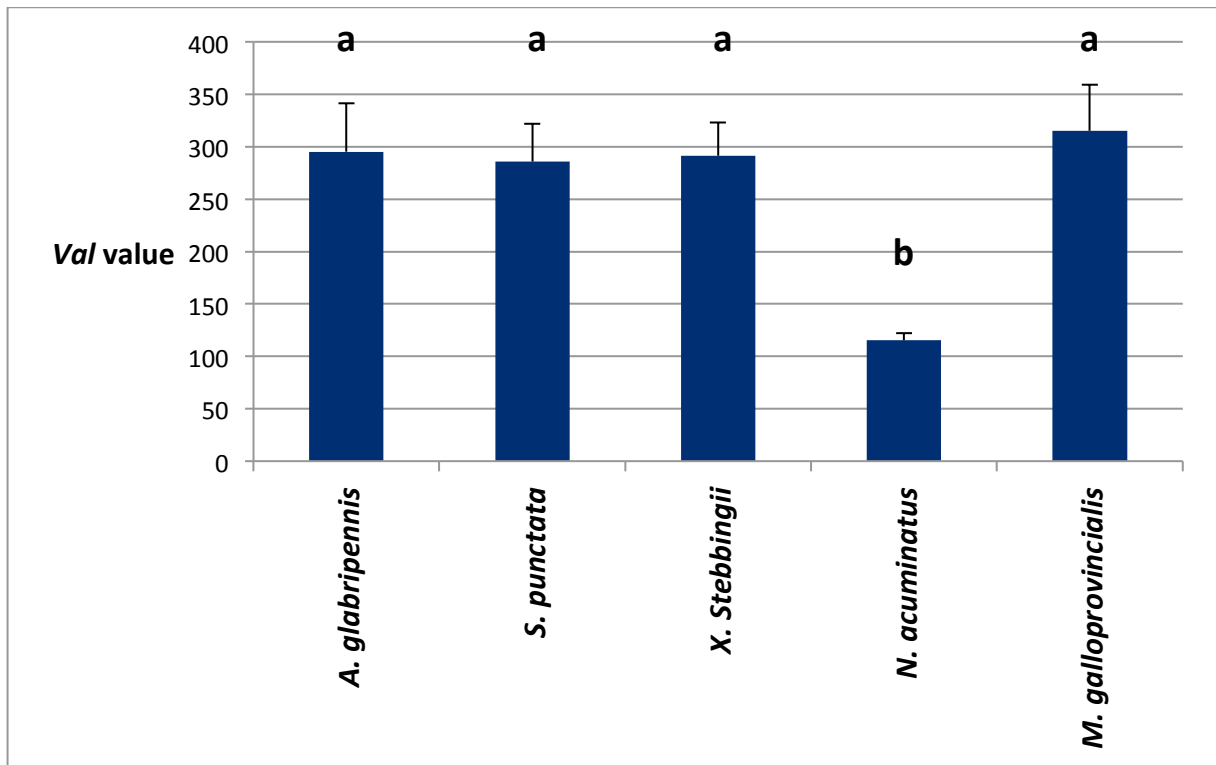


Figura 3.2: valori medi di *Val* per specie di cerambicidi analizzata. A lettere diverse corrispondono differenze significative all'ANOVA ($P < 0,05$).

Anoplophora glabripennis presenta un valore di *Loc* significativamente superiore a quello delle altre specie (ANOVA $F = 11,67$; $df = 4$; $P < 0,05$), che risultano invece superiori e simili tra loro (Figura 3.3).

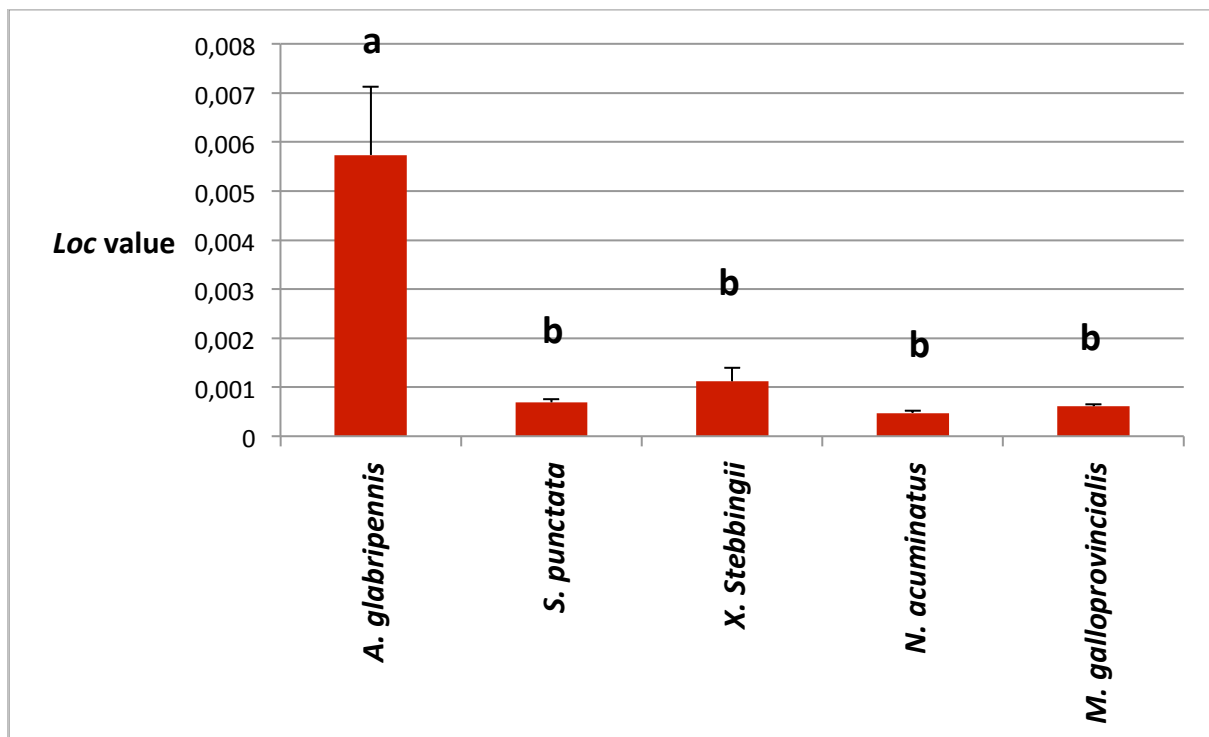


Figura 3.3: valori medi di *Loc* per specie di cerambicidi analizzata. A lettere diverse corrispondono differenze significative all'ANOVA ($P < 0,05$).

3.2 Analisi TH

Anoplophora glabripennis e *Neoclytus acuminatus* presentano un valore di TH significativamente superiore a quello delle altre specie (ANOVA $F = 9,86$; $df = 4$; $P < 0,05$), che risultano invece superiori e simili tra loro (Figura 3.4).

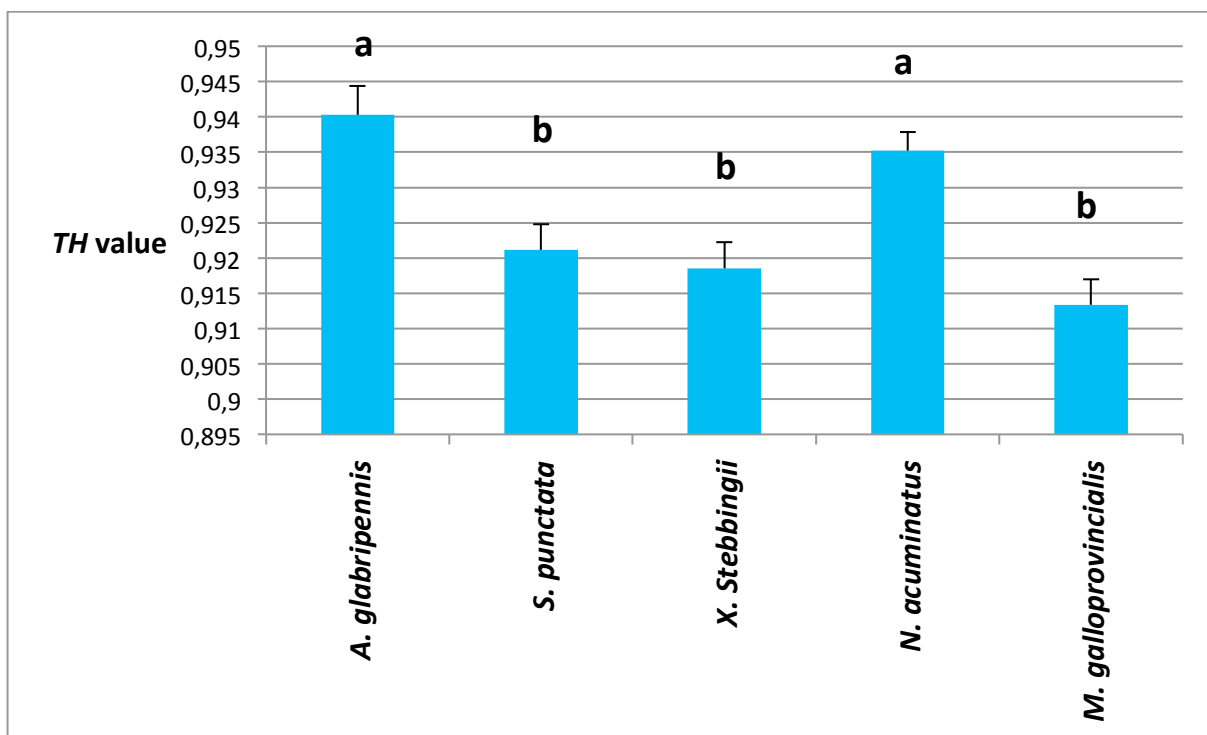


Figura 3.4: valori medi di TH per specie di cerambicidi analizzata. A lettere diverse corrispondono differenze significative all'ANOVA ($P < 0,05$).

3.3 Analisi *TimeR*

Xylotreacus stebbingii e *Neoclytus acuminatus* presentano un valore di *r* significativamente superiore a quello delle altre specie (ANOVA $F = 13,89$; $df = 4$; $P < 0,05$), che risultano invece superiori e simili tra loro (Figura 3.5).

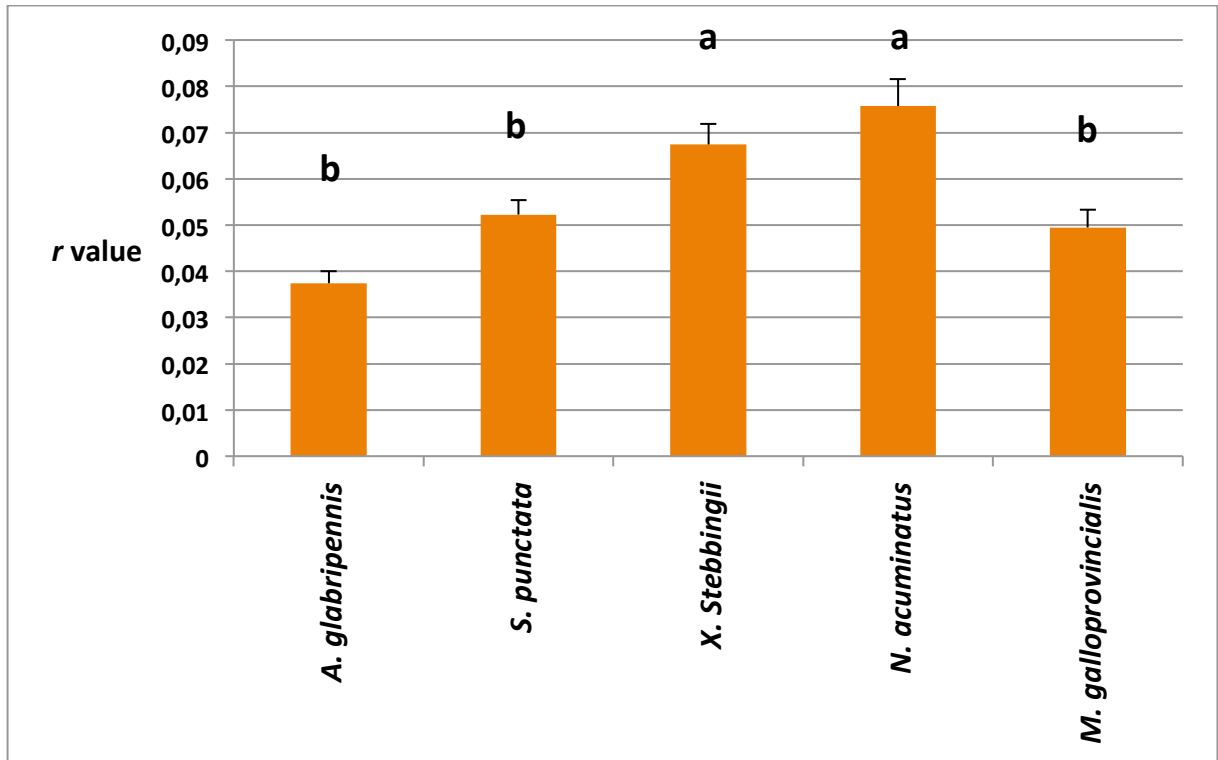


Figura 3.5: valori medi di *r* per specie di cerambicidi analizzata. A lettere diverse corrispondono differenze significative all'ANOVA ($P < 0,05$).

3.4 Medie e SEM

In tabella 3.1 vengono riassunti i valori della media (\pm SEM) dei parametri analizzati suddivisi per specie ospite.

Specie	C	Val	Loc	TH	r
<i>A. glabripennis</i>	0,33 \pm 0,02	295,28 \pm 46,45	0,0067 \pm 0,0014	0,940 \pm 0,004	0,037 \pm 0,003
<i>S. punctata</i>	0,31 \pm 0,02	285,90 \pm 36,06	0,0007 \pm 5,7055E ⁻⁰⁵	0,921 \pm 0,004	0,052 \pm 0,003
<i>X. stebbingi</i>	0,40 \pm 0,02	291,43 \pm 31,86	0,0011 \pm 0,0003	0,919 \pm 0,004	0,067 \pm 0,004
<i>N. acuminatus</i>	0,35 \pm 0,02	115,28 \pm 7,07	0,0005 \pm 4,7623E ⁻⁰⁵	0,935 \pm 0,003	0,076 \pm 0,006
<i>M. galloprovincialis</i>	1,90 \pm 0,28	315,22 \pm 44,09	0,0006 \pm 4,8342E ⁻⁰⁵	0,913 \pm 0,004	0,049 \pm 0,004

Tabella 3.1: valori della media (\pm SEM) dei parametri analizzati suddivisi per specie ospite.

3.5 Lunghezza e rappresentazione grafica dei segnali

Anoplophora glabripennis presenta il valore medio della lunghezza dei segnali acustici significativamente maggiore di tutte le altre specie (ANOVA F = 82,49; df = 4; P < 0,05), come riportato in Tabella 3.6 e Figura 3.6.

	Anoplophora glabripennis	Monochamus galloprovincialis	Neoclytus acuminatus	Xylotrechus stebbingii	Saperda punctata
Nr. of Samples	2401,85	168,40	111,00	96,95	73,55

Tabella 3.6: valori di lunghezza media dei picchi per specie di cerambicidi analizzata. *Anoplophora glabripennis* è significativamente differente dalle altre specie con ANOVA P < 0,05.

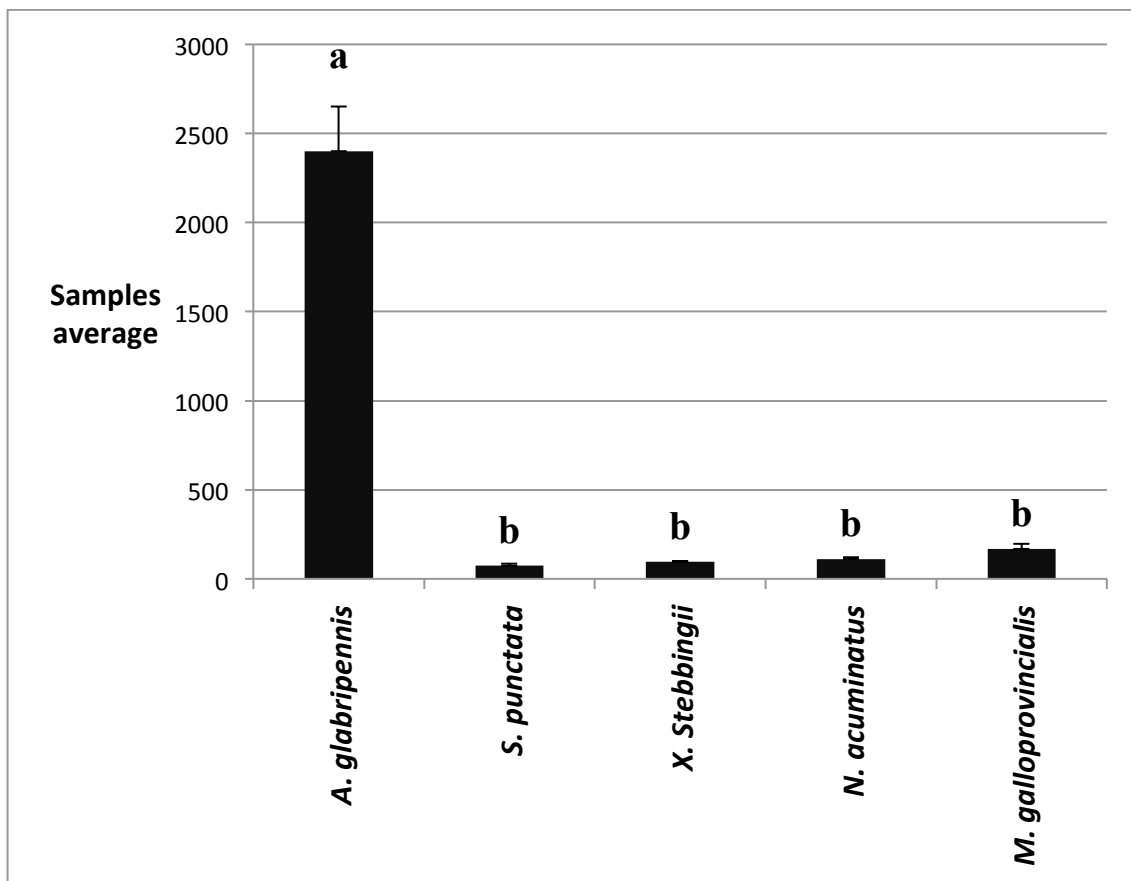


Figura 3.6: rappresentazione grafica dei valori di lunghezza media dei picchi per specie di cerambicidi analizzata. *Anoplophora glabripennis* è significativamente differente dalle altre specie con ANOVA $P < 0,05$. Infine, vengono illustrate le diverse forme dei segnali sonori a seconda della specie in questione.

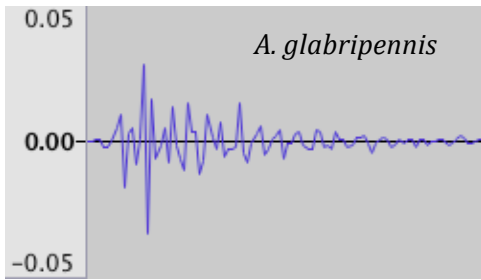


Figura 3.7: picco estratto da onde sonore prodotte da *Anoplophora glabripennis*.

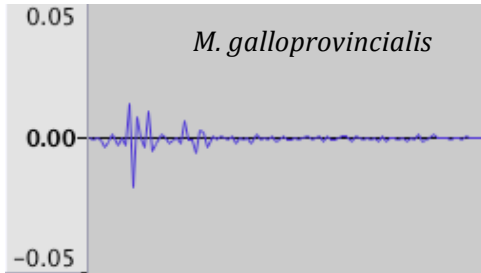


Figura 3.8: picco estratto da onde sonore prodotte da *Monochamus galloprovincialis*.

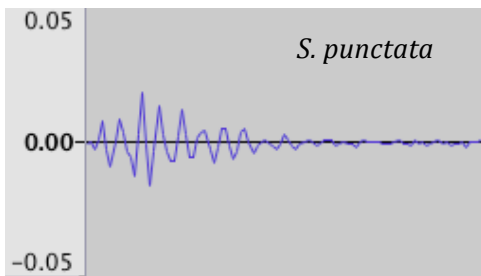


Figura 3.9: picco estratto da onde sonore prodotte da *Saperda punctata*.

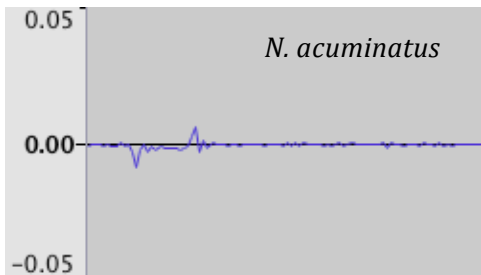


Figura 3.10: picco estratto da onde sonore prodotte da *Neoclytus acuminatus*.

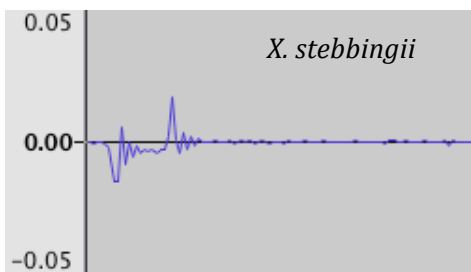


Figura 3.11: picco estratto da onde sonore prodotte da *Xylotrechus stebbingii*.

4. DISCUSSIONE

Dallo studio effettuato e in base ai risultati ottenuti, si può affermare che con la bioacustica è possibile distinguere in maniera sicura e significativa alcune specie attraverso l'analisi di diversi parametri bioacustici dei suoni prodotti dalle larve in fase di alimentazione: *Anoplophora glabripennis* si differenzia dalle altre specie prese in esame analizzando il parametro *Loc* e *TH*; *Monochamus galloprovincialis* è distinguibile dalle altre specie servendosi del valore del coefficiente *C* dell'analisi *Crest*; infine, *Neoclytus acuminatus* si differenzia dal resto delle specie attraverso l'analisi dei parametri *Val* e *r*, dove per quest'ultimo coefficiente risulta significativamente distinguibile anche *Xylotrechus stebbingi*.

I risultati dell'analisi *Crest* potrebbero essere correlati in modo proporzionale alle dimensioni delle diverse specie. Si distinguono infatti specie con dimensioni maggiori (*Monochamus galloprovincialis* di 21-35 mm e *Anoplophora glabripennis* di 20-40 mm) da quelle più piccole (*Neoclytus acuminatus* attorno agli 11-18 mm); le specie che non si differenziano in maniera significativa dalle altre hanno invece dimensioni medie fra loro omogenee.

Riguardo all'entropia temporale si differenziano dalle altre specie *Anoplophora glabripennis* e *Neoclytus acuminatus*, che tendono ad avere un coefficiente più vicino al valore unitario e quindi un segnale più rumoroso con modulazioni dell'ampiezza, mentre riguardo al coefficiente *r* (rapporto tra il segnale sonoro e il silenzio) le specie che presentano valori maggiori dalle altre sono *Xylotrechus stebbingii* e *Neoclytus acuminatus*, il che vuol dire che rispetto agli altri insetti la durata del silenzio rispetto al segnale acustico risulta minore. Questi ultimi due indici risultano essere significativi dal punto di vista statistico, ma non è ancora possibile dare un significato chiaro a tali differenze.

Sulla base della lunghezza del segnale sonoro è possibile distinguere *Anoplophora glabripennis* dalle altre specie testate avendo questa lunghezza dei segnali nettamente superiori. Anche questo punto potrebbe tuttavia dipendere dalle dimensioni degli insetti essendo *Anoplophora glabripennis* tra le specie di grandezza maggiore tra quelle prese in esame (20-40 mm contro *Monochamus galloprovincialis* attorno ai 21-35 mm), ma ulteriori studi dovranno essere fatti a riguardo per poterlo affermare con certezza.

È necessario inoltre puntualizzare che alcune variabili non prese in considerazione in questo studio potrebbero influire sul comportamento delle diverse specie di insetti e quindi sui risultati ottenibili. Ad esempio il volume e la densità del legno possono influire sulla trasmissione del suono, così come l'umidità atmosferica, mentre la temperatura agisce sull'attività delle larve. Il fatto di usare specie legnose diverse per le varie specie di insetti potrebbe quindi aver influito sui risultati conseguiti. Riguardo a questo punto sarebbe opportuno partire da un'unica specie legnosa per verificare se, a parità di stadio larvale e condizioni di allevamento (specie legnosa,

umidità, temperatura, altro), risultano le stesse differenze osservate in questo studio. Solo così si potrà essere certi che il tipo di legno in cui si trova la larva non influenza il suono ottenuto all'esterno del tronchetto. Il legno è inoltre un materiale disomogeneo per cui la velocità di propagazione delle onde sonore è diversa a seconda che esse attraversino le fibre parallelamente o perpendicolarmente a queste. Molti sono i fattori influenzanti la velocità in esame nel legno; l'umidità nei legni saturi la rallenta di circa il 20% e del pari anche la temperatura ha notevole influsso (quindi anche il tasso d'umidità influisce la trasmissione del suono). Oltre allo smorzamento del moto vibratorio vi è anche la resistenza acustica specifica. Il legno, come qualsiasi altro mezzo elastico, oppone una resistenza ad ogni evento che tenda a fargli assumere uno stato oscillatorio. Tale resistenza è definita dal prodotto della densità e della velocità di propagazione. Avendo due mezzi elastici (cioè capaci di oscillare) A e B, la potenza che mette in oscillazione A viene in parte trasmessa a B, in parte riflessa ed in parte assorbita con conversione in calore per attrito e deformazione, dando così luogo ad effetti di smorzamento crescenti con la frequenza. Quando le resistenze acustiche dei due mezzi sono alquanto diverse tra loro si ha prevalentemente riflessione, al contrario resistenze simili esaltano la trasmissione. Nel legno si ha proprio una bassa resistenza acustica e quindi un forte irradiazione; caratteristiche esaltate da alcuni legni come le conifere, con struttura molto regolare ed anelli con spessore ridotto e costante. La velocità del suono cambia a seconda dei diversi materiali, ad esempio nel legno di olmo è di 4108 m x s^{-1} , mentre nel legno di pino è di 3313 m x s^{-1} .

Sono state precedentemente effettuate ricerche per distinguere le diverse specie d'insetti con la bioacustica attraverso altri metodi non statistici, come definizione della forma dell'onda con l'utilizzo di strumenti informatici e relativi confronti tra specie.

Chesmore (2009) ha discusso un particolare approccio applicato agli insetti per rilevare specie xilofaghe nel legno: sono stati sviluppati diversi dispositivi palmari, per l'identificazione automatica denominati IBIS (*Intelligent Bioacoustic Identification System*), tuttora ancora in fase di sviluppo. Lo stesso autore introduce inoltre il concetto di "*Time domain signal coding (TDSC)*," metodo semplice per descrivere la forma di un'onda, definendo il numero di valori massimi positivi o minimi negativi. Ogni segnale viene definito da una coppia di parametri (durata e forma). Chesmore conclude dicendo che in futuro bisognerà migliorare l'affidabilità dell'identificazione dei diversi *taxa* con questi metodi, per superare anche il problema della sovrapposizione dei range dei valori dei suoni delle diverse specie e cercare inoltre di monitorare aree più vaste, come boschi e foreste per evitare o limitare l'introduzione di specie invasive (Chesmore, 2009).

Non essendo mai stati fatti studi riguardo la bioacustica e gli insetti xilofagi attraverso un approccio statistico, questo studio preliminare risulta essere un punto di partenza per future ricerche in questo campo.

5. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio in primo luogo la mia famiglia per il sostegno economico e morale durante questi tre anni di studio universitario, hanno sempre creduto in me (certe volte più di me) incoraggiandomi ad andare sempre avanti.

Ringrazio tutti i professori, ricercatori, dottorandi e tutto il personale universitario con i quali ho avuto contatti ed interazioni in questi tre anni: tutti sempre disponibili, cordiali, professionali, competenti ed umani nei rapporti con gli studenti. In particolar modo grazie ai professori che in questo ultimo periodo mi hanno incoraggiata e sostenuta per le scelte future di studio.

Grazie per tutto alle persone che mi sono state più vicine in ogni momento, Niccolò e Carlo.

Ringrazio tutti i miei compagni di corso, con i quali ho trascorso tre bellissimi anni di studio in ottima compagnia. In particolar modo grazie per ogni bel (e brut) momento passato assieme: Carlo, Andrea, Giammi, Thomas, Cucchio, Giacomo, Nicholas, Scquizy, Rebe e Loris.

Ringrazio tutte le mie coinquiline che hanno condiviso l'appartamento e la convivenza con me, in particolar modo grazie a Mariangela e Serena. Grazie anche a tutte le altre persone con cui ho legato molto tra le quali Antonio, cugina Manu, Alby, e tutte le altre persone con cui ho piacevolmente condiviso parte (estesa o ridotta) della mia vita fino ad adesso, hanno lasciato tutte un prezioso segno d'esperienza nel mio percorso.

Infine ringrazio l'entomofauna di esistere, la natura per essere così splendida, la musica che infonde benessere e il Febo, perché è un essere bellissimo.

6. BIBLIOGRAFIA

- A.A.V.V., 2009. *Esiti del tavolo tecnico – L'impatto delle specie aliene sugli ecosistemi: proposte di gestione*, "Verso la Strategia Nazionale per la biodiversità: i contributi della Conservazione Ecoregionale, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare e WWF Italia.
- Allison, J.D., Borden, J.H. & Seybold, S.J. (2004) A review of the chemical ecology of Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology*, 14, 123–150.
- Chesmore D., 2008. *Automated Bioacoustics identification of insects for Phytosanitary and ecological applications*, in Frommolt K-H., Bardeli R., Clausen M., 2008, *Computational bioacoustics for assessing biodiversity*, Proceedings of the International Expert meeting on IT-based detection of bioacoustical patterns, December 7th until December 10th, 2007, Germany.
- Chesmore, D., Schofield, J. (2009) *Developing acoustic detection and identification methods for Anoplophora spp.* Second International Symposium on Anoplophora chinensis and A. glabripennis: Phytosanitary Strategies and Research, Vertemate Con Minoprio, Como, Italy, 1-3 April 2009.
- Chesmore, D., Schofield, J. (2010) *Acoustic detection of statutory pests in hardwood material*. Bulletin of the European Plant Pathology Organisation (EPPO). Vol. 40(1), 46-51.
- Corletto, D., 2012. *Prove di controllo chimico di Anoplophora glabripennis (Coleoptera Cerambycidae) con applicazione endoterapica*. Relatore Faccoli, M., Correlatore Favaro, R., Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Padova, Legnaro.
- COUNCIL OF EUROPE, 2004. European strategy on invasive alien species. Piero Genovesi and Clare Shine, Convention on the Conservation of European Wildlife and Habitats (Bern Convention). Nature and environment, No. 137. Council of Europe Publishing.
- Deecke, V., Janik, V. 2006: *Automated categorization of bioacoustic signals*. J. Acoust. Soc. Am., Vol. 119, No. 1, *Acoustical Society of America*. _DOI: 10.1121/1.2139067_PACS number_s_: 43.80._n, 43.60.Np, 43.80.Lb, 43.80.Ka _WWA_ Pages: 645–653.
- EPPO, 2010. Eppo A1 and A2 Lists of Pests Recommended for Regulation as Quarantine Pests. Online at: "[http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1GENERAL/pm1-02\(19\)_A1A2_2010.pdf](http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1GENERAL/pm1-02(19)_A1A2_2010.pdf)".
- EPPO, 2011. The European and Mediterranean Plant Protection Organization. Online at: "<http://www.eppo.org>".

- European Commission. COMMISSION DIRECTIVE 2004/102/EC of 5 October 2004 amending Annexes II, III, IV and V to Council Directive 2000/29/EC on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. Online at "http://eurlexeuropa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32004L0102:EN:HTML", 2004.
- European Commission, 2000. COUNCIL DIRECTIVE 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. Online at: "http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/2000/L/02000L0029-20060414-en.pdf", 2000.
- Colebrook F. M., 1937. The aural detection of the larvae of insects in timber. *Journal of Scientific Instruments*, 14:119–121.
- Ganchev, T., Potamitis, I. 2007. *Automatic Acoustic Identification of Singing Insects*, *Bioacoustics: The International Journal of Animal Sound and its Recording*, ISSN 0952-4622, vol. 16, pp. 281-328. Article published in the *Bioacoustics: The International Journal of Animal Sound and its Recording*.
- Haack R. A. et al, september 2009. *Managing Invasive Populations of Asian Longhorned Beetle and Citrus Longhorned Beetle: A Worldwide Perspective*. *Annu. Rev. Entomol.* 2010. 55: 521–46. The *Annual Review of Entomology* is online at ento.annualreviews.org
- Hoyer-Tomiczek, U.; Sauseng, G. 2009. *Detection dogs sniffle for quarantine pests ALB and CLB*. *Forstschutz Aktuell* No. 48 pp. 2-5, ISSN 1815-5103. Online at "http://www.cabdirect.org/abstracts/20103035046.html;jsessionid=E1F28CCF4779C75872F840C9C09B5540;jsessionid=78214F759D3BCDB48968976A7B7B0FC".
- Hu J., Angeli S., Schuetz S., Luo Y., Hajek A. E., 2009. *Ecology and management of exotic and endemic Asian longhorned beetle Anoplophora glabripennis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 11, 359–375 DOI: 10.1111/j.1461-9563.2009.00443.
- Maiutto, J., 2012. *Sfarfallamento, longevità e monitoraggio di adulti di Anoplophora glabripennis (Coleoptera Cerambycidae)*. Relatore Faccoli, M., Correlatore Favaro, R., Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Padova, Legnaro.
- Mankin R.W., Smith M.T., Tropp J.M., Atkinson E.B., Jong D.Y., 2008. *Detection of Anoplophora glabripennis (Coleoptera: Cerambycidae): larvae in Different Host Trees and Tissues by Automated Analyses of Sound-Impulse Frequency and Temporal Patterns*. *J. Econ. Entomol.* 101(3): 838–849 (2008).

- Pavan G. et al, 2008. *Short Term and Long Term Bioacoustic Monitoring of the Marine Environment*. Results from NEMO ONDE Experiment and Way Ahead. Computational bioacoustics for assessing biodiversity. Proceedings of the International Expert meeting on IT-based detection of bioacoustical patterns, December 7th until December 10th, 2007 at the International Academy for Nature Conservation (INA) Isle of Vilm, Germany.
- Pavan G., 2008. *Short field course on bioacoustics*, materiale della Taxonomy Summer School, 1-15 settembre 2008.
- R project. The R project for statistical computing, online at <http://www.r-project.org/>
- Schofield J., 2011. *Real-time Acoustic Identification of Invasive Wood-boring Beetles*. Submitted for the degree of Doctor of Philosophy, University of York, Department of Electronics. July 2011, United Kingdom.
- Schofield, J., Chesmore D. (2010) *Acoustic detection and monitoring of wood boring beetles*. Entomology 2010, Swansea, 26-28 July 2010.
- Schofield, J., Chesmore D. (2010) *Automated identification of beetles in hardwood*. Royal Entomological Society Technological Special Interest Group, Harpenden, 13 May 2010.
- .

