



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA



**Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**

**Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali
in Ambiente Mediterraneo**

Ciclo XXVII

Indagini di base per l'impiego di *Entomophaga maimaiga* nel
controllo di *Lymantria dispar* in ambiente mediterraneo

dr. Mario Contarini

Direttore della Scuola

prof.ssa Alba Pusino

Referente di Indirizzo

prof. Ignazio Floris

Docente Guida

prof. Pietro Luciano

Anno accademico 2013- 2014

INDICE

1 Premessa	4
2 Sintesi delle conoscenze su biologia, comportamento, dinamica di popolazione e lotta alla <i>Lymantria dispar</i>	6
2.1 Descrizione dell'insetto	6
2.1.1 Adulto	6
2.1.2 Uovo	7
2.1.3 Larva	8
2.1.4 Crisalide	9
2.2 Ciclo biologico	9
2.3 Diffusione	11
2.4 Piante ospiti	11
2.5 Danni	12
2.6 Variazioni di densità di popolazione	13
2.7 Metodi di campionamento e reti di monitoraggio	16
2.8 Elementi di previsione delle infestazioni	18
2.9 La lotta microbiologica applicata in Sardegna	19
2.10 Costi	23
3 Approfondimento delle conoscenze sui nemici naturali di <i>L. dispar</i> presenti in Sardegna	26
3.1 Materiali e Metodi	26
3.2 Risultati	29
3.2.1 Analisi statistica	29
3.2.2 Mortalità causata da parassitoidi	30
3.2.3 Mortalità causata da patogeni	30
3.3 Descrizione dei patogeni riscontrati	33
3.3.1 <i>Beauveria bassiana</i>	33
3.3.2 <i>Nosema</i> sp.	35
3.3.3 <i>LdNPV</i>	36
3.4 Sintesi dei risultati ottenuti	37
4 Note descrittive di biologia e diffusione di <i>Entomophaga maimaiga</i>	39
4.1 Descrizione e biologia di <i>E. maimaiga</i>	39
4.2 Introduzione negli Stati Uniti	45
4.3 Introduzione in Bulgaria	46
4.4 Specificità e tecniche di impiego come agente di controllo biologico	48
5 Indagini di laboratorio condotte in Sardegna	52

Mario Contarini 2
“Indagini di base per l’impiego di *Entomophaga maimaiga* nel controllo di *Lymantria dispar* in ambiente mediterraneo”
Tesi di dottorato in “Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo”
Università degli Studi di Sassari

5.1 Autorizzazione all'introduzione di <i>E. maimaiga</i> in Sardegna	52
5.2 Materiali e metodi	52
5.2.1 Allevamento delle larve e biosaggi	52
5.2.2 Conta delle spore	56
5.2.3 Analisi statistica	58
6 Risultati dei biosaggi	59
6.1 Biosaggi su larve di <i>L. dispar</i> testate col metodo della terra contaminata da spore di <i>E. maimaiga</i>	59
6.1.1 Anno 2012	59
6.1.2 Anno 2013	60
6.1.3 Anno 2014	60
6.1.3.1 Prov. di Sassari	60
6.1.3.2 Prov. di Catania	60
6.1.3.3 Prov. di Reggio Calabria	60
6.1.3.4 Prov. di Firenze e Prov. di Padova	61
6.2 Biosaggi su larve di <i>L. dispar</i> testate col metodo dell'immersione in soluzione contenente spore di <i>E. maimaiga</i>	62
6.3 Biosaggi condotti su larve di altri Lepidotteri	62
6.3.1 <i>Malacosoma neustria</i>	62
6.3.2 Altre specie	63
7 Discussione	65
8 Conclusioni	68
9 Bibliografia	70

1 Premessa

Le formazioni forestali della Sardegna si estendono per oltre 1,2 milioni di ettari occupando circa la metà dell'intera superficie dell'Isola. La gran parte è coperta da macchia mediterranea (640 mila ettari) e da boschi di latifoglie (500 mila ettari) costituiti, questi ultimi, principalmente da specie del genere *Quercus*: leccio, sughera e roverella. Inoltre si sommano 49 mila ettari di formazioni a conifera e circa 25 mila ettari costituiti da eucalipteti, castagneti e impianti di pino insigne (Campus *et al.*, 2013; Luciano e Franceschini, 2013). Queste formazioni e in particolare i boschi di quercia, hanno manifestato negli ultimi decenni un serio peggioramento delle condizioni fitosanitarie. Si sono registrati sempre più casi di piante o gruppi di esse con vegetazione stentata o colpite da precoce caduta delle foglie, disseccamento delle branche, marciumi radicali. Questo degrado progressivo che in taluni casi conduce alla morte delle piante, e che viene genericamente chiamato "deperimento delle querce" è un fenomeno complesso di difficile definizione e soluzione a causa dei molteplici fattori avversi di natura biotica e abiotica che vi sono coinvolti (Luciano e Franceschini, 2013). Tra questi in particolare, un ruolo fondamentale è svolto dai mutamenti globali del clima che si manifestano con l'incremento delle temperature medie stagionali, la riduzione delle precipitazioni annuali e l'aumento di frequenza degli eventi meteorici estremi. A questi si aggiungono i fattori legati all'attività antropica come il mancato o eccessivo svolgimento delle cure del bosco, il sovrappascolamento, l'azione devastante del fuoco. In queste condizioni, le piante vengono esposte a stress vegetativi che ne limitano la capacità di difesa da attacchi di parassiti e insetti fitofagi, aggravando così il processo di deperimento e velocizzandone sempre più spesso l'esito letale. Di fatto, anche a causa della recrudescenza di attacchi causati da patogeni e/o insetti fitofagi, in molti comprensori silvani si stanno delineando situazioni di vera emergenza fitosanitaria tanto da rendere urgente la programmazione di misure straordinarie volte a preservare dal degrado e conservare il cospicuo

patrimonio forestale della Sardegna che, oggi, costituisce al centro del Mediterraneo una riserva di biodiversità di indubbio valore naturalistico e socio-economico (Luciano e Franceschini, 2013).

Per quanto riguarda gli attacchi di natura entomologica, i lepidotteri defogliatori *Tortrix viridana* (L.) (Tortricidae), *Malacosoma neustria* (L.) (Lasiocampidae) e *Lymantria dispar* (L.) (Erebidae) negli anni di loro massima presenza rappresentano la problematica maggiore per le formazioni forestali, delle quali possono arrivare a compromettere non solo la produttività ma anche la vitalità. Tra questi fitofagi, un posto di primaria importanza spetta a *L. dispar* per ampiezza delle infestazioni e frequenza degli attacchi, in particolar modo nelle aree forestali maggiormente antropizzate (Luciano *et al.*, 2002). La necessità di contenere le pullulazioni di questo fillofago ha fatto ritenere opportuno indagare la possibilità di implementare il complesso dei suoi nemici naturali. L'entomopatogeno fungino *Entomophaga maimaiga*, introdotto negli Stati Uniti e più recentemente in Bulgaria per la lotta alle popolazioni di *L. dispar* ha dimostrato di avere la capacità di essere efficace anche quando la densità di presenza del suo ospite è bassa; ciò ha suggerito l'opportunità di saggiarne l'efficacia anche sul ceppo sardo di *L. dispar*. Questo studio, condotto negli ultimi 4 anni, ha avuto anche lo scopo di verificare la specificità del patogeno per il defogliatore, prima di intraprendere un programma d'introduzione in campo aperto.

2 Sintesi delle conoscenze su biologia, comportamento, dinamica di popolazione e lotta alla *Lymantria dispar*

2.1 Descrizione dell'insetto

L. dispar è uno tra i più dannosi lepidotteri forestali essendo in grado di causare estese defogliazioni a danno di un cospicuo numero di piante ospiti. Ha una distribuzione paleartica e dal 1869 è stata introdotta anche negli Stati Uniti dove dispendiosi programmi di controllo mirano al rallentamento dell'espansione dell'insetto verso occidente e alla sua eradicazione.

2.1.1 Adulto

Gli adulti (Fig. 2.1) mostrano uno spiccato dimorfismo sessuale: la femmina ha un'apertura alare di 50-65 mm e presenta un addome molto sviluppato di colore giallastro. Le ali sono biancastre con 4 striature trasversali a zigzag, spesso sfumate o addirittura assenti, ma con qualche macchia lineare a forma di V nerastra quasi sempre a metà ala presso il margine costale (Tremblay, 1986). Le antenne sono sottili.

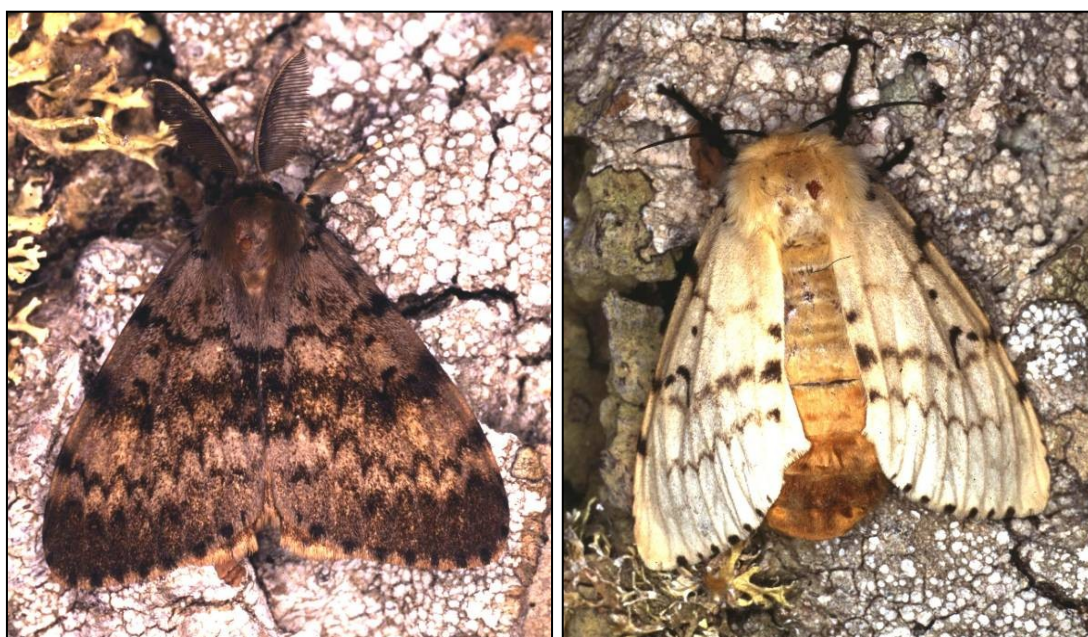


Fig. 2.1 - Adulti di *L. dispar* (maschio a sinistra e femmina destra).

La sottospecie presente in Europa, in Nord Africa e negli Stati Uniti (*L. dispar dispar*) è incapace di volare, mentre le sottospecie diffuse in Estremo Oriente (*L. dispar japonica* Mots. e *L. dispar hokkaidoensis* Gold.) hanno l'addome meno sviluppato e sono in grado di volare (Pintureau, 1981; Schaefer, 1989).

Il maschio, di dimensioni ridotte rispetto alla femmina, è di colore castano giallastro con antenne fortemente bipettinate e addome sottile. Le ali anteriori mostrano fasce scure molto visibili e quelle posteriori una fascia bruna sfumata spesso visibile al margine (Tremblay, 1986). E' un ottimo volatore.

Lo stadio di immagine dura circa una settimana durante il quale gli adulti non si nutrono.

2.1.2 Uovo

Le uova sono appiattite ai poli, di colore grigio-giallastro e con un diametro di circa 1 mm. Vengono deposte in ovature (Fig. 2.2) fulve e allungate (cm 2-6 x 2-3) caratterizzate dall'abbondanza di peli addominali che la femmina distacca durante la deposizione. Il numero di uova per ovatura è in relazione alla fase di gradazione dell'insetto e può variare da 100 a 1200.



Fig. 2.2 - Ovatura di *L. dispar* deposta su rametto.

2.1.3 Larva

Le larve neonate (Fig. 2.3) sono di colore scuro e presentano particolari setole lunghe e dilatate, dette aerostatiche, che ne favoriscono la dispersione ad opera del vento. La larva matura (Fig. 2.3) è generalmente di colore brunastro screziato di grigio e giallo anche se è facile riscontrare una notevole variabilità cromatica non solo di origine genetica ma dovuta anche alla specie vegetale sulla quale si è alimentata e alla fase della gradazione. La larva presenta inoltre tre paia di tubercoli per segmento da cui si dipartono grossi ciuffi di setole. I tubercoli dorsali sono blu nei primi cinque segmenti e rossi nei restanti. Si distinguono cinque età larvali nei maschi e sei nelle femmine.



Fig. 2.3 - Diverse età larvali di L. dispar (in alto ovatura con larve neonate; poi da sinistra a destra e dall'alto in basso: II, III, IV, V, VI età).

2.1.4 Crisalide

La crisalide è dapprima verdastra per divenire successivamente bruno-castana con una fine peluria rossastra (Fig. 2.4). Termina in punta con un cremaster ricco di uncini. La crisalide maschile (20-30 mm) è più piccola di quella femminile (30-40 mm).



Fig. 2.4 - Crisalide di *L. dispar*.

2.2 Ciclo biologico

L. dispar è specie monovoltina. Gli adulti iniziano a sfarfallare dalla terza decade di giugno (Fig. 2.5), raggiungono il massimo di presenze in luglio e, nelle zone più elevate, si rinvergono fino all'inizio di settembre (Luciano e Roversi, 2001). Le femmine della sottospecie europea, che non volano, richiamano di notte e anche da lunghe distanze, i maschi con il feromone sessuale (7R, 8S)- 2-metil-7, 8-epossioctadecano, sintetizzato in laboratorio e noto in commercio come *disparlure* da *dispar* e *lure*, attattivo (Iwaki *et al.*, 1974).

Gli accoppiamenti sono seguiti dalla deposizione delle uova che avviene preferenzialmente nel quadrante sud-orientale della pianta ospite e nella

forma delle già descritte ovature. Lo sviluppo embrionale si completa nelle 3-6 settimane successive alla deposizione. In questo modo le larve svernano in diapausa obbligatoria all'interno del corion.

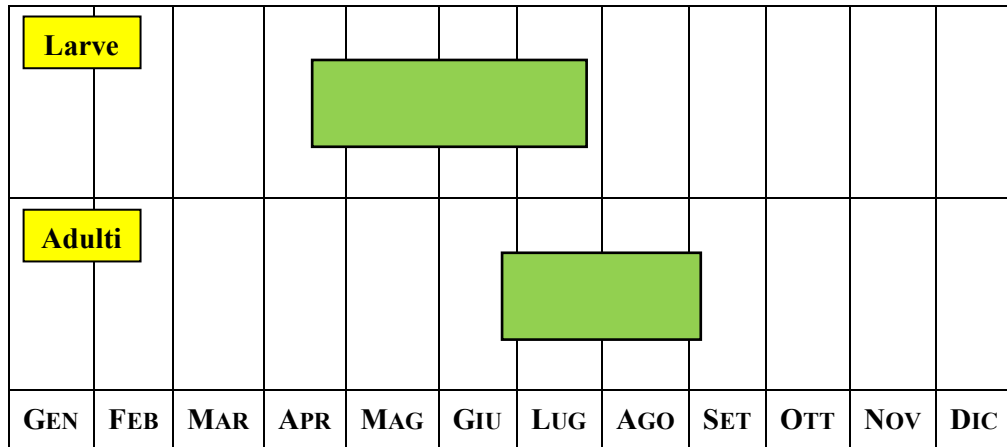


Fig. 2.5 - Periodi di presenza in campo di larve e adulti di *L. dispar*.

In primavera avviene la schiusura delle uova solo dopo che si sono stabilite temperature medie settimanali superiori a 10 °C (Luciano e Roversi, 2001) e questo ha di solito luogo in aprile, in concomitanza con l'emissione dei germogli dell'ospite, che vengono subito erosi. In annate con particolare andamento climatico ed elevate temperature nel mese di marzo può verificarsi la nascita anticipata delle larve rispetto all'emissione delle nuove foglie. Le larve neonate possono comunque superare la situazione in quanto capaci di resistere anche una settimana senza nutrirsi o comunque spostandosi su altre piante ospiti, soprattutto nei boschi misti (Prota, 1976). Le larve di prima età sono fototropicamente attive e hanno una forte tendenza alla dispersione per questo tendono a raggiungere i rami più alti della pianta per poi lasciarsi sospendere, appese a fili di seta, e trasportare dal vento per chilometri, aiutate dalla lunghezza delle setole normali e da quelle aerostatiche e sopperendo così alla scarsa mobilità delle femmine adulte nella diffusione della specie (Tremblay, 1986).

Lo sviluppo preimmaginale si completa in circa due mesi, quando le larve giunte a maturità si incrisalidano generalmente solo dopo aver approntato un

riparo costituito da radi fili sericei. Lo stadio di crisalide dura da 7 a 15 giorni, dopodiché gli adulti sfarfallano completamente formati, rompendo l'involucro pupale.

2.3 Diffusione

Si ritiene che l'area di origine di *L. dispar* sia l'estremo oriente asiatico (Corea e Giappone) da dove si è poi diffuso in Cina, Russia, Iran per giungere in Europa, dalla Finlandia Meridionale al bacino del Mediterraneo, e in Nord Africa.

Nel 1869 un litografo francese, Etienne Leopold Trouvelot, portò alcune ovature di *L. dispar* in Massachusetts (USA) allo scopo di allevare un'alternativa al baco da seta americano *Antheraea polyphemus* (Cramer) e causando invece l'introduzione negli USA della specie forestale divenuta la più dannosa, avendo causato dal 1924 la defogliazione di oltre 34 milioni di ettari di foreste americane (McManus, 2007).

2.4 Piante ospiti

L. dispar è specie altamente polifaga: le larve infatti possono alimentarsi a danno di un gran numero di specie arboree, arbustive ed erbacee (oltre 450). In primo luogo preferisce le querce (*Quercus* spp.), ma fortemente appetiti sono anche frassini, carpini, betulle, faggi e castagni, e ancora altre latifoglie boschive come olmi, pioppi e aceri, drupacee e pomacee e varie conifere, in particolare il pino. In ambiente mediterraneo la specie preferita è senza dubbio *Quercus suber* L. e in talune circostanze, specialmente nelle fasi di culmine della popolazione dell'insetto, non vengono risparmiati arbusti della macchia mediterranea come corbezzolo, erica e cisto.

2.5 Danni

Come detto *L. dispar* può causare la completa distruzione dell'intero apparato fogliare delle piante ospiti (Fig. 2.6). Quando l'insetto è in fase di culmine il danno può estendersi ad interi comprensori forestali specialmente in quelle zone in cui il fitofago è stato introdotto, come in Nord America, e dove quindi non vi sono antagonisti naturali specifici, se non quelli introdotti in un'intensa attività di raccolta e allevamento condotta per diversi decenni in Eurasia (Fuester *et al.*, 1981) solo in parte con risultati positivi. La defogliazione causa alla pianta alterazioni fisiologiche, interferendo con la traspirazione e la distribuzione degli elaborati e influenzando l'attività cambiale e la formazione degli organi riproduttivi. Studi condotti in Sardegna hanno evidenziato che nelle sughere la massa fogliare originaria viene ricostituita solo gradualmente e l'effetto della defogliazione si manifesta ancora nei 2-3 anni successivi, seppur in misura decrescente; la totale mancanza di foglie provoca la riduzione dell'accrescimento in altezza del 63% e dell'ampiezza degli anelli del legno del 45% (Luciano *et al.*, 2003).



Fig. 2.6 - Defogliazione di *L. dispar* in una sughereta del centro Sardegna.

Per la sughera il danno riguarda soprattutto la notevole riduzione della produzione della scorza suberosa, valutata intorno al 60% nell'anno di completa defogliazione e al 32% nell'anno successivo, ma la riduzione di incremento del sughero risulta comunque rilevante (42%) anche nelle annate in cui il fitofago distrugge solo il 50% della massa fogliare (Cambini, 1971). Inoltre, in regioni a vocazioni turistica, quale appunto la Sardegna, le defogliazioni deturpano il paesaggio proprio all'inizio della stagione estiva, scoraggiando, tra le altre cose, i turisti dal soggiornare in strutture agrituristiche. A ciò si aggiunga la mancata produzione di ghiande, importante fonte di nutrimento negli allevamenti bradi.

2.6 Variazioni di densità di popolazione

L. dispar, al pari di altre specie di insetti, ha variazioni di densità di popolazione denominate fluttuazioni o variazioni transcicliche, influenzate da fattori biotici e abiotici. Tali fluttuazioni si ripetono ciclicamente e l'intervallo di tempo che intercorre tra due momenti di massima intensità è definito gradazione. Sono state identificate 4 fasi: la fase di progradazione durante la quale la popolazione mostra incrementi di abbondanza; la fase di culmine, in cui la popolazione raggiunge la massima densità e si verificano i danni da defogliazione; la fase di retrogradazione, in cui la popolazione decresce per giungere alla fase di latenza in cui la densità di popolazione si mantiene bassa. I picchi di infestazione massale si ripetono ogni 7-9 anni, nell'ambito dei quali per almeno 1-2 anni consecutivi si registrano i ben noti danni (Luciano *et al.*, 1982). Tale situazione è stata osservata negli ambienti subericoli in cui il bosco mantiene ancora una notevole complessità, data in particolare dalla presenza del ricco sottobosco arbustivo tipico delle aree mediterranee; nelle zone in cui l'uomo ha maggiormente semplificato la struttura dell'ecosistema, intervenendo sia con tecniche selvicolturali poco razionali sia con pratiche agronomiche, come ad esempio il decespugliamento e l'aratura per ampliare le superfici a pascolo, le

infestazioni di *L. dispar* risultano più frequenti ripetendosi ogni 5-6 anni (Fig. 2.7). In questi ambienti, l'estrema semplificazione della fitocenosi determina un impoverimento dell'entomofauna, di conseguenza la rarefazione delle convittime riduce sensibilmente la possibilità di riproduzione per gli ausiliari polifagi e polivoltini, che risultano indispensabili proprio nel contenimento delle popolazioni di *L. dispar* a basse densità (Luciano *et al.*, 2002).



Fig. 2.7 - Defogliazioni di *L. dispar* in ambienti a sughera fortemente semplificati da pratiche agronomiche.

A partire dal 1964, l'Istituto di Entomologia agraria dell'Università di Sassari ha dato inizio a osservazioni sistematiche nelle principali aree subericole sarde allo scopo di comprendere meglio le dinamiche che regolano le variazioni di abbondanza dei lepidotteri defogliatori, in particolare di *L. dispar* in Sardegna. Queste indagini hanno permesso di comprendere come l'incremento di popolazione del fitofago sia da una parte favorito dall'azione antropica e dall'altra contrastato da un pool di nemici naturali. Tra questi ultimi un ruolo importante è svolto da antagonisti entomofagi, appartenenti in gran parte alla classe *Insecta* la cui azione tuttavia non è sempre costante.

Durante la fase di latenza infatti, quando cioè la densità di popolazione del defogliatore è bassa, è possibile che possa diventare difficoltoso per parassitoidi e predatori la ricerca di convittime e questo consente al fitofago di sfuggire all'azione di controllo dei suoi nemici e crescere enormemente di abbondanza nel volgere di pochi anni. Queste zone, in cui tale fenomeno avviene, diventano focolai d'infestazione in quanto masse di individui si spostano verso i territori limitrofi andando a sconvolgere l'equilibrio *L. dispar*-nemici naturali e quindi favorendo l'innescò di una fase di progradazione. Solo dopo qualche anno, generalmente 2 o 3, il complesso di antagonisti, favorito dal gran numero di vittime a disposizione, riesce a prevalere sul fitofago, ma oramai troppo tardi per impedire la defogliazione. Vari studi (Luciano e Prota, 1981; 1986) evidenziano quanto precedentemente detto: i più efficaci parassitoidi di *L. dispar*, *Blepharipa pratensis* Meigen e *Parasetigena silvestris* Robienau-Desvoidy (Diptera Tachinidae), esplicano la loro azione maggiormente durante la fase di retrogradazione del fitofago, quando appunto la defogliazione è stata già causata.

B. pratensis è un dittero tachinide monovoltino che depone uova microtipiche sul fogliame (Ticehurst *et al.*, 1978). Ha un elevato potenziale biotico e il suo ciclo è sincronizzato con quello di *L. dispar* seppur, come detto, sfasato di qualche anno. Raggiunge tassi di parassitizzazione superiori al 60% (Luciano e Prota, 1981).

P. silvestris è anch'esso un dittero tachinide monovoltino che depone le uova sul corpo della larva da parassitizzare, in corrispondenza della parte posteriore della capsula cefalica (Ticehurst *et al.*, 1978).

Altri parassitoidi attivi principalmente a danno dello stadio larvale di *L. dispar* sono *Exorista larvarum* L. (Diptera Tachinidae), *Cotesia melanoscela* Ratzeburg (Hymenoptera Braconidae), *Phobocampe uncinata* Gravenhorst (Hymenoptera Ichneumonidae) la cui efficacia è quasi sempre ridotta.

Tra i parassitoidi pupali, *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hymenoptera Calciididae) ha un ampio spettro di specie di lepidotteri come possibili ospiti. Il tasso di efficacia su *L. dispar* oscilla tra il 20 e il 60% quando la popolazione dell'ospite è elevata.

2.7 Metodi di campionamento e reti di monitoraggio

Gli studi condotti dall'Istituto di Entomologia miravano anche a giungere a una pianificazione degli interventi di controllo delle popolazioni di *L. dispar*, fondata su una serie di elementi obiettivi di previsione delle infestazioni (Prota e Luciano, 1989; Luciano *et al.*, 2003). Negli Stati Uniti per esempio, il programma "Slow the Spread" che ha come obiettivo il rallentamento dell'invasione di *L. dispar* delle aree non ancora colonizzate, è basato sulla costituzione di una rete di trappole a feromone (oltre 100.000 ogni anno) lungo tutto il fronte di espansione dell'insetto al fine di identificare e susseguentemente eradicare le nuove popolazioni (Tobin e Blackburn, 2007). Il ricorso a trappole a feromoni al fine di acquisire elementi sufficienti ad esprimere la densità di *L. dispar* in Sardegna ha invece fornito risultati contrastanti (Luciano, 1989).

Il conteggio delle ovideposizioni unito all'osservazione delle loro caratteristiche è sicuramente uno dei metodi di campionamento più impiegati in quanto le ovature risultano essere facilmente visibili sulle piante e perché permangono in campo per lungo tempo (da fine estate alla primavera successiva). Negli Stati Uniti sono stati impiegati metodi che prevedono il conteggio delle ovature presenti sulle piante all'interno di parcelle di dimensioni fisse e/o variabili (generalmente 0.01, 0.05 e 0.061 ettari); la densità di popolazione viene espressa come numero di ovature per unità di superficie (Elkinton e Liebhold, 1990).

In Sardegna è stato adottato un metodo studiato nelle sugherete del Marocco (Fraival *et al.*, 1978). Esso prevede l'esame di 10 piante successive e allineate per direzione cardinale a partire da un punto di riferimento comune centrale e

permette di valutare in modo attendibile il numero medio di ovature per pianta sulla circostante superficie di 5 ettari. Tale metodo ha consentito di verificare come ai livelli di popolazione più elevati (in genere al di sopra della soglia di 100 ovature su 40 piante) ha corrisposto la defogliazione dei siti d'indagine e quella del territorio circostante. Per esempio nel 1982 è stata registrata la defogliazione di circa 60.000 dei 90.000 ettari di sugherete della regione (Luciano e Prota, 1985).

Dall'inverno del 1980 è stata realizzata una fitta rete di monitoraggio costituita da 111 siti ricadenti nei principali comprensori subericoli dell'Isola, posti ai lati delle principali vie di comunicazione e in genere distanziati l'uno dall'altro 5 km (Luciano *et al.*, 2003). Tale rete è stata nel 1983 ampliata fino a 166 siti e l'anno seguente è stata portata a 282 includendo così anche i principali boschi a leccio e roverella (Prota e Luciano, 1989). Dal 2002, il numero di siti monitorati ha superato il numero di 400, coprendo così tutte le formazioni a querce della Sardegna. Il posizionamento dei siti ha anche permesso la determinazione di comprensori che presentassero continuità della superficie boschiva nonché caratteristiche floristiche e orografiche il più possibile omogenee. Così sono stati individuati due comprensori in Gallura, un terzo nel Logudoro, un quarto in Planargia, il quinto nel nuorese e nella zona dell'Altopiano di Buddusò, il sesto e il settimo nel Marghine-Goceano, l'ottavo nel versante nord-occidentale del Gennargentu e nel Mandrolisai, il nono nelle leccete dell'Ogliastra, il decimo nella Giara di Gesturi, l'undicesimo nell'Iglesiente e il dodicesimo nei monti dei Sette Fratelli.

I dati annualmente ottenuti hanno consentito di fare previsioni sui rischi di defogliazione nei vari comprensori boschivi e hanno condotto all'individuazione tempestiva dei primi focolai d'infestazione, caratteristici della fase di progradazione (Luciano *et al.*, 2003). Inoltre il confronto dei dati del conteggio delle ovature con le osservazioni estive su localizzazione e estensione dei danni da defogliazione ha confermato la bontà di tali previsioni.

2.8 Elementi di previsione delle infestazioni

Indagini condotte sul numero di ovature e sulle loro caratteristiche e posizione sulla pianta hanno fornito indicatori utili a stabilire la fase di gradazione nella quale si trovava la popolazione dell'insetto. In fase di latenza oltre il 75% delle ovature sono posizionate al di sotto di due metri di altezza dal suolo, con una buona parte localizzate sotto i 50 cm. In fase di progradazione il 40-60% è deposto oltre i due metri di altezza ma una parte non trascurabile rimane sotto i 50 cm. Nella fase di culmine, oltre il 75% delle ovature è situato oltre i 6 metri d'altezza, maggiormente sui rami più esterni. In fase di retrogradazione infine, il 40-60% è deposto tra 2 e 6 metri dal suolo, ma non si osservano ovideposizioni al di sotto dei 2 metri.

Altro elemento in grado di dare importanti informazioni legate alla fase della gradazione è risultata la fecondità della specie. L'esame delle ovature raccolte in una vasta gamma di condizioni di densità ha messo in evidenza come il numero medio di uova per ovatura aumenti passando dalla fase di latenza a quella di progradazione e poi di culmine (da 450 uova per ovatura a 600) per poi calare in fase di retrogradazione (350 uova per ovatura). Altri indicatori della fase di gradazione possono essere ricavati dall'esame delle ovature: il tasso di uova non embrionate per esempio aumenta dalla fase di latenza (8%) alla fase di culmine (16%) per toccare i valori massimi in fase di retrogradazione (25%); la correlazione positiva verificata tra la lunghezza dell'ovatura e il numero di uova presenti ha consentito di ridurre i tempi di valutazione della fecondità (Luciano e Prota, 1989).

L'ampiezza delle conoscenze oggi disponibili consente quindi di affermare che è possibile esprimere solo con i rilievi sulle ovature giudizi attendibili sul "trend" della popolazione del Limantride anche per aree forestali nelle quali si opera per la prima volta e non si hanno informazioni attendibili delle condizioni pregresse (Luciano *et al.*, 2003).

Ulteriori studi sono stati condotti sui fattori biotici che incidono sulle popolazioni del defogliatore e sono in grado di offrire utili informazioni

riguardo alle varie fasi di densità dell'insetto. La percentuale di parassitizzazione causata degli Imenotteri oofagi *Ooencyrtus kuwanae* (How.) (Encirtide) e *Anastatus disparis* Ruschka (Eupelmide) risulta essere inferiore al 10% negli anni di progradazione e di culmine mentre è sempre superiore al 10% negli anni di retrogradazione e latenza (fino a un massimo del 23% circa). I livelli di predazione da parte dei Coleotteri *Dermestes lardarius* L. (Dermestidae) e *Aplocnemus jejunos* Kiesenwetter (Dasytidae) si mantiene su livelli minimi durante tutte le fasi di gradazione, ad eccezione del periodo di latenza in cui si registra un leggero aumento d'incidenza (Luciano e Prota, 1984).

2.9 La lotta microbiologica applicata in Sardegna

A partire dagli anni '60, la Sardegna è stata interessata da una campagna di lotta ai defogliatori forestali condotta con largo impiego di insetticidi chimici. Nel 1962 e nel 1963 il DDT è stato irrorato con l'impiego del mezzo aereo su circa 11.000 ettari di sugherete infestate da *L. dispar* e *M. neustria* (Zanardi e Loi, 1973).

Successivamente, a causa del sopraggiunto divieto di utilizzo del DDT per i ben noti effetti negativi che questo prodotto di sintesi arreca agli equilibri ambientali, si è interrotto qualsiasi intervento di lotta che fosse privo di selettività nei confronti dell'entomofauna utile.

Nel 1988, solo dopo aver ottenuto le opportune autorizzazioni ministeriali esclusivamente per l'impiego di insetticidi microbiologici, si è dato inizio a un programma sperimentale di lotta ai defogliatori forestali con l'utilizzo di *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* (*Btk*) (Fig. 2.8). Il primo trattamento è stato eseguito su una sughereta di 300 ettari in territorio di Abbasanta distribuendo il formulato commerciale Dipel a basso volume e alla dose di 1 kg per ettaro (Luciano *et al.*, 2003).



Fig. 2.8 - Irrorazione di *Bacillus thuringiensis kurstaki* in sugherete sarde.

I risultati non sono stati però da subito soddisfacenti in quanto l'intervento ha causato una mortalità larvale di solo il 20% in più rispetto a quella registrata nell'area testimone (Luciano e Prota, 1989) e per tale motivo sono stati proseguiti fra il 1989 e il 1995. Le prove hanno interessato più prodotti impiegati seguendo i consigli delle case produttrici riguardo alle dosi e alle metodologie di irrorazione. Le osservazioni sulla mortalità larvale hanno consentito di giungere ad alcune importanti conclusioni:

- dosi di 60 Miliardi di Unità Internazionali (MUI) per ettaro consentono di ottenere un'efficace protezione del fogliame anche quando la densità di *L. dispar* è elevata e quando la popolazione è costituita per il 30% da larve di III età.
- L'irrorazione aerea a ultra basso volume con l'impiego di micronair favorisce una maggiore ed uniforme penetrazione dei prodotti all'interno della chioma e risulta logisticamente meno onerosa (Prota *et al.*, 1996).

Durante la sperimentazione è stato anche valutato se l'impiego dei vari formulati microbiologici testati potesse avere conseguenze negative sull'attività degli entomofagi. A tal fine, nelle parcelle irrorate e in altre

limitrofe non trattate si è provveduto alla raccolta periodica di larve e crisalidi di *L. dispar* e al successivo loro allevamento in laboratorio fino al completamento dello sviluppo o allo sfarfallamento dei parassitoidi. Si è così accertata la compatibilità tra l'uso del *B. thuringiensis* e la salvaguardia del complesso di antagonisti che concorrono alla regolazione delle popolazioni del defogliatore. La minore incidenza di qualche specie di parassitoide è infatti risultata strettamente legata alla premorienza delle larve ospiti nelle aree trattate e/o alla maggiore abbondanza di larve e crisalidi nelle parcelle non trattate che ne facilita la ricerca da parte degli antagonisti naturali (Prota *et al.*, 1996; Luciano *et al.*, 2003).

Altri e altrettanto importanti studi di compatibilità ambientale sono stati condotti nel triennio 1997/1999: sono stati confrontati gli effetti di una defogliazione totale di una sughereta e dei trattamenti con *Btk* sulla lepidotterofauna no target infeudata alla sughera. Dall'analisi dei dati raccolti in campo è emerso che nelle aree trattate, nella settimana successiva all'irrorazione dell'insetticida, si è verificata una riduzione di larve intorno al 70% mentre nelle aree testimoni la stessa mortalità è stata osservata dopo due settimane a causa dell'assenza di nutrimento in conseguenza della defogliazione delle piante ospiti. In sintesi si può affermare che gli effetti di un trattamento con *B. thuringiensis* sulla lepidotterofauna no target sono simili a quelli che si hanno in caso di defogliazione totale. Nella primavera successiva inoltre non è stata osservata nessuna differenza tra l'area trattata e quella testimone per quanto riguarda il numero e l'abbondanza di specie di lepidotteri. In presenza di elevate densità di popolazione di *L. dispar*, si ritiene quindi che un trattamento con *Btk* che previene la defogliazione del bosco appare proponibile poiché non solo permette di proteggere la produzione primaria delle sugherete ma non determina nessun effetto negativo apprezzabile di lunga durata nell'ecosistema forestale (Luciano e Lentini, 1999).

Alla luce di questi confortanti risultati, a partire dal 2001, ha avuto inizio una estesa campagna di lotta ai defogliatori forestali che ha interessato oltre 100.000 ettari di boschi sardi. L'unico prodotto impiegato è stato il Foray 48B (Valent BioSciences Corporation, USA) per la sua facilità di distribuzione a ultra basso volume e perché si è dimostrato il più efficace nell'ambiente sardo.

La valutazione dell'abbondanza di popolazione di *L. dispar*, rilevata nei comprensori forestali sardi ogni anno grazie ai monitoraggi dello stadio di uovo descritti in precedenza, ha consentito di ottenere in anticipo indicazioni utili per la programmazione degli interventi di lotta, ponendo così in evidenza le aree boschive nelle quali il defogliatore era potenzialmente dannoso (Luciano *et al.*, 2003). La fase successiva prevedeva i sopralluoghi per confermare la reale presenza dell'insetto e la delimitazione delle aree a rischio defogliazione. Queste venivano scelte seguendo alcuni parametri: estensione della copertura boschiva e continuità della stessa per facilitare la distribuzione omogenea del prodotto insetticida e garantire una maggiore efficacia dell'operazione, produttività e sanità del bosco e infine venivano preferite le aree che mostravano maggior isolamento possibile dalle aree non trattate per evitare la reinfestazione da parte di larve in diffusione attiva dalle zone defogliate. Delimitate le aree, altra fase importante era la scelta del periodo di intervento. A tal fine sono stati condotti campionamenti per monitorare lo sviluppo larvale a partire dalla schiusura delle uova; i trattamenti sono stati eseguiti quando la popolazione larvale era per il 90% composta da individui di II e III età per la particolare sensibilità all'azione dell'insetticida e per il fatto che le larve di queste età ingeriscono quotidianamente un quantitativo di fogliame sufficiente ad assumere una dose letale di prodotto. I trattamenti sono stati eseguiti sempre nel mese di maggio, anche per superare il periodo nel quale eventuali ritorni di freddo potessero causare nelle larve un rallentamento nel ritmo di alimentazione.

I trattamenti sono stati eseguiti impiegando elicotteri muniti di micronair per la distribuzione del prodotto a ultra basso volume. Per ogni ettaro sono stati utilizzati 4 litri di bioinsetticida (corrispondenti a 50,8 MUI).

L'efficacia del trattamento è stata valutata stimando la riduzione della popolazione larvale in 2-4 stazioni di monitoraggio per area trattata. In ogni stazione, prima e 7-10 giorni dopo l'esecuzione dei trattamenti, è stato determinato il numero di larve presenti su 40 rametti di almeno 30 cm di lunghezza, prelevati a caso in numero di 4 per pianta da 10-20 piante lungo un transetto che attraversava la stazione (Luciano e Lentini, 2012).

Nella tabella 2.1 sono riassunti i dati di 10 anni di lotta microbiologica alla *L. dispar* in Sardegna con le aree interessate dai trattamenti e la mortalità rilevata (Luciano e Lentini, 2012). A questi bisogna aggiungere i circa 20.000 ettari di foreste trattati con *Btk* per contrastare le pullulazioni di *M. neustria*.

2.10 Costi

I costi relativi agli interventi di lotta ai defogliatori forestali in Sardegna comprendono l'acquisto del bioinsetticida, il noleggio del mezzo aereo per la distribuzione del prodotto, la remunerazione del lavoro aereo e della consulenza e assistenza fornita dall'Università di Sassari. Il totale comprendente tutte le voci elencate risulta essere compreso tra 43,31 e 48,45 Euro per ettaro trattato (Luciano *et al.*, 2003). Si tratta tuttavia di cifre che risultano essere minori dei mancati guadagni causati dalla defogliazione delle piante. Alcuni studi hanno infatti messo in evidenza come una defogliazione completa comporti una riduzione nell'incremento del sughero equivalente a 1,5 quintali per ettaro in una sughereta degradata e a 7,6 quintali in una sughereta correttamente gestita; ipotizzando un prezzo medio per quintale di 190 Euro, ciò si traduce, nel corso di un ciclo produttivo di 10 anni, in una perdita di produzione per ettaro del valore rispettivamente di circa 290 e

Tab. 2.1 - Densità larvale e mortalità di *L. dispar* nelle aree trattate con Btk in Sardegna (da Luciano e Lentini, 2012).

Year	Treated site	Treated area (ha)	Larvae/branch tip before treatment (No \pm SD)	Mortality (%)
2001	Berchidda, Monti (OT)	5,000	2.28 \pm 1.44	81.7
	Buddusò, Alà dei Sardi (SS)	5,000	2.60 \pm 1.13	97.1
2002	Ardara (SS)	800	3.63 \pm 0.69	75.1
	Sarule (NU)	700	2.39 \pm 1.03	85.5
	Sorgono (NU)	1,900	3.15 \pm 1.26	79.8
2003	Villanova (SS)	800	6.67	75.6
	Ploaghe (SS)	1,500	2.10 \pm 1.45	86.9
	Sorgono (NU)	3,000	2.18 \pm 1.32	81.3
	Abbasanta, Ghilarza (OR)	2,000	3.82 \pm 2.17	91.8
	Samugheo (OR)	2,000	2.61 \pm 2.77	91.4
2004	Bosa (NU)	2,000	1.80 \pm 2.16	82.6
	Abbasanta (OR)	2,000	1.53 \pm 0.87	67.5
	Iglesias (CA)	2,000	7.88 \pm 5.86	57.4
2005	Tempio P., Aggius (OT)	3,500	1.60 \pm 1.34	70.9
	Bono (SS)	3,000	0.85 \pm 0.45	72.3
	Oschiri (SS)	700	1.83 \pm 1.75	90.5
	Iglesias (CA)	3,000	1.37 \pm 1.24	92.7
2007	Buddusò (SS)	4,000	1.33 \pm 1.30	77.5
	Bono (SS)	2,000	3.61 \pm 1.43	69.1
	Calangianus (OT)	2,000	1.49 \pm 0.27	84.6
	Monti (OT)	2,000	5.20 \pm 1.80	74.9
	Nuorese (NU)	4,000	1.79 \pm 0.94	74.5
	Ortueri, Samugheo	4,000	2.14 \pm 1.01	85.2
2009	Berchidda, Monti, Telti (OT)	5,000	15.48 \pm 4.20	58.3
	Bono (SS)	1,300	14.60	67.3
	Bortigiadas, Tempio P., Calangianus (OT)	5,000	4.34 \pm 0.05	85.0
	Orani, Orotelli, Mamoiada (NU)	3,000	-	-
	Abbasanta, Ghilarza, Norbello, Aidomaggiore (OR)	3,000	12.58 \pm 4.58	56.4
	Burcei, Castiadas (CA)	2,000	-	-
	Calangianus (OT)	2,500	1.67 \pm 0.67	88.4
2010	Alà dei Sardi (OT)	2,500	-	-

1.444 Euro (Luciano *et al.*, 2003; Pintus, 2003). In questo computo non rientra inoltre il valore del danno ambientale arrecato dalla defogliazione, con tutte quelle implicazioni di cui si è già parlato che risultano di difficile quantificazione monetaria ma che rivestono un'estrema importanza per una regione a marcata vocazione turistica come la Sardegna.

Tuttavia, la spesa complessiva di quasi 5 milioni di Euro sostenuta dall'Amministrazione Pubblica nell'arco del decennio 2001-2010 per far

fronte alle spese necessarie agli interventi di lotta microbiologica contro le popolazioni dei defogliatori forestali in Sardegna, induce a riflettere sulla necessità di cambiare completamente approccio al problema. In primo luogo sarebbe opportuno ricorrere a strumenti di pianificazione dell'uso del territorio per evitare che un eccessivo sfruttamento dello stesso ne metta a rischio la diversità floristica e faunistica e crei le condizioni favorevoli per le pullulazioni degli insetti nocivi. Sarebbe inoltre da considerare l'ipotesi di implementare il complesso di nemici naturali dei defogliatori introducendo organismi che siano innocui per l'ambiente, in quanto specifici per i suddetti lepidotteri, e che siano in grado di agire anche quando le popolazioni dei defogliatori sono in fase di latenza.

3 Approfondimento delle conoscenze sui nemici naturali di *L. dispar* presenti in Sardegna

Alla luce di queste considerazioni, negli anni scorsi è stato dato inizio a un programma di ricerca pluriennale volto ad ampliare le conoscenze sugli agenti patogeni e i parassitoidi di *L. dispar* in Sardegna, per comprendere se i 10 anni di trattamenti condotti nell'Isola con *Btk* su ampie aree forestali avessero in qualche misura causato variazioni qualitative e quantitative al complesso di nemici naturali del defogliatore. Contemporaneamente, indagini sono state condotte per verificare l'opportunità d'introdurre in Sardegna un organismo alieno, il fungo entomopatogeno *Entomophaga maimaiga*, in grado di svolgere in maniera efficace un controllo delle popolazioni di *L. dispar*, sia nel suo areale di origine (Giappone e Estremo Oriente) sia nelle zone in cui è stato introdotto (Stati Uniti e Europa balcanica), anche quando il defogliatore si trova in fase di latenza. Per questo motivo inizialmente lo studio è stato condotto per verificare se *E. maimaiga* avesse già esteso il proprio areale raggiungendo la Sardegna dalla penisola balcanica dove è stato introdotto e si è diffuso con successo a partire dal 1999 (Pilarska *et al.*, 2000).

3.1 Materiali e Metodi

Sono stati monitorati 15 siti nel 2010 e 11 nel 2011, di cui sei in entrambe le annate, ricadenti in aree forestali dominate da sughera e in due casi da leccio, nella Sardegna centro settentrionale (Fig. 3.1). Delle aree in esame sono state registrate le coordinate geografiche e la densità del defogliatore, mediante la conta delle ovature presenti (Tab. 3.1). Tutte le popolazioni in entrambi gli anni sono risultate in fase di retrogradazione o latenza, per cui nessuna area è stata oggetto di trattamenti con *Btk* durante il biennio.

Da ognuno dei siti in esame, in un'unica raccolta, sono state prelevate 40 larve di *L. dispar* di III/V età. In totale sono state raccolte 1040 larve (600 esemplari il primo anno e 440 il secondo).

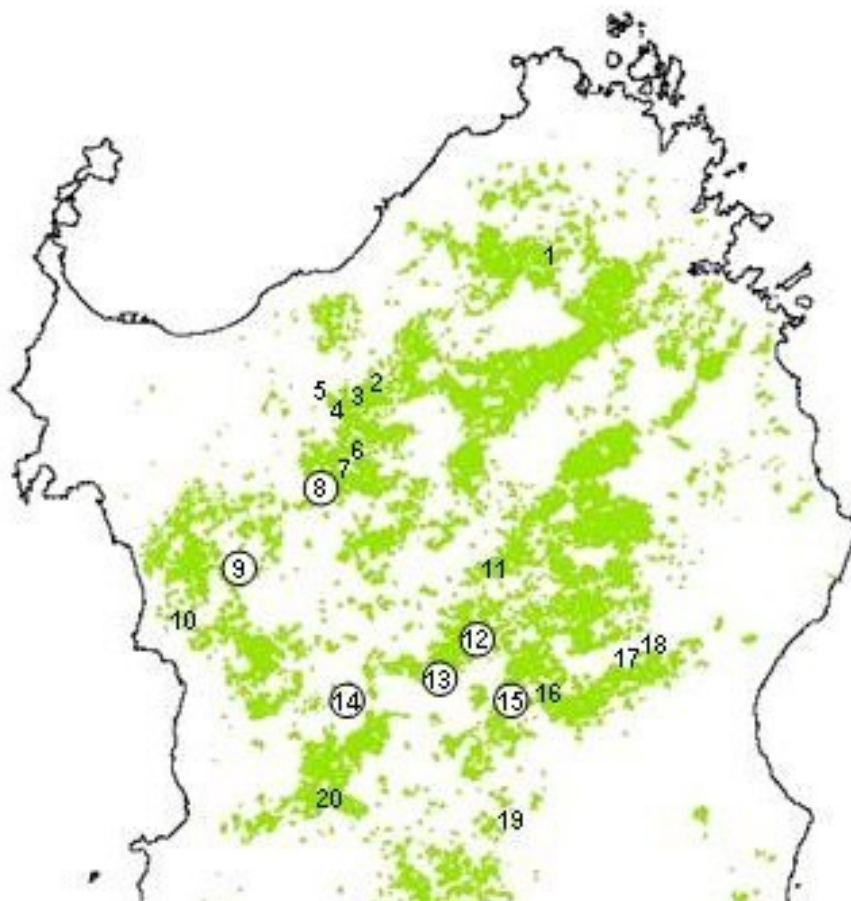


Fig. 3.1 - Carta della Sardegna centro settentrionale con la distribuzione delle sugherete in verde; i numeri indicano la posizione dei siti di studio. In quelli cerchiati la raccolta di larve è avvenuta in entrambi gli anni di studio. I siti 17 e 18 si riferiscono a leccete.

Le larve sono state allevate in contenitori individuali di 100 ml nutrendole con dieta commerciale sterile (Southland Products, Inc) (Bell *et al.*, 1981, Solari *et al.*, 2002) e mantenute per tutta la durata dello sviluppo a 23 ± 2 °C, 16 ore di luce e 8 di buio, fino alla morte o all'impupamento. Le larve morte sono state poste per 10 giorni in piastre Petri con carta bibula inumidita con acqua sterile al fine di favorire la formazione di micelio o spore fungine e poi conservate in frigorifero per essere esaminate.

Ogni larva morta è stata sezionata e osservata al microscopio (100 e 400X) per evidenziare la causa di morte.

Tab. 3.1 - Località, coordinate geografiche e numero di ovature di *L. dispar* nei siti di studio.

Siti	Coordinate geografiche	N. di ovature su 40 piante	
		2010	2011
Calangianus (OT)	40°56'13.62 N, 09°12'41.90 E	0	-
Chiaromonti I (SS)	40°45'30.91 N, 08°50'51.41 E	43	-
Chiaromonti II(SS)	40°43'50.88 N, 08°49'23.52 E	-	1
Chiaromonti III	40°42'39.42 N, 08°47'54.43 E	-	12
Chiaromonti	40°42'29.25 N, 08°48'01.34 E	21	-
Ardara I (SS)	40°37'58.22 N, 08°49'32.04 E	16	-
Ardara II (SS)	40°36'43.02 N, 08°48'31.26 E	-	12
Siligo (SS)	40°35'56.26 N, 08°46'47.26 E	0	3
Giave (SS)	40°29'22.58 N, 08°37'45.17 E	17	8
Montresta (OR)	40°23'28.85 N, 08°28'48.36 E	-	18
Bultei (SS)	40°27'36.31 N, 09°06'52.73 E	-	15
Bottidda (SS)	40°22'17.69 N, 09°03'18.04 E	6	2
Illorai (SS)	40°19'11.99 N, 09°01'27.01 E	0	0
Bortigali (NU)	40°16'35.71 N, 08°51'30.37 E	0	0
Oniferi (NU)	40°19'00.64 N, 09°10'35.31 E	18	7
Orani (NU)	40°18'17.75 N, 09°12'26.57 E	10	-
Nuoro I (NU)	40°19'31.00 N, 09°21'29.00 E	5	-
Nuoro II (NU)	40°19'28.00 N, 09°21'33.00 E	8	-
Ovodda (NU)	40°05'51.70 N, 09°10'26.00 E	10	-
Abbasanta (OR)	40°08'12.39 N, 08°47'50.31 E	4	-

I parassitoidi sono stati identificati usando chiavi dicotomiche (Sabrosky e Reardon, 1976; Marsh, 1979; Simons *et al.*, 1979). Per la determinazione di microsporidi, è stato estratto il DNA dalle spore e amplificato mediante PCR usando particolari primers. Le sequenze ottenute sono state comparate con sequenze di isolati di *Nosema* conservati alla NBCI GenBank.

La presenza di funghi filamentosi e batteri è stata determinata impiegando FF microplate e GEN III microplate del Biolog System (Biolog Inc., Hayward, CA, USA).

3.2 Risultati

La mortalità larvale osservata nel biennio di studio è variata da un minimo del 17,5 % registrato nel 2011 nel sito di Oniferi ad un massimo del 100% di Nuoro I nel 2010 (Tab. 3.2). La mortalità è risultata molto alta in tre siti nel 2010 (85% a Bottidda, 92,5% a Abbasanta e 95% a Oniferi) e in uno nel 2011 (Illorai, 92,5%) ma non è stato possibile giungere alla determinazione della causa di morte. Il trasferimento in laboratorio e il passaggio alla dieta artificiale può avere causato alle larve un forte stress: con l'impiego del Biolog, sono stati infatti isolati batteri opportunistici, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus casseliflavus*, in alcune delle larve, che si presume quindi abbiano preso il sopravvento e condotto a morte l'ospite.

3.2.1 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con ANOVA a una via usando il software SPSS (IBM) per determinare differenze nei fattori causa di mortalità tra le larve di *L. dispar* e tra siti di campionamento e anni. I siti sono stati anche raggruppati in quattro macro aree delimitate dai confini provinciali. Non è stata osservata nessuna differenza significativa per quanto riguarda la mortalità tra i siti o quella causata da parassitoidi o da cause sconosciute, ma la mortalità totale dovuta ai patogeni è risultata significativamente differente tra macro aree (ANOVA a una via, $P=0,013$). Inoltre la mortalità totale dovuta ai patogeni è risultata significativamente differente tra i due anni di indagine ($P=0,034$). Non è stata osservata alcuna differenza significativa nella mortalità causata da ciascuna specie di parassitoide nei due anni di studio e nelle aree di raccolta. La mortalità causata da *Nosema* è risultata differente tra aree ($P < 0,01$) mentre quella causata da *LdNPV* è stata significativamente più elevata nel 2010 rispetto al 2011 ($P = 0,021$). Nessuna differenza è stata osservata nella mortalità causata da *Nosema* tra i due anni di indagine ($P = 0,092$).

3.2.2 Mortalità causata da parassitoidi

La mortalità causata da Ditteri e Imenotteri è variata tra lo 0% registrato nei siti di Illorai e Oniferi nel 2010 e l'85% osservato nel sito Nuoro I nel 2010. Alti tassi di parassitizzazione sono stati registrati anche tra gli esemplari raccolti nella lecceta di Nuoro II (75%) e a Giave e Siligo (62,5%). I dati sono presentati in tabella 3.3 e si riferiscono al parassitismo apparente in quanto l'emergenza dei parassitoidi è in parte limitata dalla morte dell'ospite causata da altri patogeni o altri fattori di stress (Herard *et al.*, 1979; Luciano e Prota, 1986). I parassitoidi identificati sono quelli già menzionati precedentemente e che usualmente si rinvencono nelle popolazioni di *L. dispar* in fase di retrogradazione o latenza. *P. silvestris* e *B. pratensis* sono stati i parassitoidi larvali più comunemente rinvenuti in questo studio. L'azione di altri parassitoidi è stata molto meno incisiva, eccezion fatta per *C. melanoscela* che nel sito di Ardara I ha causato una mortalità del 15%. In sei siti in entrambi gli anni è stata osservata anche l'incidenza del superparassitismo. Nel 2010, 25 larve sono state superparassitizzate (pari al 4,16% delle 600 larve raccolte il primo anno), 13 da *B. pratensis*, 11 da *P. silvestris* e 1 da *E. larvarum*. Nel 2011, 5 larve sono state superparassitizzate da *B. pratensis* e 7 da *P. silvestris* (un totale di 2,72% delle 440 larve raccolte nel 2011).

3.2.3 Mortalità causata da patogeni

La mortalità causata da patogeni è variata tra lo 0% di Ardara I e il 40% di Orani nel 2010. Nel 2011, la percentuale di larve uccise dall'azione di patogeni è risultata essere più bassa rispetto all'anno precedente, variando tra lo 0% di tre siti e il 7,5% di Siligo. Tra i patogeni di *L. dispar* sono stati rilevati il fungo *Beauveria bassiana*, il microsporidio *Nosema portugal* e il virus della nucleopoliedrosi di *L. dispar* (*LdNPV*).

Tab. 3.2 - Mortalità percentuale tra le larve di *L. dispar* raccolte nei siti di studio nel 2010 e 2011.

Sito	Anno	Mortalità			Mortalità totale
		Parasitoidi (%)	Patogeni (%)	Sconosciuta (%)	
Calangianus	2010	10,0	27,5	35,0	72,5
Chiaramonti I	2010	27,5	2,5	15,0	45,0
Chiaramonti II	2011	60,0	2,5	20,0	82,5
Chiaramonti III	2011	57,5	0	17,5	75,0
Chiaramonti IV	2010	50,0	2,5	17,5	70,0
Ardara I	2010	32,5	0	22,5	55,0
Ardara II	2011	35,0	2,5	12,5	50,0
Siligo	2010	52,5	10,0	27,5	90,0
	2011	62,5	7,5	5,0	75,0
Giave	2010	7,5	5,0	22,5	35,0
	2011	62,5	2,5	15,0	80,0
Montresta	2011	40,0	0	27,5	67,5
Bultei	2011	12,5	0	37,5	50,0
	2010	10,0	2,5	72,5	85,0
Bottidda	2011	15,0	2,5	12,5	30,0
	2010	0	22,5	37,5	60,0
Illorai	2011	25,0	2,5	65,0	92,5
	2010	30,0	7,5	40,0	77,5
Bortigali	2011	2,5	2,5	25,0	30,0
	2010	0	12,5	82,5	95,0
Oniferi	2011	5,0	2,5	10,0	17,5
Orani	2010	25,0	40,0	30,0	95,0
Nuoro I	2010	85,0	10,0	5,0	100,0
Nuoro II	2010	75,0	5,0	7,5	87,5
Ovodda	2010	32,5	37,5	7,5	77,5
Abbasanta	2010	7,5	5,0	80,0	92,5
Media ± ES		31,63 ± 4,86	8,26 ± 2,18	28,84 ± 4,43	68,75 ± 4,54

Tab. 3.3 - Parassitoidi e percentuale di parassitismo da essi causata tra le larve di *L. dispar* raccolte.

Sito	Anno	Percentuale di larve parassitizzate							Parassitismo totale (%)
		<i>Cotesia melanoscela</i>	<i>Phobocampe uncinata</i>	<i>Parasetigena silvestris</i>	<i>Blepharipa pratensis</i>	<i>Exorista larvarum</i>	<i>P. silvestris</i> e <i>B.pratensis</i>	<i>E.larvarum</i> e <i>B. pratensis</i>	
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Calangianus	2010	5,0	5,0	0	0	0	0	0	10,0
Chiaramonti I	2010	2,5	0	0	25,0	0	0	0	27,5
Chiaramonti II	2011	0	0	2,5	57,5	0	0	0	60,0
Chiaramonti III	2011	0	0	5	50,0	0	2,5	0	57,5
Chiaramonti IV	2010	0	0	2,5	47,5	0	0	0	50,0
Ardara I	2010	15,0	0	0	17,5	0	0	0	32,5
Ardara II	2011	0	0	20,0	12,5	0	2,5	0	35,0
Siligo	2010	0	0	27,5	20,0	0	5	0	52,5
	2011	0	0	42,5	17,5	0	2,5	0	62,5
Giave	2010	2,5	0	0	5,0	0	0	0	7,5
	2011	0	0	12,5	50,0	0	0	0	62,5
Montresta	2011	0	0	7,5	32,5	0	0	0	40,0
Bultei	2011	0	0	0	12,5	0	0	0	12,5
Bottidda	2010	5,0	0	0	2,5	2,5	0	0	10,0
	2011	0	0	12,5	2,5	0	0	0	15,0
Illorai	2010	0	0	0	0	0	0	0	0
	2011	0	0	25,0	0	0	0	0	25,0
Bortigali	2010	0	0	2,5	22,5	0	5	0	30,0
	2011	0	0	0	2,5	0	0	0	2,5
Oniferi	2010	0	0	0	0	0	0	0	0
	2011	0	0	0	5,0	0	0	0	5,0
Orani	2010	0	0	0	20,0	2,5	0	2,5	25,0
Nuoro I	2010	0	0	40,0	22,5	0	22,5	0	85,0
Nuoro II	2010	0	0	25,0	40,0	0	10,0	0	75,0
Ovodda	2010	2,5	0	0	25,0	5,0	0	0	32,5
Abbasanta	2010	2,5	0	2,5	2,5	0	0	0	7,5
Media ± ES		1,34 ± 0,62	0,19 ± 0,19	8,75 ± 2,55	18,94 ± 3,49	0,38 ± 0,22	1,92 ± 0,94	0,09 ± 0,09	31,63 ± 4,86

Tab. 3.4 – Patogeni e percentuale di mortalità da essi causata tra le larve di *L. dispar* raccolte.

Sito	Anno	<i>Ld</i> NPV (%)	<i>Beauveria bassiana</i> (%)	<i>Nosema portugal</i> (%)	Mortalità totale da patogeni (%)
Calangianus	2010	0	0	27,5	27,5
Chiararamonti I	2010	0	0	2,5	2,5
Chiararamonti II	2011	0	2,5	0	2,5
Chiararamonti III	2011	0	0	0	0
Chiararamonti IV	2010	0	2,5	0	2,5
Ardara I	2010	0	0	0	0
Ardara II	2011	0	0	2,5	2,5
Siligo	2010	10,0	0	0	10,0
	2011	0	7,5	0	7,5
Giave	2010	0	2,5	2,5	5,0
	2011	0	2,5	0	2,5
Montresta	2011	0	0	0	0
Bultei	2011	0	0	0	0
Bottidda	2010	0	2,5	0	2,5
	2011	0	2,5	0	2,5
Illorai	2010	2,5	17,5	2,5	22,5
	2011	0	2,5	0	2,5
Bortigali	2010	0	7,5	0	7,5
	2011	0	2,5	0	2,5
Oniferi	2010	5,0	7,5	0	12,5
	2011	0	2,5	0	2,5
Orani	2010	37,5	0	2,5	40,0
Nuoro I	2010	7,5	0	2,5	10,0
Nuoro II	2010	2,5	0	2,5	5,0
Ovodda	2010	32,5	2,5	2,5	37,5
Abbasanta	2010	2,5	2,5	0	5,0
Media ± ES		3,84 ± 1,87	2,59 ± 0,75	1,82 ± 1,05	8,26 ± 2,18

3.3 Descrizione dei patogeni riscontrati

3.3.1 *Beauveria bassiana*

Il fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin è stato il primo microrganismo a essere riconosciuto come l'agente di contagio di una malattia animale. È un efficace entomopatogeno che causa una malattia nota come calcino o malattia del baco da seta. Il suo nome è un omaggio al naturalista italiano Agostino

Bassi che per primo, nel 1835, lo identificò come causa di patologia tra le larve del baco da seta, *Bombyx mori* (L.).



Fig. 3.2 - Larva di *L. dispar* uccisa da *B. bassiana*.

B. bassiana è un entomopatogeno ubiquitario presente nel suolo, anche se è stato osservato come patogeno endofitico e in grado di colonizzare tessuti di piante (Bing e Lewis, 1992). Si ha l'inizio dell'infezione quando i conidi del fungo, globosi e ialini, entrano in contatto con la cuticola dell'insetto e riescono a penetrarla. Su alcune specie di formiche e termiti è stato tuttavia osservato come il fungo possa penetrare anche attraverso l'apparato boccale. Esso cresce all'interno del suo ospite e lo conduce a morte per esaurimento dei nutrienti, disidratazione e produzione di micotossine.

B. bassiana è patogeno anche di *L. dispar* (Fig. 3.2). Lo studio ne ha evidenziato la presenza tra le popolazioni presenti in 8 siti nel 2010 e in 7 nel 2011. Il fungo ha causato una mortalità variabile tra 0 e 7,5%, eccezion fatta per il sito di Illorai dove ha raggiunto il 17,5% (Tab. 3.4) (Contarini *et al.*, 2013).

3.3.2 *Nosema* sp.

Quello dei microsporidi è un Phylum di parassiti ubiquitari, intracellulari e obbligati, comunemente causa di patologie tra insetti e altri invertebrati. Del genere *Nosema* (Fig. 3.3) fanno parte 81 specie patogene di numerosi artropodi, tra cui *Apis mellifera*. Tre specie del genere sono proprie delle popolazioni di *L. dispar* in Europa: *N. lymantriae*, *N. serbica* e *N. portugal*. Sebbene siano solitamente indicati come parassiti cronici più che virulenti, in letteratura si riferisce la loro importanza come patogeni primari di *L. dispar*, implicati nei collassi delle popolazioni del defogliatore specialmente nell'Europa orientale (Solter *et al.*, 2010).

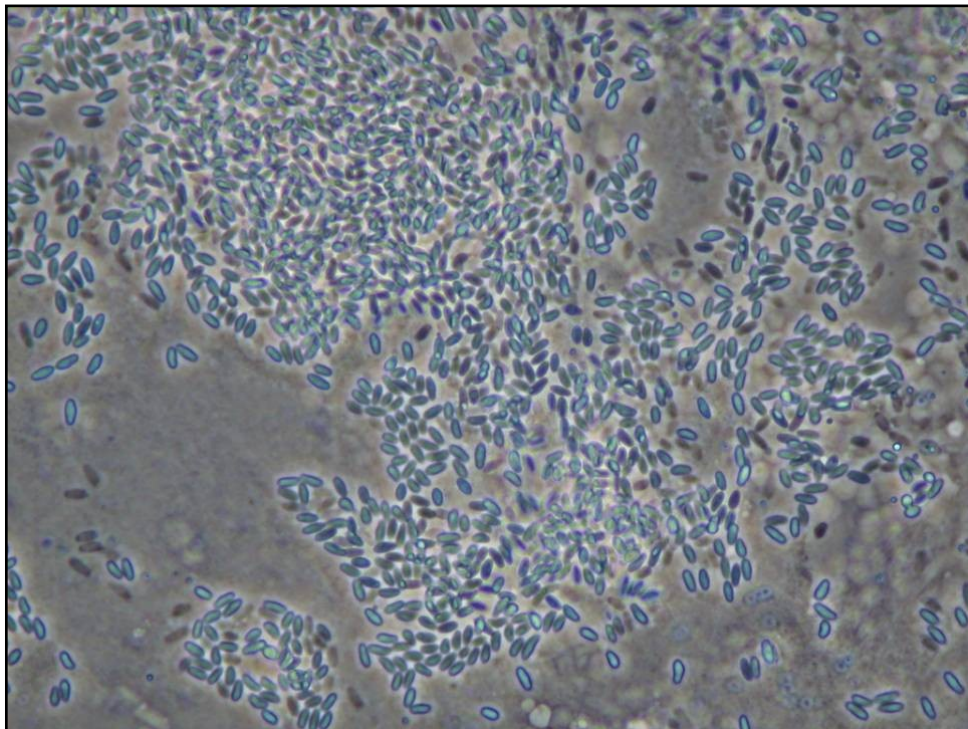


Fig. 3.3 - Spore di *Nosema*

In Sardegna pochi studi sono stati condotti in passato sull'azione di microsporidi nelle popolazioni di *L. dispar*. Negli anni '70 Purrini e Skatulla hanno monitorato le popolazioni del defogliatore nelle sugherete di Orune (NU) e i tassi di mortalità causati da *N. lymantriae* (in alcune circostanze superiori al 60%). Nello stesso periodo veniva evidenziata la presenza di un microsporidio nella stessa area (Luciano *et al.*, 1982). Le indagini di cui si riferisce nella presente tesi hanno

rivelato la presenza del microsporidio in numerosi siti della parte centro-settentrionale dell'Isola, con livelli sempre bassi d'incidenza eccezion fatta per un sito della Gallura, dove nel 2010 il microsporidio ha causato un tasso di mortalità del 27,5% (Tab. 3.4).

3.3.3 *LdNPV*

Il virus della nucleopoliedrosi di *L. dispar* appartiene al gruppo dei Baculovirus ed è conosciuto fin dai primi anni del '900 (Glaser e Chapman, 1913) per essere un patogeno altamente specifico per il defogliatore. In condizioni di naturalità e in presenza di alte densità di popolazione del defogliatore, il virus può causare fenomeni epizootici e ragguardevoli tassi di mortalità. Le larve infettate dal virus appaiono di consistenza molle e sovente rimangono attaccate al substrato, ad una foglia o ad un rametto, penzolando in modo caratteristico (Fig. 3.4).



Fig 3.4 - Larva di *L. dispar* uccisa da *LdNPV* (da www.forestryimages.org)

I corpi inclusi, rilasciati dai cadaveri sulle foglie, vengono quindi ingeriti da altre larve e si dissolvono nell'intestino rilasciando particelle virali a bastoncino o virioni. I virioni, una volta nell'emocele, infettano altri tessuti e organi causando un'infezione generale che procede tanto più velocemente quanto più è rapida la moltiplicazione del virus all'interno delle larve. Il virus può persistere nel suolo,

sulla corteccia delle piante o sulla lettiera per almeno un anno dopo un'epizoozia, perciò può infettare nuove larve l'anno seguente, sebbene generalmente l'infezione segue modelli dipendenti dall'abbondanza dell'ospite. La trasmissione del virus può essere garantita anche da parassitoidi della *L. dispar* o può anche verificarsi quando le femmine del defogliatore depongono le uova su corteccia o altri substrati contaminati dal virus (Doane 1975; Podgwaite *et al.*, 1979; Strazanac e Butler, 2005).

Lo studio condotto in Sardegna ha confermato la capacità del virus di infettare con efficacia larve di *L. dispar* in particolar modo quando il defogliatore è in fase di culmine o retrogradazione, avendo raggiunto in due aree di studio nel 2010, un tasso di mortalità superiore al 37% (Contarini *et al.*, 2013). Nel secondo anno di indagine, nessuna larva raccolta è stata uccisa dal virus.

3.4 Sintesi dei risultati ottenuti

I ditteri tachinidi *P. silvestris* e *B. pratensis* sono stati i parassitoidi più comunemente evolventi a carico delle larve di *L. dispar* nei siti di indagine, confermando quanto in parte già noto (Luciano e Prota, 1981). Anche la mortalità causata da *C. melanoscela*, conferma la limitata efficacia del Braconidae, circoscritta alla fase di retrogradazione del defogliatore.

I dati relativi al superparassitismo invece sembrano essere inferiori a quelli osservati in precedenti studi. L'azione dei parassitoidi potrebbe essere stata sottostimata a causa della mortalità indotta da patogeni e da altre cause che in 9 siti ha raggiunto il 50%. Dove invece il superparassitismo è stato più alto (Nuoro I e II, 12,5%) ha coinciso con un basso tasso di mortalità da patogeni (circa il 15%).

I più alti tassi di mortalità indotta da patogeni sono stati registrati nelle aree in cui il fillofago si trovava in fase di retrogradazione.

La sequenza SSU rDNA del microsporidio rinvenuto è risultata identica a quella di *N. portugal*. Questa specie, osservata per la prima volta su esemplari di *L. dispar* in Portogallo è strettamente relazionata a *N. lymantriae*, di cui dovrebbe essere una variazione genetica (L. Solter, comunicazione personale) (Contarini *et al.*, 2013).

Nessuna delle 1040 larve prelevate dal campo e allevate in laboratorio è stata infettata da *E. maimaiga*. Il complesso di nemici naturali di *L. dispar* in Sardegna ha mostrato di avere un impatto significativo quando la densità di popolazione del defogliatore è in fase di culmine e retrogradazione, ma la sua efficacia è ridotta negli anni di latenza e progradazione.

Dai risultati ottenuti non sembra che i trattamenti con *Btk* eseguiti fra il 2001 e il 2010 su oltre 100.000 ettari di sugherete, all'interno delle quali ricadono tutti i siti dove sono state raccolte le larve per questo studio, abbiano avuto ripercussioni sul complesso dei parassitoidi evolventi su *L. dispar*. Non si può tuttavia escludere in termini assoluti che l'impiego del batterio, data la sua scarsa selettività, possa nel lungo periodo determinare una progressiva riduzione di abbondanza nelle specie di lepidotteri "non bersaglio" e convittime degli stessi parassitoidi di *L. dispar*, causando quindi anche un crescente rischio di riduzione delle popolazioni di questi ultimi, proprio per la polifagia e il polivoltinismo che li caratterizza.

Con tale consapevolezza si sono quindi avviate le pratiche per la sperimentazione in laboratorio dell'efficacia di *E. maimaiga* nella prospettiva di un suo impiego in pieno campo per ampliare lo spettro di nemici naturali di *L. dispar* in Sardegna.

4 Note descrittive di biologia e diffusione di *Entomophaga maimaiga*

4.1 Descrizione e biologia di *E. maimaiga*

Il nome specifico “*maimaiga*” corrisponde alla parola giapponese per indicare la *L. dispar*. *E. maimaiga* (Entomophthorales Entomophthoraceae) è un entomopatogeno, per la prima volta descritto nel 1984 come ceppo fungino rinvenuto su esemplari di *L. dispar japonensis*, provenienti dall'isola giapponese di Honshu (Soper *et al.*, 1988). *E. maimaiga* è responsabile nel suo areale d'origine ma anche nelle zone dove è stato introdotto con successo, di estesi fenomeni epizootici tra le larve di *L. dispar*, con tassi di mortalità che raggiungono il 99% (Fig. 4.1). In letteratura si segnalano altri funghi appartenenti all'ordine Entomophthorales che hanno infettato larve di *L. dispar* in Corea del Sud e nel nord della Cina, mentre un'epizoozia è stata segnalata in Kashmir nella popolazione di *Lymantria obfusca*, specie strettamente legata a *L. dispar* (Hajek, 1999).



Fig. 4.1 - Mortalità larvale causata da *E. maimaiga*.

In Europa si segnalano rinvenimenti di larve di *L. dispar* infettate da funghi appartenenti all'ordine Entomophthorales nel nord-est della Polonia e in Jugoslavia (Injac e Vasiljevic *et al.*, 1978; Hajek, 1999) ma a causa del quantitativo limitato di materiale disponibile non è stato possibile comparare il DNA dei campioni europei con quello dei ceppi di *E. maimaiga* presenti in Giappone e in Nord America (Hajek, 1999).

Il fungo produce conidi (Fig. 4.2), esternamente al cadavere, e azigospore (Fig. 4.3) all'interno della larva. I conidi sono ialini, a forma di pera e di dimensioni medie di 20,6 per 26,6 μm . Presentano pareti sottili ed ognuno di essi contiene da 21 a 34 nuclei.

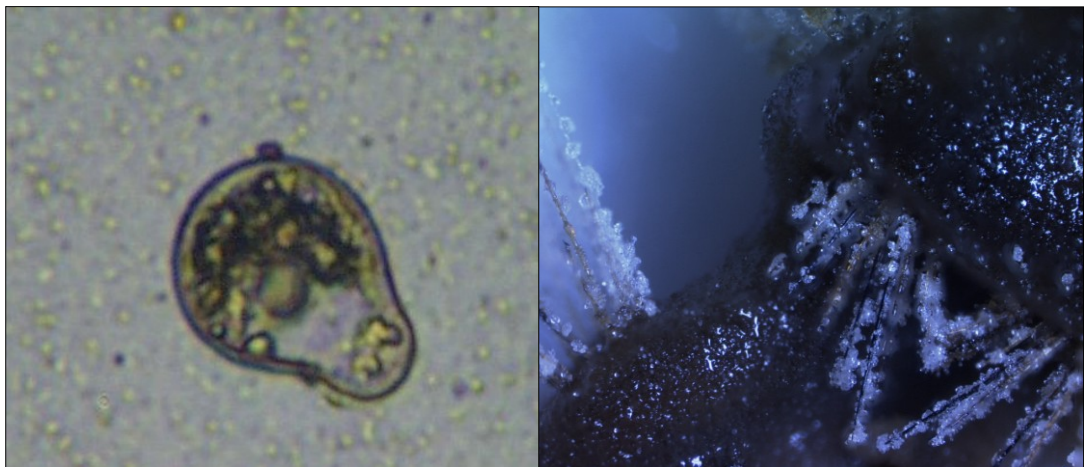


Fig. 4.2 - Conidio e ammassi conidici di *E. maimaiga* su larva di *L. dispar*.

Una volta prodotti e liberati, se incontrano condizioni ambientali favorevoli, possono germinare prontamente e quindi infettare larve nello stesso anno (Hajek, 1999).

Le azigospore hanno forma tondeggiante con un diametro medio di 32,1 μm . Sono multinucleate e presentano una doppia parete esterna di 2 μm che le isola dall'ambiente, consentendo al fungo di superare inverni estremamente rigidi, e che fa sì che possano germinare soltanto nella primavera successiva.

Non sono ancora state ben identificate le esatte esigenze per l'interruzione della dormienza e l'attivazione delle azigospore; le spore sono state in grado di germinare dopo 9 mesi circa dalla produzione, anticipando di 1 o 2 settimane l'inizio della

schiusura delle uova di *L. dispar*. Il tasso di germinazione è stato massimo con 14:10 ore di luce/buio, coincidente con il fotoperiodo primaverile (Hajek, 1999).

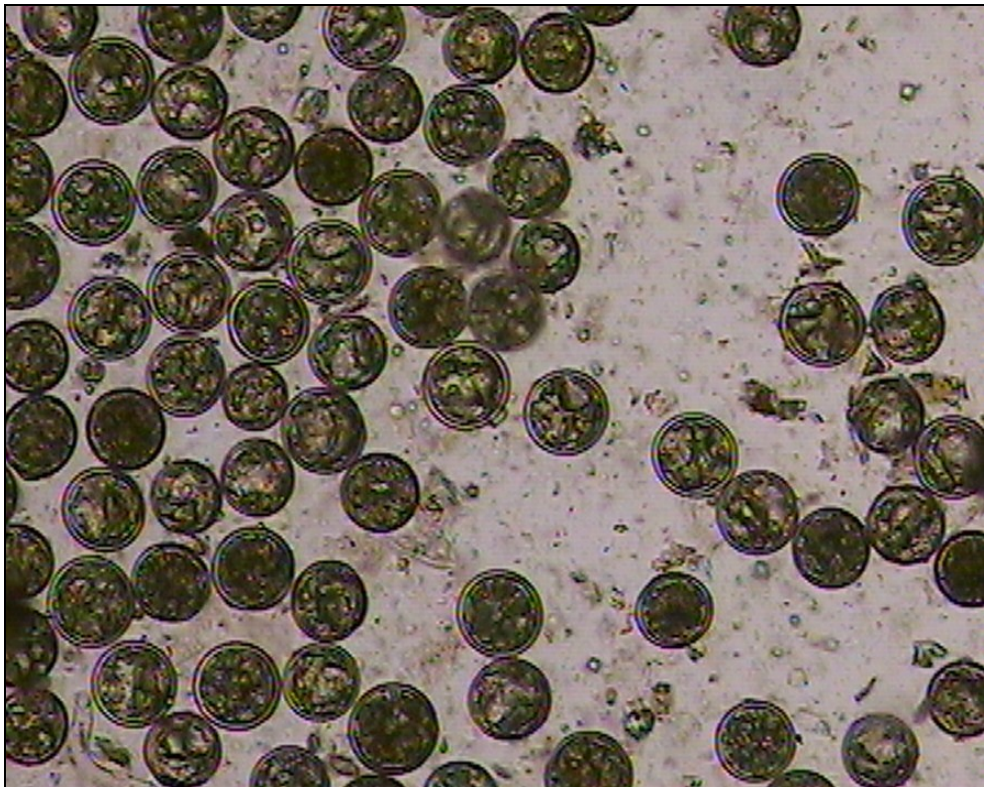


Fig. 4.3 - Azigospore di *E. maimaiga*.

Durante il breve periodo che intercorre tra l'inizio dei processi di pregerminazione delle spore e l'attivazione di queste ultime, il citoplasma diventa granulare, le gocce di lipidi si rompono e si forma un unico grande nucleo. Questo nucleo è probabilmente frutto della fusione dei due nuclei presenti durante la dormienza. È presumibile che il cambio da binucleata a uninucleata durante l'attivazione sia dovuto alla cariogamia e che siano meiotiche le immediatamente successive divisioni (McCabe *et al.*, 1984). Pertanto, nonostante non siano formate dalla coniugazione di due ife indipendenti, queste azigospore possono essere considerate spore sessuali in virtù della congiunzione dei nuclei (Hajek, 1999).

La crescita vegetativa di *E. maimaiga* è aploide (Hajek *et al.*, 1990). Il fungo produce azigospore da corpi ifali multinucleati che si raggruppano; si tratta di azigospore e non zigospore in quanto al momento della loro formazione non

avviene alcuna coniugazione ifale (Hajek, 1999). Le spore del fungo rimangono sulla corteccia della pianta o nel terreno, nelle immediate vicinanze di questa, restando inattive dalla metà di luglio fino alla metà di marzo (Weseloh e Andreadis, 1992) o aprile (Hajek e Humber, 1997) dell'anno seguente. Tale tempistica crea una marcata sincronia tra l'attività di *E. maimaiga* e quella del suo ospite d'elezione, la larva di *L. dispar*, che è, come detto, presente in campo solo in primavera (Hajek e Eastburn, 2001). Le spore tuttavia possono rimanere dormienti per anni, fino a quando non si ripresentano le condizioni ambientali adeguate alla loro germinazione. Un recentissimo studio (Reilly *et al.*, 2014) condotto nelle foreste della Pennsylvania (USA) ha messo in relazione i tassi di infezione causati da *E. maimaiga* con le esigenze del fungo in termini di precipitazione, umidità del suolo, umidità e temperatura misurate in tre anni di campionamenti. I risultati hanno evidenziato una forte correlazione positiva tra le variabili legate all'umidità (precipitazioni, umidità relativa e quella del suolo) e la probabilità d'infezione causata dal fungo. Allo stesso tempo una correlazione significativamente negativa è stata osservata tra la temperatura e la mortalità causata dal fungo.

Dal momento che le dinamiche patogeno-ospite appaiono essere del tutto indipendenti dalla densità di quest'ultimo (Liebhold *et al.*, 2013), la chiave per comprendere i motivi per i quali la dinamica di *L. dispar* differisca nel tempo e da area ad area, risiede nella variabilità d'incidenza dei fattori ambientali.

La germinazione delle zigospore produce dapprima un conidio, espulso dalla parte distale di un tubo di germinazione. È stato dimostrato che alla temperatura di 20 °C, da larve di quarta età alimentate su foglie di quercia si abbia la produzione media di $2,1 \times 10^5$ conidi. L'umidità sembra avere un ruolo fondamentale in molti dei passaggi del ciclo vitale di *E. maimaiga*. La liberazione dei conidi decresce in modo correlato alla diminuzione di umidità relativa, per arrestarsi totalmente al di sotto del 70%. Questo può almeno in parte spiegare il motivo per cui la maggior parte dei conidi venga liberata tra le ore 20 e le ore 8, quando cioè l'umidità dell'aria è massima. I conidi così prodotti sono morfologicamente indistinguibili dai conidi prodotti dai cadaveri dell'ospite. I conidi prodotti vengono quindi trasportati dal

vento andando a depositarsi su un ospite da infettare. Appena prodotti essi sono infatti pronti a germinare, anche se devono essere presenti adeguate condizioni di umidità. Inoltre è stato dimostrato come i tempi medi di germinabilità dei conidi (a 20 °C e un'umidità del 100%) aumenti passando dal buio alla luce (Hajek, 1999).

I funghi entomopatogeni utilizzano generalmente la penetrazione cuticolare come metodo d'infezione. Anche i conidi di *E. maimaiga*, che aderiscono dapprima alla cuticola dell'ospite mediante il loro rivestimento esterno costituito da muco, grazie alla combinazione di pressione meccanica e di degradazione enzimatica riescono a penetrare nella larva di *L. dispar*. Tuttavia il complesso enzimatico responsabile dell'ingresso del patogeno non è stato ancora del tutto studiato. Alcune indagini hanno mostrato come il tempo medio che intercorre tra l'inoculazione del patogeno all'interno della larva di *L. dispar* e l'infezione è di 8,7 ore a una temperatura di 25 °C (Hajek *et al.*, 1993). Il fungo cresce nell'emocele larvale come protoplasto (Fig. 4.4), almeno fino a poco tempo prima della morte dell'ospite, quando le pareti cellulari si formano e vengono prodotti i corpi ifali. Col procedere dell'infezione il numero di cellule fungine all'interno della larva cresce giornalmente, causando nell'ospite una diminuzione del ritmo di nutrizione nei due giorni prima della sua morte (Hajek, 1999).

Studi condotti su alcune specie di entomopatogeni appartenenti allo stesso genere di *E. maimaiga* hanno suggerito che la causa di morte indotta dal fungo possa essere un esaurimento di sostanze nutritive (Funk *et al.*, 1993) o la lisi cellulare (Milne *et al.*, 1994).

Il periodo di attività di *E. maimaiga* in campo è strettamente confinato ai due mesi primaverili durante i quali anche le larve di *L. dispar* sono presenti. Il fungo infetta generalmente solo larve; se l'infezione colpisce larve delle ultime età la morte può verificarsi quando l'insetto è allo stadio di pupa e la fuoriuscita del fungo, in tal caso, avviene attraverso le membrane intersegmentali (Hajek, 1999).

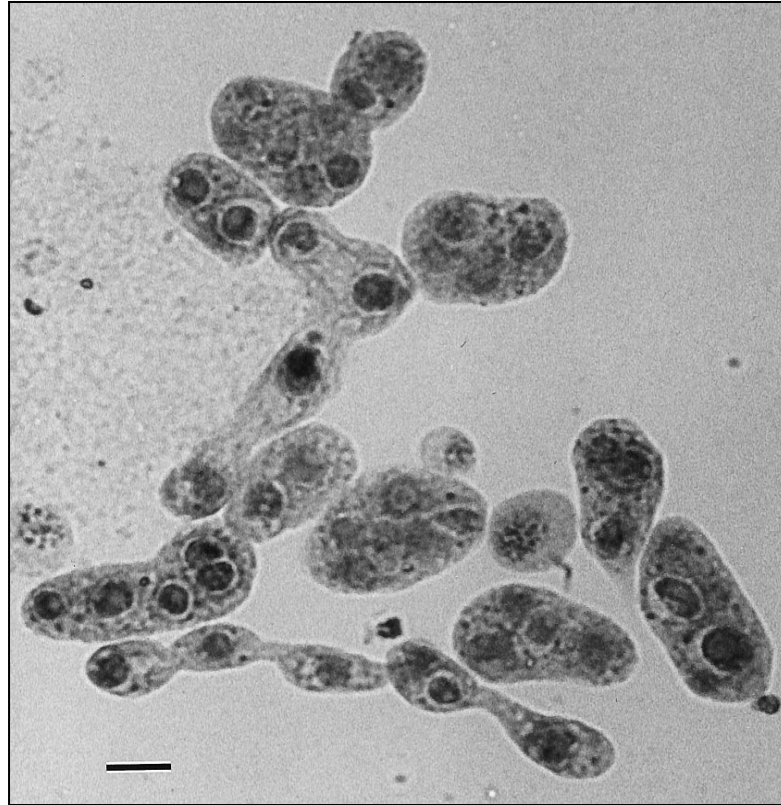


Fig. 4.4 - Protoplasti di *E. maimaiga* all'interno di una larva di *L. dispar*. La barra nera corrisponde a 20 μm (da Hajek, 1999).

Il tempo necessario al fungo per condurre a morte il proprio ospite varia con la dose, l'isolato, la temperatura e l'età della larva al momento dell'infezione: generalmente la morte avviene nel giro di pochi giorni dall'esposizione al patogeno. Biosaggi hanno evidenziato come a una temperatura di 20 °C le larve di IV età siano le più suscettibili (Shimazu e Soper, 1986).

Al momento della morte dell'ospite i conidi non possono essere liberati immediatamente e le azigospore non sono ancora mature: solo dopo 14 ore circa infatti i conidiofori fuoriescono dalla cuticola e sono pronti a liberare i conidi. Il processo di formazione delle spore è ancora più lento in quanto solo il 60% delle potenziali spore si sviluppa in azigospore mature nei 5 giorni successivi alla morte dell'ospite (Hajek e Humber, 1997).

E. maimaiga è in grado di causare epizootie, intese come diffusione di una malattia infettiva in un territorio più o meno vasto. Ma affinché questo si verifichi, nel caso del binomio *E. maimaiga-L. dispar* devono agire di concerto il patogeno, l'ospite e

le condizioni ambientali. In numerosi casi di associazione insetto-patogeno è stato notato che la densità dell'ospite sia una condizione fondamentale per lo sviluppo delle epizoozie (Price, 1997). Tuttavia, alti livelli di infezione causati da *E. maimaiga* sono stati osservati sia in popolazioni del defogliatore in fase di culmine (15.000 ovature per ettaro) (Hajek, 1997) che in fase di latenza (<50 ovature per ettaro) (Hajek *et al.*, 1996). L'assenza di correlazione tra densità dell'ospite e infezione sembra si possa spiegare solo nel caso in cui il patogeno sia ubiquitario e se si verificano condizioni ambientali favorevoli.

4.2 Introduzione negli Stati Uniti

I tentativi di introduzione di *E. maimaiga* negli USA sono stati molteplici e tutti avevano l'obiettivo di arrestare l'espansione di *L. dispar* in Nord America. Il primo tentativo è stato condotto nel biennio 1910-1911: larve uccise dal fungo sono state raccolte e utilizzate per infettare altre larve del defogliatore poi rilasciate in alcuni siti nelle vicinanze di Boston. Negli anni successivi nessuna larva infettata è stata osservata e per questo si è ritenuto che il tentativo fosse fallito. Nel 1984, in conseguenza degli eccezionali danni causati nei primi anni '80 dal defogliatore in tutta l'area degli Stati Uniti orientali, nuovi studi sono stati condotti e hanno consentito di isolare per la prima volta il fungo su terreno artificiale (Sabouraud maltose agar e tuorlo d'uovo, EYSMA), potendo quindi descrivere alcune caratteristiche della specie (Soper *et al.*, 1988). Nel biennio 1985-1986, una nuova campagna di introduzione di *E. maimaiga* è stata condotta nell'Allegany State Park, New York e nel Shenandoah National Park, Virginia, questa volta liberando in campo larve cui era stato microiniettato un quantitativo di protoplasti del fungo. I bassi tassi di mortalità osservati negli anni successivi hanno indotto a pensare che anche questo tentativo fosse fallito. Tuttavia nel giugno del 1989 *E. maimaiga* ha causato alti tassi di mortalità in una popolazione di *L. dispar* del Connecticut; ulteriori indagini condotte lo stesso anno hanno evidenziato come il fungo si fosse diffuso in 7 stati degli Stati Uniti orientali e successivi rilievi hanno dimostrato

come la sua espansione sia proseguita anche negli anni seguenti. Nel 1990 infatti l'area si era già estesa a 10 stati americani e all'Ontario (Canada) (Fig. 4.5).



Fig. 4.5 - Carta degli Stati Uniti con evidenziata l'area di espansione progressiva di *E. maimaiga* nel quadriennio 1989/1992.

Rimangono ancora numerosi dubbi su quale sia la fonte di questo ceppo americano di *E. maimaiga* così virulento e con una grande capacità di espansione. Anche la vastissima area delle epizoozie del 1989 è risultata isolata dai siti dove il fungo era stato introdotto nel 1985-1986, lasciando così supporre che non ci sia relazione tra i due fatti. Attualmente l'ipotesi più accreditata è che il fungo sia stato introdotto accidentalmente negli Stati Uniti dal Giappone (Nielsen *et al.*, 2005).

4.3 Introduzione in Bulgaria

Nel 1996, i positivi risultati ottenuti negli Stati Uniti grazie all'azione di *E. maimaiga* nel controllo di *L. dispar*, hanno spinto il gruppo di ricerca guidato dalla professoressa Daniela Pilarska dell'Accademia bulgara delle Scienze a iniziare un programma d'introduzione del fungo anche in Bulgaria. La regione balcanica infatti, per la grande abbondanza di boschi di *Quercus* spp. e per la presenza di un clima favorevole allo sviluppo e alla sopravvivenza del defogliatore è da sempre stata suscettibile di pullulazione dell'insetto. Durante gli anni di culmine, nell'area

compresa tra Ungheria, Serbia, Bulgaria e Romania le defogliazioni periodiche interessano un'area compresa tra i 200.000 e i 600.000 ettari annui (Georgiev *et al.*, 2011). In passato, per il controllo delle popolazioni del defogliatore è stato fatto largo uso di un ampio spettro di insetticidi chimici, quali Dimilin e Mimic oltre al bioinsetticida *Btk*. L'uso di questi prodotti, in particolare quelli chimici, è controverso in quanto non sono specifici e possono colpire anche altre specie non target nonché organismi acquatici e inoltre possono avere un impatto negativo sulla biodiversità degli ecosistemi forestali (Miller, 1990).

La prima introduzione del 1996 non ha tuttavia dato esiti confortanti ma il programma non è stato interrotto e il fungo, importato dagli Stati Uniti, è stato introdotto in sei ulteriori occasioni differenti, tra il 1999 e il 2009. Nei primi anni dopo l'introduzione del 1999 i tassi di mortalità larvale causata da *E. maimaiga* sono stati compresi tra il 6 e il 16% circa. Tuttavia nel 2005 un esteso fenomeno epizootico causato da un patogeno fungino con elevatissimi tassi di mortalità larvale si è verificato in 4 foreste bulgare distanti 30-70 km dai siti dove era stata tentata l'introduzione del patogeno nel 2000 e 2001 (Georgiev *et al.*, 2007; Pilarska *et al.*, 2007).

I dati mostrano come prima dell'introduzione di *E. maimaiga* in Bulgaria la defogliazione causata da *L. dispar* interessasse ogni anno una superficie compresa tra 150.000 e 370.000 ettari. Dopo l'introduzione del fungo, non è stato registrato nessun attacco del lepidottero su larga scala e l'infestazione annuale non ha mai superato i 25.000 ettari (Fig. 4.6). Ciò ha anche portato ad un limitato impiego di insetticidi microbiologici e chimici che ora è praticato solo su alcune ridotte aree (Mirchev *et al.*, 2013). Recenti ricerche hanno evidenziato che il fungo ha oltrepassato i confini bulgari e invaso gli stati limitrofi. È stato infatti rinvenuto tra le popolazioni di *L. dispar* di Georgia, Turchia, Grecia, Serbia e Macedonia. Quest'area si è ulteriormente estesa nell'ultimo anno dato che la presenza del fungo è stata osservata anche in Ungheria e in Slovacchia (Zubrik *et al.*, 2014; Csoka *et al.*, 2014).

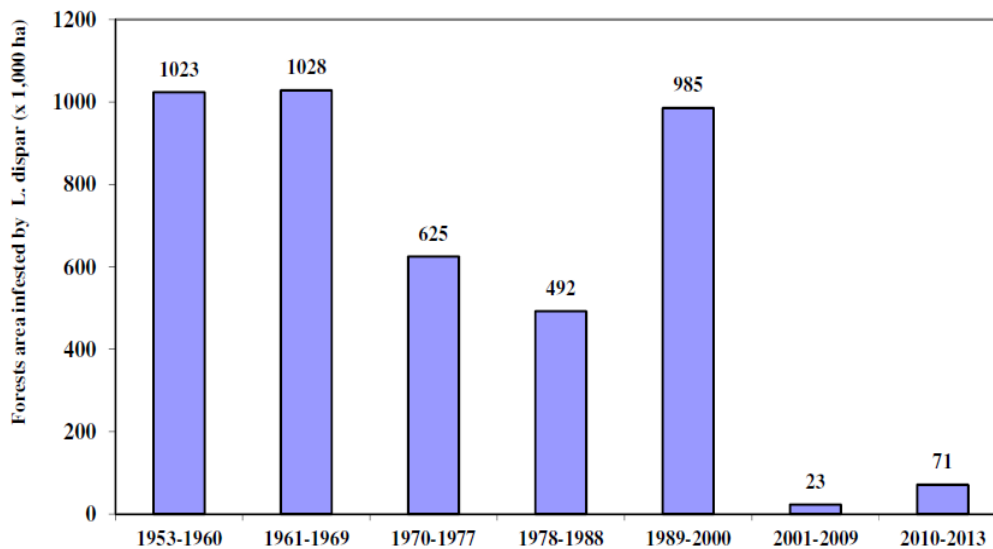


Fig. 4.6 - Boschi defogliati in Bulgaria nel periodo 1953-2013 (da Mirchev et al., 2013).

Le caratteristiche di *E. maimaiga* e cioè la sua capacità di diffondersi nell'ambiente, la sua elevata efficacia e specificità per *L. dispar* inducono a ritenere che il fungo abbia invaso un'area ancora più grande, comprendente l'intera penisola balcanica e l'Europa sud orientale.

4.4 Specificità e tecniche di impiego come agente di controllo biologico

Accertata la capacità del fungo di causare alti tassi di mortalità tra le popolazioni di *L. dispar*, numerosi studi sono stati condotti per verificare la specificità del fungo per il lepidottero, con la speranza di poter impiegare il patogeno come agente di controllo delle popolazioni di *L. dispar*. *E. maimaiga* è da sempre stato segnalato esclusivamente su larve di *L. dispar*. La specificità è stata dapprima testata su 20 differenti specie appartenenti agli Ordini Coleoptera, Orthoptera, Hymenoptera e su esemplari di *Apis mellifera* L., immergendone le larve in soluzioni di 10^5 conidi/ml sufficienti a causarne l'infezione (Soper et al., 1988; Vanderberg, 1990). Nessun esemplare è stato infettato, accreditando quindi l'ipotesi che il fungo sia specifico esclusivamente per specie di lepidotteri (Hajek, 1999).

Ulteriori analisi si sono concentrate su 78 specie di 10 superfamiglie di Lepidotteri i cui esemplari sono stati raccolti in campo da aree degli Stati Uniti in cui *E. maimaiga* non si era ancora diffuso, allevati in laboratorio fino allo stadio di larva e poi testati seguendo la metodologia descritta. Il 35,6% delle specie testate, di 7 superfamiglie su 10, ha mostrato segni della riproduzione fungina. Tuttavia i livelli di infezione sono stati inferiori al 50% per tutte le superfamiglie eccetto Bombycoidea, Sphingoidea e Noctuoidea. In quest'ultima, solo la famiglia dei Limantridi, ora Erebidi, ha mostrato alti tassi di infezione, mentre nelle altre due superfamiglie solo una specie di Lasiocampide (Bombycoidea), *Malacosoma disstria* Hübner, e una specie della superfamiglia Sphingoidea, *Manduca sexta* L., hanno mostrato livelli di infezione superiori al 50% (Hajek *et al.*, 1995; Hajek, 1999). Lo studio ha anche evidenziato che gli alti livelli d'infezione erano sempre altamente correlati con l'abbondanza di peli e setole sulle larve.

Altri studi condotti in campo durante epizoozie causate da *E. maimaiga* nelle popolazioni di *L. dispar* hanno mostrato come solitamente i cadaveri delle larve delle ultime età del defogliatore si accumulano nella parte bassa del tronchi mentre è risultato molto raro vedere morto qualche esemplare di altre specie (Hajek, 1999). Di 1511 larve appartenenti a 52 specie di 7 famiglie di lepidotteri, raccolte in campo durante un'epizoozia in Virginia (USA) e allevate in laboratorio, solo 2 individui, uno di 96 esemplari di *Catocala ilia* Cramer (Noctuidae) e uno di 318 esemplari di *M. disstria* (Lasiocampidae), sono stati infettati e uccisi dal fungo. È proprio basandosi su questi studi di campo, condotti a più riprese negli Stati Uniti, che si può asserire che *E. maimaiga* è altamente specifico per la *L. dispar* (Hajek, 1999).

Il suo possibile impiego come agente di controllo biologico di *L. dispar* sta riscuotendo sempre maggiore attenzione anche alla luce degli ingenti costi economici dovuti all'impiego su larga scala di prodotti insetticidi. Il fungo tuttavia, mostra una notevole difficoltà di crescita su terreni di coltura artificiali e anche una tendenza alla diminuzione della virulenza quando le colture si ripetono su terreni artificiali (Hajek *et al.*, 1990), causando quindi problematiche nella realizzazione di produzioni di massa. *E. maimaiga*, così come la gran parte di funghi appartenenti

all'ordine Entomophthorales, viene introdotto o comunque rilasciato nell'ambiente generalmente allo stadio di spora in quanto i conidi non sono molto resistenti e hanno un'esistenza breve. Proprio per la resistenza delle loro spore, sono stati avviati vari programmi di impiego di funghi dell'ordine Entomophthorales come agenti di controllo di insetti dannosi, con risultati anche soddisfacenti. È il caso per esempio delle azigospore del fungo *Entomophthora sphaerosperma* Fres. liberate con successo nei frutteti della Nuova Scozia, per il controllo *Psylla mali* Schmdb. (Dustan, 1927), ma del tutto inefficaci in Alabama in contrasto al lepidottero defogliatore *M. disstria* (Abrahamson e Harper, 1973).

Nel caso di *E. maimaiga* possono essere seguiti tre metodi differenti di introduzione del patogeno in nuovi ambienti. Il primo metodo, consiste nel microiniettare protoplasti del fungo all'interno di larve di *L. dispar*, le quali poi liberate nell'ambiente svilupperanno i conidi che andranno a infettare altre larve. È questa la metodologia seguita nel 1984 per introdurre negli Usa il patogeno e che tuttavia non ha avuto risultati apprezzabili probabilmente a causa delle condizioni ambientali che si sono verificate in quegli anni più che per l'inefficacia del metodo seguito, anche se esso è sicuramente molto complicato e richiede un imponente lavoro di laboratorio.

Il secondo metodo prevede la raccolta della terra, sulla quale sono caduti cadaveri di larve uccise dal fungo; quindi terra e spore, contenute nei cadaveri, vengono trasferite in aree dove il fungo non è presente, posizionandole alla base delle piante e inumidendole settimanalmente con un litro d'acqua per favorirne la germinazione nelle settimane precedenti la schiusura delle uova di *L. dispar* (Hajek *et al.*, 1996). Questo metodo appare essere il più rapido e il meno complicato, sebbene possa talvolta essere difficile la valutazione della reale presenza delle azigospore e della loro concentrazione nel suolo.

Infine con il terzo metodo l'introduzione viene effettuata impiegando larve di *L. dispar* uccise dal fungo raccolte direttamente sui tronchi, ai quali generalmente esse rimangono attaccate per un periodo di qualche settimana. Quest'ultimo metodo è quello che è stato seguito nell'aprile del 1999 per introdurre *E. maimaiga* in

Bulgaria. A tal fine, cadaveri di *L. dispar* provenienti dagli Stati Uniti e contenenti spore del fungo, dopo essere stati sbriciolati sono stati posti entro 10 cm di distanza da 5 piante dominanti per sito di rilascio. L'area in prossimità delle piante prescelte è stata ripulita da pietre e foglie prima del posizionamento dei cadaveri del defogliatore e successivamente cosparsa con 4 litri d'acqua, per favorire la germinazione del fungo. La stessa area è stata inumidita settimanalmente fino a quando le larve di *L. dispar* hanno raggiunto la quarta età (Pilarska *et al.*, 2000). Come precedentemente ricordato, dall'introduzione in Bulgaria *E. maimaiga* ha esteso enormemente il proprio areale, andando a incrementare il complesso di nemici naturali di *L. dispar* in numerosi paesi dell'Europa balcanica e mediterranea.

5 Indagini di laboratorio condotte in Sardegna

5.1 Autorizzazione all'introduzione di *E. maimaiga* in Sardegna

Una volta verificata l'assenza di *E. maimaiga* dal territorio sardo è stata presentata una richiesta, presso il Ministero delle Politiche agricole alimentari e forestali, di autorizzazione all'introduzione del patogeno presso le strutture della sede di Nuoro del Dipartimento di Agraria dell'Università di Sassari, al fine di sperimentarne l'azione e l'efficacia in ambiente controllato. La richiesta è stata accolta nell'aprile del 2012 ed è stata seguita dall'introduzione dalla Bulgaria di un quantitativo di cadaveri di *L. dispar* contenenti spore di *E. maimaiga*, inviati dalla professoressa Daniela Pilarska (Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Sofia, Bulgaria) con la quale è stato anche sottoscritto un Memorandum of Understanding.

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 Allevamento delle larve e biosaggi

L'efficacia di *E. maimaiga* è stata valutata su larve di *L. dispar* di III-IV età per tre anni consecutivi (2012-2014) in laboratorio. Le larve di *L. dispar* impiegate nei biosaggi sono state ottenute da ovature prelevate in inverno da sugherete di Montresta (nel 2012) e Chiaramonti (nel 2013 e 2014). Nel 2014 inoltre, sono state testate anche larve di *L. dispar* provenienti da varie parti d'Italia. A tal fine, oltre alle ovature provenienti dal Sassarese, ne sono state impiegate altre raccolte in leccete di Gioiosa Jonica (Reggio Calabria), in boschi di roverella di Bronte (Catania), in boschi misti in cui domina il cerro a Fucecchio (Firenze) e in querceti misti a Legnaro (Padova) (Fig. 5.1).

Le uova sono state tenute dalla raccolta al momento del loro impiego in frigo a 4 °C; nel mese di aprile sono state ripulite dai peli e sterilizzate in superficie con formalina al 10% in agitazione per 45 minuti nel 2012 e 2013, mentre nel 2014 le uova sono state sterilizzate ponendole per 5 minuti in agitazione in una soluzione di ipoclorito di sodio al 2% e Tween 80 all'1%. In entrambi i casi le uova sono state risciacquate per 3 volte con acqua sterile e successivamente mantenute in condizioni ambientali controllate (22 °C e rapporto 16:8 di ore luce/buio) in attesa della

schiusura. Anche le larve nate sono state allevate alle stesse condizioni termiche e di fotoperiodo e alimentate su dieta artificiale sterile (Fig. 5.2) (Southlands Products, Inc) (Bell *et al.*, 1981; Solari *et al.*, 2002), fino al raggiungimento della III-IV età.



Fig 5.1 - Località di provenienza delle ovature di *L. dispar* nel 2014.

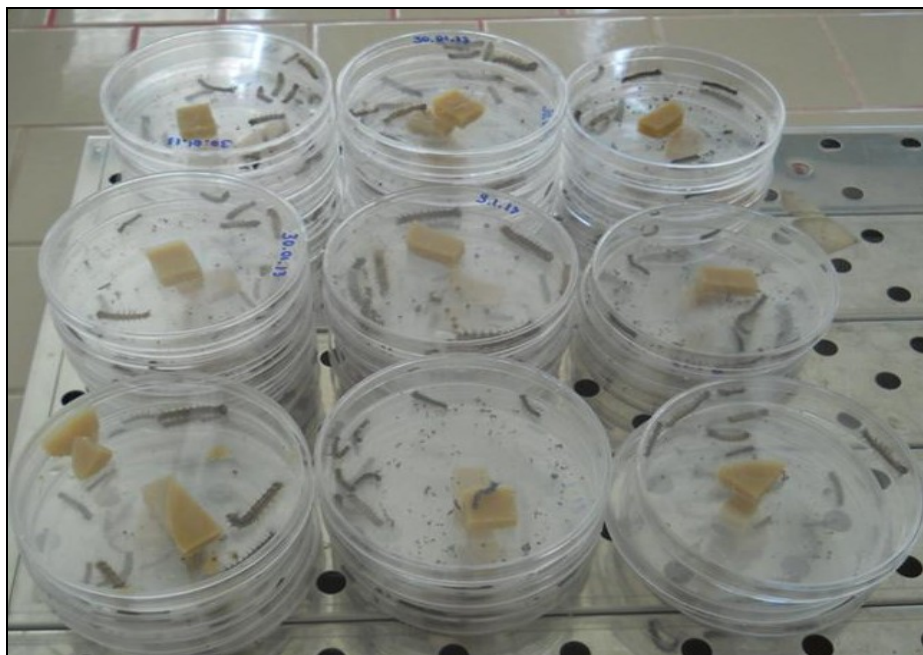


Fig. 5.2 - Fase di allevamento delle larve di *L. dispar* su dieta sterile.

I biosaggi sono stati eseguiti con due differenti metodologie. Nel primo caso si è applicato il metodo proposto da Hajek e collaboratori (2004); approssimativamente 26 g di terra sterilizzata a 180 °C per 2 ore sono stati posti in contenitori di plastica (11 x 4.5 cm) e inumiditi con 7 ml di acqua sterile contenenti 3×10^5 azigospore/ml di *E. maimaiga*, queste ultime ottenute dall'omogeneizzazione di cadaveri di *L. dispar* uccisi dal fungo (controllo positivo). Lo stesso quantitativo di suolo posto in contenitori simili a quelli precedentemente descritti è stato inumidito con solo 7 ml di acqua sterile (controllo negativo). Nel 2012 8 larve di IV età sono state poste nei contenitori e mantenute a 15 °C per 3 giorni senza fonte di cibo. La stessa metodica è stata utilizzata anche nel 2013 e 2014 usando 10 larve della stessa età. Nel 2012 e nel 2013 le larve sono state poste nei contenitori appena questi sono stati approntati con terra e spore del fungo. Nel 2014 invece sono stati fatti trascorrere 3 giorni, mantenendo i contenitori a 15 °C, prima di aggiungere le larve per i biosaggi, ritenendo che tale tempo fosse utile a indurre una maggiore attivazione delle azigospore.



Fig. 5.3 - Fase di introduzione delle larve nei contenitori con terra e spore di *E. maimaiga*.

Per ognuno dei contenitori sono state eseguite tre ripetizioni nel 2012 e 4 nel 2013 e 2014 per un totale di 96 larve di *L. dispar* testate nel primo anno, 240 nel secondo e 840 nel terzo.

Il secondo metodo è stato applicato solo nel 2013 ed esso è consistito nell'immergere larve di quarta età di *L. dispar* per 3 secondi in una soluzione acquosa contenente 3×10^5 azigospore di *E. maimaiga* per millilitro (controllo positivo). Altre larve sono state immerse per lo stesso tempo in una soluzione contenente soltanto acqua sterile (controllo negativo).

Nel 2013 e 2014 è stata anche verificata la suscettibilità di altri lepidotteri al fungo in questione. Larve di *Malacosoma neustria* L. (Lasiocampide), *Nymphalis polycloros* L. (Nymphalidae), *Catocala nymphagoga* Esper, *Spudaea ruticilla* Esper, *Dryobota labecula* Esper, *Dryobotodes eremita* F., *Dryobotodes monocroma* Esper e *Orthosia cruda* Denis & Schiffermuller (Noctuidae) sono state raccolte in territorio di Oniferi (NU) con l'impiego di un ombrello entomologico. Le larve sono state allevate su foglie di sughera fino a raggiungere la IV età e poi poste nei contenitori con suolo e spore seguendo il protocollo precedentemente descritto. Tutte le larve trattate sono state quindi trasferite in barattoli di plastica da 30 ml, contenenti le rispettive diete, allevate individualmente e monitorate quotidianamente per 10 giorni.

Le larve morte sono state messe in camere umide e mantenute a 20 °C per 10 giorni nei primi due anni di sperimentazione, in modo da consentire la formazione di spore, e successivamente sono state conservate in frigo.

Nel 2014 il mantenimento delle larve in camera umida è stato limitato alle 24 ore successive alla morte per evitare che lo sviluppo di altri funghi e/o patogeni secondari potesse rendere difficoltosa la diagnosi della causa di morte. Trascorso questo tempo i cadaveri sono stati conservati in frigo a 4 °C fino a quando sono stati sezionati e esaminati al microscopio (100x e 400x) per evidenziare la presenza di conidi o azigospore di *E. maimaiga* o altri patogeni.

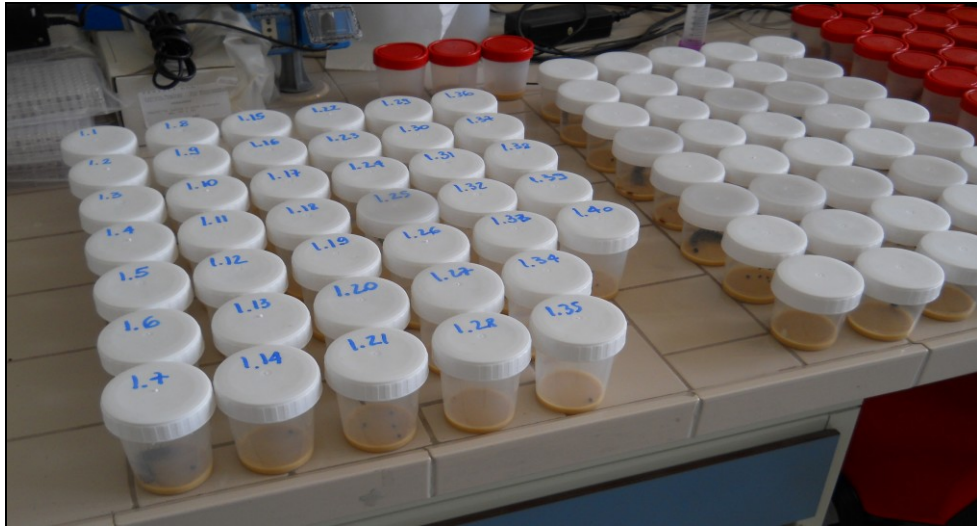


Fig. 5.4 - Allevamento delle larve, dopo essere state poste a contatto con le spore di *E. maimaiga*, in contenitori individuali sulle rispettive diete

5.2.2 Conta delle spore

Nel 2014, la quantità di spore presenti sul terreno è stata valutata anche alla fine delle prove d'infezione delle larve. A tal fine si è seguito il protocollo "Modified Weseloh Method" (Weseloh e Andreadis, 2002; Hajek *et al.*, 2012) al quale sono state apportate alcune modifiche.

Un quantitativo di terra prelevato da ciascuna scatola è stato lasciato disidratare sotto cappa a flusso laminare fino a quando il suo peso ha smesso di variare. Quindi è stato prelevato un grammo di terra ed è stato fatto reidratare in 25 ml di acqua distillata per 10 minuti. Stando sempre sotto cappa, si è provveduto a setacciare la terra attraverso una colonna costituita da setacci (Controls - Italia) di 20 cm di

diametro e di maglia via via più fine (500, 250, 125, 63 e 20 μm) utilizzando 200 ml di acqua distillata per ogni livello di setacciamento.

Il materiale accumulato nel setaccio da 20 μm e contenente le spore di *E. maimaiga* è stato sciacquato con un ridotto quantitativo di acqua distillata (50 ml circa) in un Becher da 500 ml ed è stata aggiunta acqua fino al volume totale di 250 ml.



Fig. 5.5 – Colonna di setacci impiegata per la conta delle spore di *E. maimaiga*.

Questa soluzione è stata quindi lasciata “decantare” per 30 minuti e successivamente si è provveduto con cautela ad aspirare con una pipetta 200 ml di acqua fino a raggiungere la quantità di 50 ml. Tale quantitativo è stato posto in provette Falcon a fondo conico, agitato con il Vortex e sono stati prelevati 5 campioni di 20 μl che sono stati posti su vetrini portaoggetti e coperti con vetrini coprioggetti da 20x20 mm per la conta delle spore al microscopio. Questa procedura è stata ripetuta tre volte per ogni scatola.

I dati sono stati quindi convertiti in numero di spore per grammo di terra.

5.2.3 Analisi statistica

I dati di mortalità registrati sui campioni di larve trattate e controllo nei differenti anni e per le differenti specie di lepidotteri sono stati sottoposti ad analisi statistica con ANOVA a una via seguita da LSD onde evidenziare la presenza di differenze significative.

6 Risultati dei biosaggi

6.1 Biosaggi su larve di *L. dispar* testate col metodo della terra contaminata da spore di *E. maimaiga*

6.1.1 Anno 2012

Nei biosaggi condotti nel 2012 la mortalità totale tra le larve di *L. dispar* prelevate dall'ambiente sardo e testate ponendole nelle scatole contenenti terra sterile, spore di *E. maimaiga* e acqua è stata del 91% (Tab. 6.1). Sei larve, corrispondenti all'8,33%, sono sopravvissute e le restanti 63 sono state uccise ma non è stato possibile determinare la causa di morte. Tre larve su 72, corrispondenti al 4,16% degli individui testati e al 4,55% di quelli morti, sono state uccise dal fungo; infatti dall'esame microscopico del loro corpo è stata rilevata la presenza delle caratteristiche azigospore del fungo. La mortalità registrata tra i campioni controllo è stata del 16% e nessuna di queste larve è risultata infettata da *E. maimaiga*.

Il test ANOVA a una via ha evidenziato differenze significative tra la mortalità rilevata nel trattato e quella del controllo ($F= 506,30$; $P < 0,0001$).

Tab. 6.1 – Mortalità rilevata nei tre anni di studio col metodo della terra contaminata.

Anno	Trattamento	Larve testate (n.)	Mortalità media (%)	Larve con
				<i>E. maimaiga</i> /larve morte (%)
2012	Trattato	72	91	4,55
	Controllo	24	16	0
2013	Trattato	200	28	10,71
	Controllo	40	5	0
2014	Trattato	680	23,68	9,32
	Controllo	160	6,88	0

6.1.2 Anno 2013

La mortalità totale registrata nel 2013 tra le 200 larve di *L. dispar* testate col metodo del suolo contaminato è stata del 28% (Tab. 6.1). La mortalità registrata tra le larve testimoni è stata del 5% e le cause non sono state individuate. Sei larve, pari al 3% degli individui trattati e al 10,71% di quelli morti, sono state uccise da *E. maimaiga*. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra la mortalità del trattato e quella del controllo ($P = 0,135$).

6.1.3 Anno 2014

Nel 2014 come detto, sono state testate oltre che campioni di *L. dispar* prelevati dall'ambiente sardo, anche larve del defogliatore provenienti da altre zone d'Italia. Le larve provenienti dalle province di Sassari, di Catania e di Reggio Calabria sono risultate significativamente più suscettibili all'azione del fungo rispetto a quelle provenienti dalle province di Firenze e di Padova, in comparazione anche con i controlli non trattati (Tab. 6.2).

6.1.3.1 Prov. di Sassari

Sono state testate 200 larve, più altre 40 come testimoni. La mortalità totale è stata del 20% circa mentre le larve uccise da *E. maimaiga* sono state 3, pari all'1,5% degli individui testati e al 7,5% di quelli morti. La mortalità totale nel campione controllo è stata del 4%.

6.1.3.2 Prov. di Catania

Le larve testate provenienti da Catania sono state 160 e la mortalità totale registrata è stata del 41% circa (65 esemplari). *E. maimaiga* ha causato la morte di 6 larve di *L. dispar*, pari al 3,75% del totale e al 13% di quelle morte. Le cause di morte delle rimanenti 59 larve non sono state identificate. Nel campione controllo è stata registrata una mortalità totale del 17,5%.

6.1.3.3 Prov. di Reggio Calabria

Le 160 larve di provenienza calabrese hanno mostrato una mortalità totale pari al 32,5%. Cinque larve, corrispondenti al 3,12% del totale e all'11,06% di quelle

morte, sono state uccise da *E. maimaiga*, mentre tra gli individui testimoni la mortalità osservata è stata del 5%.

6.1.3.4 Prov. di Firenze e Prov. di Padova

I biosaggi condotti sulle larve provenienti dalle province di Firenze e di Padova hanno messo in evidenza bassi livelli di mortalità pari al 6,33% per Firenze mentre nessuna larva veneta è morta. Non si sono osservate differenze significative con i rispettivi campioni di larve testimoni. In nessuna larva è stata rilevata la presenza *E. maimaiga* e tutte le larve testimoni hanno completato il proprio ciclo di sviluppo.

Tab. 6.2 - Mortalità media percentuale rilevata tra le larve di *L. dispar* di diverse provenienze. Le lettere in grassetto indicano differenze statisticamente significative tra le medie (ANOVA, seguita da test LSD, $P < 0,05$).

Provenienza	Trattamento	Mortalità (media \pm ES)		Larve con
		(%)		<i>E.maimaiga</i> /larve morte (media \pm ES)
Sassari	Larve trattate	19,5 \pm 5,8	a	7,5 \pm 5
	Larve controllo	5 \pm 2,89	b	0
Catania	Larve trattato	38,33 \pm 4,63	c	13 \pm 4
	Larve controllo	17,5 \pm 2,5	b	0
Reggio Calabria	Larve trattato	32,5 \pm 4,56	c	11,06 \pm 3,8
	Larve controllo	5 \pm 2,89	b	0
Firenze	Larve trattato	3,12 \pm 1,57	b	0
	Larve controllo	0	b	0
Padova	Larve trattato	0	b	0
	Larve controllo	0	b	0

6.2 Biosaggi su larve di *L. dispar* testate col metodo dell'immersione in soluzione contenente spore di *E. maimaiga*

La mortalità osservata tra le 85 larve testate nel 2013 col metodo dell'immersione in soluzione contenente spore del fungo e acqua è stata pari all'83,52% (Tab. 6.3). Nessuna delle 15 larve impiegate come testimone è morta a seguito del biosaggio. Il test statistico ANOVA a una via seguito da LSD ha evidenziato una differenza significativa nella mortalità registrata tra le larve trattate e quella rilevata tra le larve controllo ($F = 800,26$; $P < 0,0001$). Su quattro larve, corrispondenti al 4,70% del totale, è stata rilevata la presenza del fungo.

Tab. 6.3 – Mortalità rilevata col metodo dell'immersione in soluzione contenente spore di *E. maimaiga*.

	Larve testate		Mortalità		Larve sopravvissute		Larve con <i>E. maimaiga</i>	
	(n.)	(n.)	(%)	(n.)	(%)	(n.)	(%)	
Trattato	85	75	88,23	10	11,76	4	4,70	
Controllo	15	0	0	15	100	0	0	

6.3 Biosaggi condotti su larve di altri Lepidotteri

Come detto nel biennio 2013-2014 sono stati condotti biosaggi per verificare se *E. maimaiga* avesse un'azione letale su altre specie di lepidotteri oltre che su *L. dispar*. I dati sono esposti in Tab. 6.4 e Tab. 6.5.

6.3.1 *Malacosoma neustria*

La mortalità totale registrata tra le 60 larve di *M. neustria* testate nel 2013 è stata dell'88% mentre tra le larve testimone è stata pari al 20% (Tab. 6.4). Il test ANOVA a una via seguito da LSD ha messo in evidenza una differenza significativa tra la mortalità delle larve testate e delle larve testimoni ($P = 0,048$).

Nel 2014 la mortalità osservata fra le 90 larve testate è stata pari al 44,44% mentre quella osservata tra le larve testimoni è stata del 40%, raggiungendo quindi una mortalità equivalente a quella delle larve poste sul terreno con le spore (Tab. 6.4). Il test statistico non ha messo in evidenza differenze significative.

Nessuna delle 150 larve testate nel biennio ha mostrato la presenza di azigospore di *E. maimaiga*.

Tab. 6.4 - Mortalità percentuale rilevata tra le larve di *M. neustria* nei due anni di indagine.

Anno		Larve morte (%)	Larve con spore di <i>E. maimaiga</i> (%)
2013	Trattato	88,33	0
	Controllo	30	0
2014	Trattato	44,44	0
	Controllo	40	0

6.3.2 Altre specie

Larve di specie di lepidotteri appartenenti alla famiglia dei Nottuidi e di una appartenente a quella dei Ninfalidi sono state testate col metodo del suolo contaminato. I dati di mortalità relativi a queste specie sono riportati nelle Tab. 6.5 e Tab. 6.6. In nessuna delle larve morte è stata evidenziata la presenza di azigospore del fungo.

Tab. 6.5 - Mortalità larvale, corretta con la formula di Abbott, relativa alle altre specie di lepidotteri testate nel 2013.

Specie	Mortalità corretta con la formula di Abbott (%)	Larve con spore di <i>E. maimaiga</i> (%)
<i>Nymphalis polychloros</i>	15,15	0
<i>Catocala nymphagoga</i>	3,03	0
<i>Dryobota labecula</i>	37,5	0
<i>Dryobotodes eremita</i>	0	0
<i>Dryobotodes monochroma</i>	25	0

Tab. 6.6 - Mortalità assoluta percentuale, relativa alle altre specie di lepidotteri testate nel 2014.

Specie	Larve morte (%)	Larve con spore di <i>E. maimaiga</i> (%)
<i>Spudaea ruticilla</i>	25	0
<i>Dryobota labecula</i>	66	0
<i>Dryobotodes eremita</i>	25	0
<i>Orthosia cruda</i>	0	0

7 Discussione

I biosaggi condotti nel triennio 2012-2014 hanno evidenziato la capacità del fungo entomopatogeno *E. maimaiga* di infettare e condurre a morte larve di *L. dispar* prelevate sia dall'ambiente sardo che da altre regioni italiane.

Nei primi due anni di studio la popolazione sarda di *L. dispar* si trovava in una generale fase di latenza e tale situazione ha consentito la raccolta di un ridotto numero di ovature per gli allevamenti e i biosaggi da condurre in laboratorio. Le larve di *L. dispar* allevate fino alla IV età sono state testate impiegando un quantitativo di spore ritenuto sufficiente e sostanzialmente simile a quello che si può trovare in campo nell'anno successivo a un'epizoozia causata dal fungo (Hajek *et al.*, 1998). I risultati del 2012 e del 2013 hanno fornito dei dati contrastanti; infatti, solo nel primo anno si è rilevata una differenza statisticamente rilevante tra le larve trattate e quelle del controllo. Ciò evidenzia quindi un'azione del fungo non sempre di pari incidenza a danno delle larve di *L. dispar*; la reale efficacia del patogeno necessita pertanto di ulteriori approfondimenti. La patogenicità del fungo è stata comunque confermata nel 2013 dai biosaggi condotti immergendo le larve del defogliatore in una soluzione contenente azigospore; infatti essi hanno mostrato una mortalità significativamente differente fra larve trattate e larve testimoni.

Nel 2014 i biosaggi sono stati condotti su un più ampio numero di esemplari di *L. dispar*, potendo contare anche su larve provenienti da altre zone d'Italia. Il test statistico ha evidenziato differenze significative tra le mortalità registrate tra le varie provenienze delle larve del limantride. In particolare le larve ottenute dalle ovature raccolte nelle Province di Catania, Reggio Calabria e Sassari hanno mostrato tassi di mortalità statisticamente differenti da quelli registrati tra le larve provenienti da Firenze e da Padova. I tassi di mortalità rilevati tra le larve di Sassari, Reggio Calabria e Catania sono risultati inoltre statisticamente differenti dai tassi osservati tra le rispettive larve testimoni, confermando quindi da una parte l'azione letale del fungo e dall'altra una possibile differenza di suscettibilità tra larve di diversa provenienza. Più specificatamente le larve di Catania e quelle di Reggio Calabria sono risultate le più suscettibili.

Il Test ANOVA a una via non ha evidenziato inoltre differenze significative ($P = 0,80$) tra la concentrazione di spore nei contenitori nei quali sono state introdotte le larve (in media si è rilevata una concentrazione di $2,6 \times 10^3 \pm 3,1 \times 10^2$) delle varie provenienze considerate, e questo fatto accredita la tesi di una differente suscettibilità tra larve di provenienza diversa.

Inoltre, nel triennio di studio un numero esiguo di larve, sempre al di sotto del 5% del totale, ha mostrato all'analisi al microscopio una grande presenza di azigospore di *E. maimaiga*, segno inequivocabile dell'avvenuta infezione da parte del fungo con esito letale per la larva ospite. Questo tasso di mortalità tuttavia si discosta parzialmente dai risultati d'indagini condotte negli anni scorsi negli Stati Uniti e in Bulgaria. Lo studio americano (Hajek e Eastburn, 2001) evidenzia una mortalità del 5% circa, sui livelli quindi osservati anche nel presente lavoro, limitata però ai primi giorni successivi l'inizio della prova. Col passare del tempo infatti la mortalità osservata è cresciuta per raggiungere tassi superiori all'80%. Tuttavia è necessario rimarcare che nello studio americano è stata impiegata terra proveniente da aree in cui l'anno precedente si era verificato un'epizoozia causata da *E. maimaiga*.

Lo studio condotto recentemente in Bulgaria (Pilarska *et al.*, 2013) ha confrontato i risultati ottenuti testando larve di *L. dispar* sia su terra prelevata da foreste in cui si erano verificate epizoozie causate da *E. maimaiga* che su terra sterile alla quale sono state aggiunte larve sbriciolate del lepidottero uccise dal fungo. I risultati ottenuti sono maggiormente in linea con quelli raccolti in questo lavoro: nel trattamento con terra contaminata ad arte da cadaveri di *L. dispar* infatti la mortalità totale è stata del 70% ma la presenza del fungo è stata osservata solo nel 13,3% degli individui morti. Livelli più alti d'infezione (superiori, in alcuni casi al 40%) si sono registrati tra le larve testate su terra prelevata da foreste, seppure con tassi di mortalità inferiori rispetto a quelli ottenuti nello studio condotto negli Usa. La differenza tra i tassi di mortalità ottenuti con i due differenti metodi potrebbe essere causata da vari fattori: la terra prelevata dalla foresta potrebbe avere avuto una maggiore concentrazione di azigospore rispetto a quella ottenuta artificialmente omogeneizzando cadaveri di *L. dispar* con acqua e terra; inoltre i metodi di

conservazione delle stesse spore, in campo aperto negli studi americano e bulgaro, e in frigorifero nel nostro caso, potrebbero avere influito sulla loro capacità d'interrompere la dormienza in primavera e infettare le larve.

È tuttavia necessario mettere in risalto come sia nel presente studio che in quello condotto in Bulgaria si è rilevato un alto tasso di mortalità totale imputato a cause sconosciute. In queste larve non è stata evidenziata la presenza di alcun patogeno ma è lecito supporre che lo stress causato dai 3 giorni in cui le larve sono state mantenute nelle scatole, senza fonte di cibo, possa averne in qualche misura alterato le condizioni di salute. Tuttavia l'elevata differenza tra i dati relativi alla mortalità delle larve trattate e di quelle testimoni, fa ritenere plausibile ipotizzare che l'invasione di *E. maimaiga* abbia condotto a morte le larve già debilitate dallo stress, prima della formazione delle azigospore. Questo fatto suggerisce che basare la valutazione dell'attività del fungo solo sul rinvenimento di azigospore sui cadaveri degli ospiti può condurre a sottostimarne la reale capacità infettiva e la letalità (Pilarska *et al.*, 2013; Contarini *et al.*, 2014).

La valutazione dell'azione di *E. maimaiga* a danno di altre specie di lepidotteri necessita di futuri maggiori approfondimenti data la limitata ampiezza dei campioni testati, anche se nella quasi totalità delle specie sottoposte ad infezione non si è registrata alcuna mortalità attribuibile al patogeno, dato che in nessun caso si è rilevata la presenza nei cadaveri di sue azigospore. Solo nei biosaggi condotti nel 2013 su larve di *M. neustria*, i tassi di mortalità rilevati lasciano supporre che l'azione del fungo abbia avuto conseguenze letali a danno del defogliatore. Tuttavia, la differenza significativa tra la mortalità delle larve trattate e quella delle larve testimoni ($P = 0,048$) osservata nel 2013, non è stata confermata nei biosaggi effettuati nel 2014, quando la differenza di mortalità tra trattato e controllo è invece risultata molto ridotta. Queste osservazioni non contribuiscono a chiarire in modo definitivo l'effettiva patogenicità di *E. maimaiga* su altre specie di lepidotteri presenti in Sardegna e su *M. neustria* in particolare.

8 Conclusioni

Il presente studio è stato condotto con l'obiettivo ultimo di valutare l'introduzione dell'entomopatogeno fungino *E. maimaiga* nell'ambiente sardo per contrastare le pullulazioni di *L. dispar*, nocive alle formazioni forestali del genere *Quercus*.

L'indagine è stata suddivisa in due parti: a) indagare la presenza del patogeno nel territorio sardo e b) valutarne in laboratorio l'efficacia su campioni di larve di *L. dispar*, anche di provenienza non sarda, e di diverse altre specie di lepidotteri. La prima parte dell'indagine è stata rivolta a studiare il complesso dei nemici naturali del limantride, con lo scopo anche di verificarne la varietà e l'incidenza dopo un decennio d'impiego su larga scala di un insetticida microbiologico a base di *Bacillus thuringiensis kurstaki*. Da tale studio preliminare non sono emerse evidenze di possibili ripercussioni causate dalla distribuzione aerea di *Btk* sul complesso di parassitoidi evolventi su *L. dispar*, sebbene non si possa del tutto escludere che l'azione dell'insetticida sulle specie di lepidotteri no-target, convittime in numerosi casi del pool di parassitoidi, determini nell'ambiente una diminuzione di presenza anche di questi ultimi. La ricerca ha inoltre consentito di ampliare le conoscenze sulla composizione e sull'efficacia del complesso di microrganismi che in Sardegna possono attaccare il limantride. Fra essi, il microsporidio *Nosema portugal* si è dimostrato in grado di causare in alcune località tassi di mortalità di poco inferiori al 30%; esso meriterebbe perciò una maggiore attenzione e più approfonditi studi volti a valutarne l'effettiva incidenza in tutte le fasi di gradazione del defogliatore.

Inoltre, lo studio non ha evidenziato la presenza di *E. maimaiga* nel territorio sardo. Delle larve raccolte dal campo e allevate in laboratorio, infatti, nessuna ha mostrato la produzione delle caratteristiche azigospore del fungo, segnale inequivocabile dell'avvenuta penetrazione del patogeno e dell'infezione della larva ospite.

Con tali premesse, dopo aver assolto l'iter burocratico per l'introduzione del patogeno in laboratorio, è stata avviata la seconda parte dello studio durante la quale sono stati condotti i biosaggi per valutare la reale efficacia di *E. maimaiga* dapprima sul ceppo sardo di *L. dispar* e successivamente anche nei confronti di larve del

defogliatore provenienti da altre parti d'Italia. I biosaggi sono stati condotti anche per verificare l'effettiva specificità del patogeno per *L. dispar* e per questo sono state testate larve di altre specie di lepidotteri comunemente rinvenibili nell'ambiente forestale sardo.

I risultati ottenuti suggeriscono una sicura suscettibilità di *L. dispar* all'azione del fungo, confermata sia dalla differenza dei tassi di mortalità osservata tra le larve trattate e quelle testimoni che dall'incidenza percentuale, tuttavia sempre bassa, di larve nelle quali l'osservazione al microscopio ha rivelato la presenza delle azigospore del patogeno. Anche l'elevato tasso di mortalità attribuito a cause sconosciute potrebbe essere stato determinato dall'azione del patogeno, che può aver portato a morte le larve, già debilitate dalla permanenza nelle scatole per tre giorni senza alcuna fonte di nutrimento, prima della formazione delle azigospore.

Le prove condotte su altre specie di lepidotteri tendono in genere a confermare la specificità del patogeno per *L. dispar*. Infatti, sulle larve di Nottuidi, di *Nymphalis polychloros* e di *Malacosoma neustria* morte dopo la permanenza sul terreno con azigospore del fungo, non si è mai osservata la formazione di tali organi riproduttivi. Tuttavia la mortalità registrata su queste specie meriterebbe ulteriori prove di laboratorio su campioni più numerosi di quelli da noi saggiati, accompagnandole anche con analisi mirate alla determinazione certa delle cause biotiche responsabili dei significativi tassi di mortalità osservati.

Le prove condotte sollecitano certamente la prosecuzione delle sperimentazioni di laboratorio ma andrebbe anche verificata la possibilità di passare ad indagini di semi-campo, come potrebbero essere prove condotte all'interno di serre climatizzate dove trapiantare sughere e lasciare le larve di *L. dispar* libere di vagare fra il suolo, trattato con le spore, e la chioma delle piante nutrici. Questa ulteriore sperimentazione potrebbe permettere di fare un avanzamento significativo nel processo decisionale sull'impiego in pieno campo del patogeno, che anche nel nostro ambiente potrebbe permettere di limitare o escludere del tutto l'impiego del *Btk* a difesa delle formazioni sughericole.

9 Bibliografia

- Abrahamson L.P., Harper J.D., 1973 - Microbial insecticides control forest tent caterpillar in southwestern Alabama. USDA Forest Service research note SO-157.
- Bell R.A., Owens C.D., Shapiro M., Tardiff J.R., 1981 - Mass rearing and virus production. In: Doane, C.C., McManus, M.L. (Eds.), *The Gypsy Moth: Research toward Integrated Pest Management*, USDA Forest Service Tech. Bull., vol. 1584:599–600.
- Bing L.A., Lewis L.C., 1992 - Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hubner). *Biocontrol Science and Technology* 2:39-47.
- Cambini A., 1971 - Valutazione dei danni causati dagli insetti defogliatori alla quercia da sughero. In: *Atti del 1° convegno regionale del sughero*, Tempio Pausania, Italy, 14-16 ottobre 1971, pp. 327-339.
- Campus S., D'Angelo M., Scotti R., 2013 - Esigenze di ricerca in selvicoltura per la gestione sostenibile in Sardegna. *L'Italia Forestale e Montana* 68 (1): 25-41.
- Contarini M., Luciano P., Pilarska D., 2014 - Preliminary investigations to possible introduction of *Entomophaga maimaiga* in Sardinia. *IOBC-WPRS Bulletin* 101:227-233.
- Contarini M., Luciano P., Pilarska D., Pilarski P., Solter L., Huang W.F., Georgiev G., 2013 - Survey of pathogens and parasitoids in late instar *Lymantria dispar* larval populations in Sardinia, Italy. *Bulletin of Insectology* 66(1):51-58.
- Csóka G., Hirka A., Szöcs L., Hajek A.E., 2014 - First occurrence of the entomopathogenic fungus, *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & Soper, (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in Hungarian gypsy moth (*Lymantria dispar*) populations. *Növényvédelem* 50(6):257-262.
- Doane C.C., 1975 - Infectious sources of nuclear polyhedrosis virus persisting in natural habitats of the gypsy moth. *Environmental Entomology* 4:392-394.

- Dustan A.G., 1927 - The artificial culture and dissemination of *Entomophthora sphaerosperma* Fres., a fungus parasite for the control of the European apple sucker (*Psyllia mali* Schmdb.). *Journal of Economic Entomology* 20:68-75.
- Elkinton J.S., Liebhold A.M., 1990 - Population dynamics of gypsy moth in North America. *Annual Review of Entomology* 35:571-596.
- Fraval A., Herard F., Jarry M., 1978 - Mèthods d'echantillonnage des populations de pontes de *L. dispar* (Lep.: Lymantriidae) en Mamora (Maroc). *Annales de Zoologie Ecologie Animale* 10(2):267-279.
- Fuester R.W., Drea J.J., Gruber F., Herard F., 1981 - Explorations in Europe and Iran by the ARS European Parasite Laboratory: 1972-1977. In: The gypsy moth: Research toward integrated pest management. USDA Tech. Bull. 1584:324-340.
- Funk C.J., Ramoska W.A., Bechtel D.B., 1993 - Histopathology of *Entomophaga grylli* pathotype 2 infections in *Melanoplus differentialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:196-202.
- Georgiev G, Mirchev P., Pilarska D., Golemanski V., Pilarski P., Tomovski H., Bochev N., 2007 - The gypsy moth will be neutralized. *Forestry* 5:8-10.
- Georgiev G., Mirchev P., Rossnev B., Petkov P., Georgieva M., Matova M., 2011 - Introduction of *Entomophaga maimaiga* and control of *Lymantria dispar* calamities in Bulgaria. In: S. Kitanova (Ed.), *Proceedings of Scientific Conference Sustainable Management of Oak Forests in Bulgaria*, pp. 72-79.
- Glaser R.W., Chapman J.W., 1913 - The wilt disease of gypsy moth caterpillars. *Journal of Economic Entomology* 5:479.
- Hajek A.E., 1997 - Fungal and viral epizootics in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations in central New York. *Biological Control* 10:58-68.
- Hajek A.E., 1999 - Pathology and epizootiology of *Entomophaga maimaiga* infections in forest Lepidoptera. *Microbiology and Molecular Biology Review* 63:814-835.

- Hajek, A.E., Bauer L., McManus M.L., Wheeler M.M., 1998 - Distribution of resting spores of the *Lymantria dispar* pathogen *Entomophaga maimaiga* in soil and on bark. *BioControl* 43:189-200.
- Hajek A.E., Butler L., Wheeler M.M., 1995 - Laboratory bioassays testing the host range of the gypsy moth fungal pathogen *Entomophaga maimaiga*. *Biological Control* 5:530-544.
- Hajek A.E., Eastburn C.C., 2001 - Effect of host insects on activation of *Entomophaga maimaiga* resting spores. *Journal of Invertebrate Pathology* 77(4):290-291.
- Hajek A.E., Elkinton J.S., Witcosky J.J., 1996 - Introduction and spread of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* along the leading edge of gypsy moth spread. *Environmental Entomology* 25:1235–1247.
- Hajek A.E., Humber R.A., 1997 - Formation and germination of *Entomophaga maimaiga* azygospores. *Canadian Journal of Botany* 75:1739–1745.
- Hajek A.E., Humber R.A., Griggs M.H., 1990 - Decline in virulence of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) with repeated *in vitro* subculture. *Journal of Invertebrate Pathology* 56:91–97.
- Hajek A.E., Larkin T.S., Carruthers R.I., Soper R.S., 1993 - Modeling the dynamics of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) epizootics in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations. *Environmental Entomology* 22:1172–1187.
- Hajek A.E., Plymale R.P., Reilly J.R., 2012 - Comparing two methods for quantifying soil-borne *Entomophaga maimaiga* resting spores. *Journal of Invertebrate Pathology* 111:193-195.
- Herard F., Mercadier G., Abai M., 1979 - Situation de *Lymantria dispar* (Lep.: Lymantriidae) et de son complexe parasitaire en Iran, en 1976. *Entomophaga* 24:371-384.
- Injac M., Vasiljevic L., 1978 - Lutte contre le bombyx disparate (*Lymantria dispar* L.) par les virus de polyedrose nucleaire (Baculovirus) a l'aide de l'avion. *Zast Bilja* 29:43–56.

- Iwaki S., Marumo S., Saito T., Yamada M., Katagiri K., 1974 - Synthesis and activity of optically active disparlure. *Journal of the American Chemical Society* 96(25):7842-7844.
- Liebhold A.M., Hajek A.E., Elkinton J.S., Plymale R., 2013 - Emergent fungal entomopathogen does not alter density dependence in a viral competitor. *Ecology* 94:1217-1222.
- Luciano P., 1989 - L'impiego delle trappole a feromone nella programmazione della lotta alla *Lymantria dispar* L. In: Atti convegno "Avversità del bosco e delle piante arboree da legno" Firenze 15-16 Ottobre 1987, pp. 345-357.
- Luciano P., Delrio G., Prota R., 1982 - I defogliatori delle foreste a *Quercus suber* L.. Studi Sassaresi, sez. III, Annali della Facoltà di Agraria dell'Università di Sassari 29:321-365.
- Luciano P., Franceschini A., 2013 - Emergenze fitosanitarie e strategie di difesa nelle formazioni forestali della Sardegna. *L'Italia Forestale e Montana* 68(3):123-136.
- Luciano P., Lentini A., 1999 - Effects of *Bacillus thuringiensis* and defoliation by gypsy moth on lepidopterous fauna in cork oak forests. *IOBC-WPRS Bulletin* 22(3):115-119.
- Luciano P., Lentini A., 2012 - Ten years of microbiological control program against lepidopterous defoliators in Sardinian cork oak forests. *IOBC-WPRS Bulletin* 76:175-178.
- Luciano P., Lentini A., Cao O.V., 2003 - La lotta ai lepidotteri defogliatori delle sugherete in Provincia di Sassari. Edizioni Poddighe, Sassari.
- Luciano P., Lentini A., Giannisi M.P., Brundu G., 2002 - La previsione delle infestazioni nelle sugherete della Sardegna. In: "Il monitoraggio fitosanitario delle foreste", Quaderno ARSIA 2/2002:67-73.
- Luciano P., Prota R., 1984 - Osservazioni su alcuni fattori che influenzano la dinamica di popolazione di *Lymantria dispar* L. In: Atti 4° Simposio Dinamica Popolazioni, Parma, Italy, 22-24 October 1981, pp 141-152.

- Luciano P., Prota R., 1986 - La dinamica di popolazione di *Lymantria dispar* L. in Sardegna. III. Indicatori biologici della gradazione. *Frustula Entomologica* 7-8:613-630.
- Luciano P., Prota R., 1981 - La dinamica di popolazione di *Lymantria dispar* L. in Sardegna. Osservazioni sul parassitismo nel corso della gradazione. *Memorie della Società Entomologica Italiana* 60:227-234.
- Luciano P., Prota R., 1985 - Indagini di base per il controllo di alcuni defogliatori in ambiente forestale. *Società Italiana di Ecologia* 5:823-827.
- Luciano P., Prota R., 1989 - La difesa delle foreste a *Quercus suber* L. *Società Italiana di Ecologia, Atti* 8:151-160.
- Luciano P., Roversi P.F., 2001 - Oak defoliators in Italy. *Industria Grafica Poddighe, Sassari, Italy.*
- Marsh P.M., 1979 - The Braconid (Hymenoptera) parasites of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Annals of Entomological Society of America* 72:794-810.
- McCabe D.E., Humber R.A., Soper R.S., 1984 - Observation and interpretation of nuclear reductions during maturation and germination of entomophthoralean resting spores. *Mycologia* 1104-1107.
- McManus M.L., 2007 - In the Beginning: Gypsy Moth in the United States. In: *Slow the spread: A National Program to Manage the Gypsy Moth.* USDA Forest Service, Gen. Tech. Rep. NRS-6:3-14.
- Miller J.C., 1990 - Field assessment of the effects of a microbial pest control agent on non target Lepidoptera. *American Entomologist* 36:135-139.
- Milne R., Wright T., Welton M., Budau C., Gringorten L., Tyrrell D., 1994 - Identification and partial purification of a cell-lytic factor from *Entomophaga aulicae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 64:253–259.
- Mirchev P., Linde A., Pilarska D., Pilarski P., Georgieva M., Georgiev G., 2013 - Impact of *Entomophaga maimaiga* on gypsy moth populations in Bulgaria. *IOBC-WPRS Bulletin* 90:359-363.

- Nielsen C., Milgroom M.G., Hajek A.E., 2005 - Genetic diversity in the gypsy moth fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* from founder populations in North America and source populations in Asia. *Mycological Research* 109:941-950.
- Pilarska D., Georgiev G., McManus M., Mirchev P., Pilarski P., Linde A., 2007 - *Entomophaga maimaiga*, an effective introduced pathogen of the gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) in Bulgaria. In: Proceedings of the International Conference “Alien Arthropods in South East Europe – Crossroads of Three Continents”. 19-21 September 2007, Sofia, Bulgaria.
- Pilarska D., McManus M., Hajek A., Herard F., Vega F., Pilarski P., Markova G., 2000 - Introduction of the entomopathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* Hum., Shim. & Sop. (Zygomycetes:Entomophthorales) to a *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) population in Bulgaria. *Journal of Pest Science* 73:125-126.
- Pilarska D., Todorov M., Pilarski P., Djorova V., Solter L., Georgiev G., 2013 - Bioassays for detection of the entomopathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales:Entomophthoraceae) in soil from different sites in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica* 65(2):173-177.
- Pintureau B., 1981 - On the taxonomic status of the forms of *Lymantria dispar* (Lep. Lymantriidae). *Bulletin de la Societe Entomologique de France* 86(5/6):173-174.
- Pintus A., 2003 - Un'ipotesi di quantificazione economica del danno causato dai defogliatori. Atti Convegno “ L'ecosistema bosco: amici e nemici”, Ghilarza 22 Febbraio 2003.
- Podgwaite J., Shields K., Zerillo R., Bruen R., 1979 - Environmental persistence of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth. *Environmental Entomology* 8:528-536.
- Price P.W., 1997 - *Insect ecology*. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc.
- Prota R., 1976 - Contributo alla conoscenza dell'entomofauna della Quercia da sughero (*Quercus suber* L.). XI. Effetti della ritardata alimentazione sulla prima età e sulla durata dello stadio larvale in *Porthetria dispar* L.. *Studi*

- Sassaresi, sez. III, Annali della Facoltà di Agraria dell'Università di Sassari 24:9-13.
- Prota R., Luciano P., 1989 - Elementi di previsione delle infestazioni in sugherete sarde e prospettive di difesa. Atti convegno “Avversità del bosco e delle piante arboree da legno” Firenze 15-16 Ottobre 1987, pp. 287-304.
- Prota R., Luciano P., Lentini A., 1996 - Lotta microbiologica alla *Lymantria dispar* L. nelle sugherete della Sardegna. Atti Giornate Fitopatologiche 1996:91-98.
- Purrini K., Skatulla U., 1978 - On the natural diseases of the gypsy moth, *Lymantria dispar* L., in Sardinia, Italy. Anzeiger fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz 51:9-11.
- Reilly J.R., Hajek A.E., Liebhold A.M., Plymale R., 2014 - Impact of *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on outbreak gypsy moth populations (Lepidoptera: Erebidae): the role of weather. Environmental Entomology 43(3):632-641.
- Sabrosky C.W., Reardon R.C., 1976 - Tachinid parasites of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, with keys to adults and puparia. Miscellanea Publications, Entomological Society of America 10:1-80.
- Schaefer P.W., 1989 - Diversity in form, function, behaviour and ecology, an overview of the *Lymantriidae* (Lepidoptera) of the world. USDA Forest Service, Gen. Tech. Rep. NE-123:1-19.
- Shimazu M., Soper R.S., 1986 - Pathogenicity and sporulation of *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu, Soper and Hajek (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). Applied Entomology and Zoology 21:589-596.
- Simons E.E., Reardon R.C., Ticehurst M., 1979 - Selected parasites and hyperparasites of the gypsy moth, with keys to adults and immatures.- USDA, Agriculture handbook 540:1-59.
- Solari P., Cerboneschi A., Masala C., Crnjar R., Liscia A., 2002 - Chemoreception in larvae of the moth *Lymantria dispar*. Italian Journal of Zoology 69(4):305-312.

- Solter L.F., Pilarska D., Huang W.F., McManus M.L., Zubrik M., Patocka J., Novotny J., 2010 - Host specificity of microsporidia pathogenic to the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): Field studies in Slovakia. *Journal of Invertebrate Pathology* 105:1-10.
- Soper R.S., Shimazu M., Humber R.A., Ramos M.E., Hajek A.E., 1988 - Isolation and characterization of *Entomophaga maimaiga* sp. nov., a fungal pathogen of gypsy moth, *Lymantria dispar*, from Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 51:229-241.
- Strazanac J.S., Butler L., 2005 - Long-term evaluation of the effects of *Bacillus thuringiensis kurstaki*, gypsy moth nucleopolyhedrosis virus product Gypchek, and *Entomophaga maimaiga* on nontarget organisms in mixed broadleaf-pine forests in the central Appalachians. USDA Forest Service, FHTET.
- Ticehurst M., Fusco R.A., Kling R.P., Unger J., 1978 - Observations on parasite of gypsy moth in first cycle infestation in Pennsylvania from 1974-1977. *Environmental Entomology* 7:355-358.
- Tobin P.C., Blackburn L.M., 2007 - Slow the Spread: a national program to manage the gypsy moth. General Technical Report NRS-6. Newtown Square, PA: USDA Forest Service, Northern Research Station. 109 p.
- Tremblay E., 1986 - *Entomologia applicata*. Liguori Editore.
- Vanderberg J.D., 1990 - Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 83:755-759.
- Weseloh R.M., Andreadis T.G., 1992 - Epizootiology of the fungus *Entomophaga maimaiga*, and its impact in gypsy moth populations. *Journal of Invertebrate Pathology* 59:133-141.
- Weseloh R.M., Andreadis T.G., 2002 - Detecting the titer in forest soils of spores of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) fungal pathogen, *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *The Canadian Entomologist* 134(02):269-279.
- Zanardi D., Loi T., 1973 - Nuove prospettive di lotta contro la *Lymantria* delle sugherete. Tipografia Valdes, Cagliari.

Zúbrik M., Barta M., Pilarska D., Goertz D., Úradník M., Galko J., Vakula J., Gubka A., Rell S., Kunca A., 2014 - First record of *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in Slovakia. *Biocontrol Science and Technology* 24 (6):710-714.

Ringraziamenti

Al termine di questi anni di dottorato desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato e sostenuto e perciò reso possibile la realizzazione del mio studio.

Innanzitutto il mio ringraziamento più sentito al mio relatore, professor Pietro Luciano, per la cura e l'attenzione con cui ha seguito il mio lavoro e per gli insegnamenti continui e l'infinita disponibilità.

Un ringraziamento particolare al professor Ignazio Floris e a tutto l'Istituto di Entomologia dell'Università di Sassari, in particolare al dott. Luca Ruiu per l'aiuto e i suggerimenti costanti e al dott. Roberto Mannu per la disponibilità dimostrata.

Un ringraziamento speciale a tutto il personale della sede di Carta Loi e in particolare al Sig. Roberto Mattu, per l'amicizia e per il fondamentale aiuto che non è mai venuto a mancare.

Un grazie a Daniela Pilarska dell'Accademia delle Scienze della Bulgaria, per l'appoggio continuo e l'amicizia dimostrata.

Inoltre desidero ringraziare per la grande disponibilità: il dott. Bandino dell'Istituto Zooprofilattico di Nuoro, il dott. Bonsignore e il dott. Manti dell'Università Mediterranea di Reggio Calabria; il dott. Faccoli e il dott. Petrucco Toffolo dell'Università di Padova; il professor Santi Longo dell'Università di Catania; il dott. Roversi, CRA-APB Firenze.

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia e a Gilda in particolare per l'amorevole sostegno.

Infine, un grazie di cuore ai colleghi e amici Marco Mura e Gianmario Mou senza i quali quest'esperienza sarebbe stata profondamente diversa.