



A.D. MDLXII

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 XXVIII

**Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei
parassitoidi del cinipide galligeno del castagno**

dr. Angela Schiaffino

*Direttore della Scuola
Referente di Indirizzo
Docente Guida*

prof. Antonello Cannas
prof. Alberto Satta
prof. Roberto A. Pantaleoni

Anno accademico 2014- 2015



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 XXVIII

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in “Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari” dell’Università degli Studi di Sassari, a.a. 2014/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

Angela Schiaffino gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective I.3, Line of Activity I.3.1.)

RIASSUNTO

USO DI TECNICHE DI IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE NELLO STUDIO DEI
PARASSITOIDI DEL CINIPIDE GALLIGENO DEL CASTAGNO.

Il cinipide galligeno del castagno *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cynipidae) è considerato uno dei principali fitofagi dannosi del castagno, *Castanea* spp., in tutto il mondo. Un monitoraggio triennale dei parassitoidi autoctoni del fitofago è stato effettuato mediante la raccolta di esemplari che si stavano sviluppando all'interno delle galle. Ciascun campione è stato sottoposto ad analisi molecolare ed il gene mitocondriale COI, che codifica per la proteina citocromo ossidasi *c* subunità 1, è stato sequenziato e analizzato. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle di riferimento ottenute da adulti campionati in Sardegna e quelle presenti nelle banche mondiali GenBank e BOLD (Barcode of Life Database). Questo metodo ha permesso di identificare i parassitoidi in qualunque stadio vitale, compresi quelli di larva e pupa, che non possono essere identificati morfologicamente. Le specie identificate appartengono a 7 generi della superfamiglia Chalcidoidea: *Eupelmus* (Eupelmidae), *Eurytoma* e *Sycophila* (Eurytomidae), *Ormyrus* (Ormyridae), *Mesopolobus* (Pteromalidae), *Megastigmus* e *Torymus* (Torymidae). Tra i taxa identificati sono state trovate alcune specie sconosciute e anche specie gemelle. Questi dati renderanno possibile chiarire le relazioni tra i parassitoidi indigeni e il fitofago e inoltre verificare la diffusione di *Torymus sinensis*, antagonista esotico introdotto, così da poter correttamente pianificare nuove strategie di controllo.

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

ABSTRACT

USE OF MOLECULAR IDENTIFICATION TECHNIQUES FOR THE STUDY OF
PARASITOIDS OF THE CHESTNUT GALL WASP.

The chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cynipidae) is considered as a major pest of *Castanea* species worldwide. A three-year monitoring of the indigenous parasitoids of this pest was performed by collecting specimens inside the galls. Each specimen was processed by molecular analysis. DNA was analysed by amplification and sequencing of the COI gene, coding for cytochrome *c* oxydase subunit 1. Each sequence was compared with reference sequences from adults sampled in Sardinia and those present both in GenBank and Barcode of Life Database (BOLD). This procedure enabled us to identify all immature life stages, included larvae and pupae that cannot be identified otherwise. The identified species belong to 7 genera of the superfamily Chalcidoidea: *Eupelmus* (Eupelmidae), *Eurytoma* and *Sycophila* (Eurytomidae), *Ormyrus* (Ormyridae), *Mesopolobus* (Pteromalidae), *Megastigmus* and *Torymus* (Torymidae). Among the identified taxa we found a few unknown species and also some sibling ones. These findings will make it possible to elucidate the relationships between the indigenous parasitoids and the host pest and to verify the spreading of the introduced exotic antagonist *Torymus sinensis* in order to plan new control strategies.

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

INTRODUZIONE

La determinazione di specie è sempre stato uno dei principali obiettivi della biologia. Il monitoraggio efficiente ed efficace di individui e popolazioni è strettamente dipendente dalla corretta identificazione di specie (Smith *et al.*, 2011).

Attualmente i metodi molecolari stanno diventando strumenti ausiliari indispensabili per la rapida identificazione di specie (Hajibabaei *et al.*, 2007), per individuare specie criptiche dal punto di vista morfologico o per scoprire individui erroneamente identificati (Kaarinen *et al.*, 2010). Un esempio è rappresentato dal progetto DNA barcoding (Ratnasingham *et al.*, 2007 e 2013) che prevede il rapido sequenziamento di uno o più geni di una specie e il confronto delle sequenze geniche ottenute con quelle contenute all'interno della banca dati. Con questo metodo è possibile sviluppare un sistema universale, standardizzato ed economico per identificare organismi in vari stadi di sviluppo la cui determinazione morfologica non è raggiungibile (Hrcek *et al.*, 2011). Ciò è particolarmente utile anche per gli adulti poiché non sempre è possibile avere la disponibilità di specialisti per identificare ogni campione (Stahlhut *et al.*, 2013; Hebert *et al.*, 2003a).

Occorre però tener conto del fatto che non è possibile basare la tassonomia primariamente sulle sequenze di DNA. Infatti anche se le sequenze nucleotidiche per alcuni aspetti sono più obiettive dei dati tradizionali (ad esempio morfologici), per altri non lo sono (ad esempio per quanto riguarda la divergenza di sequenza). Comunque una volta delineati i confini l'uso di sequenze per i geni standard è altamente praticabile (Lee, 2004).

Questo permette di correlare qualsiasi stadio di un organismo vivente o anche una piccola parte di esso a una singola entità molecolare. Tale promettente approccio è stato già utilizzato per studiare le reti alimentari (Kaarinen *et al.*, 2010) e anche per la correlazione tra organismi che presentano dimorfismo sessuale e per i quali è particolarmente difficile associare le femmine e i maschi appartenenti alla stessa specie (Li *et al.*, 2010;

Al Khatib *et al.*, 2014; Al Khatib *et al.*, 2015). Tuttavia si devono valutare per ciascun caso i geni appropriati da analizzare. Generalmente vengono usate le sequenze del gene citocromo *c* ossidasi subunità I, COI, (Folmer *et al.*, 1994) ma anche altri marcatori sono stati proposti e differenti autori sottolineano l'importanza di un approccio multigenico. Come alternativa al marcatore COI vengono spesso usati geni ribosomali mitocondriali quali il gene 16S (Kambhampati *et al.*, 1995) per ragioni differenti: la loro amplificazione è facile e vi è abbondanza di sequenze nelle banche dati. Accanto al suddetto gene COI sono stati usati lo spaziatore trascritto interno ITS2 (Yara, 2006) ed il gene ribosomale 28S (Campbell *et al.*, 2000; Munro *et al.*, 2011), entrambi nucleari.

Le potenzialità della tassonomia molecolare sono state anche dimostrate da vari autori che hanno così potuto distinguere, mediante l'amplificazione del gene ITS1, specie di parassitoidi e loro ibridi (Yara *et al.*, 2009) o individuare la presenza di *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) nel primo stadio larvale nelle gemme dormienti del castagno per mezzo dell'amplificazione del gene 28S (Sartor *et al.*, 2012). Diversi autori sottolineano l'importanza della scelta di geni e regioni comuni che consentano un confronto ampio come i geni COI, 16S, 18S e fattore di allungamento 1 α già ampiamente usati e informativi in un ampio ambito di divergenze negli insetti (Caterino *et al.*, 2000).

Particolarmente interessante è il già citato progetto DNA barcoding per mezzo del quale è possibile per la prima volta dopo anni introdurre in tassonomia una generalizzazione che permette a ricercatori specializzati in differenti campi di lavorare in una cornice condivisa (Casiraghi *et al.*, 2010).

Questo progetto può essere efficacemente applicato allo studio delle reti alimentari che sono rappresentate dalle interazioni trofiche tra le specie di una comunità ecologica e rappresentano un importante strumento per la moderna ecologia delle comunità. Le reti trofiche quantitative in particolare descrivono non soltanto quali specie interagiscono tra loro ma anche in quale misura lo fanno (Memmott *et al.*, 1994). Un numero crescente di reti alimentari sono state esaminate in letteratura ecologica negli ultimi 20 anni. La maggior

parte degli studi pubblicati riguarda le comunità insetto-parassitoide perché qui le relazioni tra specie possono essere facilmente rivelate mediante l'allevamento. Ciononostante l'ecologia e la tassonomia dei parassitoidi è relativamente poco conosciuta, in parte a causa del loro stile di vita ma anche a causa della loro sovente piccola dimensione e del conservatorismo morfologico, entrambi i quali rendono impegnativa la determinazione di specie (Karttinen *et al.*, 2010). Questo produce tre tipi di problemi potenziali.

Primo, gli errori di identificazione di specie costituiscono una preoccupazione importante poiché se i registri di allevamento di taxa multipli sono raggruppati insieme, possiamo ottenere un'impressione errata della reale distribuzione dei collegamenti trofici all'interno della rete, con probabili effetti domino sull'inferenza di interazioni indirette potenziali sebbene mediate da nemici naturali comuni.

Secondo, studi recenti hanno scoperto specie criptiche multiple all'interno di taxa precedentemente considerati come specie singole generaliste sulla base di caratteri morfologici. Nel caso più estremo pubblicato finora, Smith e coautori (2008) hanno trovato 36 specie provvisorie al posto di un parassitoide generalista.

Terzo, una volta che le specie sono state correttamente delimitate, è necessario attribuir loro un nome. Un adeguato sistema tassonomico è necessario per capire quali siano le specie che interagiscono realmente. Se le specie non sono correttamente identificate per una località, allora il ruolo trofico che esse svolgono non può essere comparato con quello che le stesse svolgono nella rete alimentare stabilita per un altro sito.

Considerare in maniera corretta tutti questi aspetti è il prerequisito per un'accurata quantificazione della struttura della rete alimentare e per confrontare la rete trofica di un sito con quella di un altro. Inoltre, nonostante il potere potenziale della caratterizzazione molecolare di specie (Hajibabaei *et al.*, 2007), queste tecniche sono state usate raramente negli studi delle reti alimentari. Mentre in un lavoro pionieristico, Van Veen e coautori (2003) usarono marcatori molecolari per risolvere una frazione selezionata di specie di parassitoidi difficili, finora solo pochi studi hanno riguardato un'estesa

conferma molecolare dell'identificazione basata sulla morfologia. Talvolta l'analisi molecolare ha permesso di differenziare specie non distinguibili morfologicamente o viceversa ha consentito di raggruppare sotto un'unica entità tassonomica specie con elevata variabilità morfologica intraspecifica (Guerrieri *et al.*, 2010). Il lavoro di Kaartinen *et al.* (2010) è stato il primo a usare i caratteri molecolari di specie per tre scopi: (i) per correggere errori di identificazione morfologica, (ii) per validare i limiti di specie di taxa di parassiti ed inquilini e per assegnarli a specie precedentemente descritte, e (iii) per esaminare l'estensione alla quale l'identificazione molecolare di specie altera la nostra percezione della struttura quantitativa della rete alimentare.

I marcatori molecolari hanno permesso di aumentare la risoluzione e in tal modo aumentare il livello di specializzazione percepito all'interno delle reti trofiche attraverso due meccanismi: sfrondando gli individui non correttamente identificati allevati dalle specie-ospite sbagliate, e risolvendo i taxa criptici, che attaccano una ristretta gamma ospite (ad esempio specialisti autentici), all'interno di morfospecie stabilite i cui individui sommati attaccano una gamma ospite più ampia (ad esempio generalisti evidenti).

Questa tesi si concentra sullo studio della comunità di parassitoidi indigeni presenti nelle galle prodotte dal cinipide galligeno del castagno *D. kuriphilus* e sulla diffusione del suo nemico naturale, il parassitoide esotico *Torymus sinensis* Kamijo (Hymenoptera Torymidae), introdotto in alcuni siti sperimentali al fine di controllare l'infestazione del castagno da parte del cinipide accidentalmente importato in Sardegna. A tal fine è essenziale l'identificazione molecolare dei parassitoidi presenti all'interno delle galle, ancora allo stadio di larva o pupa e per questo motivo indistinguibili morfologicamente, mediante il sequenziamento del gene mitocondriale citocromo *c* ossidasi subunità I (COI) per studiare in maniera più precisa la loro diffusione e frequenza oltre che osservare le loro associazioni. L'identificazione di stadi immaturi di parassitoidi infatti non è al momento possibile usando le chiavi basate sulla morfologia ma è possibile usando la sequenza del gene COI. Come dimostrato da Hebert e coautori (2003b) l'analisi del gene COI può essere usata abitualmente per raggiungere

l'identificazione di specie in tutti i *phyla* animali con qualche eccezione. L'inclusione di tecniche molecolari è ideale pertanto al fine di migliorare l'accuratezza degli studi ecologici sulla struttura della comunità e identificare possibili agenti di controllo biologico all'interno della comunità dei parassitoidi autoctoni (Aebi *et al.*, 2007). Finora inoltre non sono state riscontrate applicazioni di tecniche molecolari per identificare parassitoidi in stadi precoci di sviluppo, mentre per altre classi di insetti questa possibilità è stata già esplorata (Dhananjeyan *et al.*, 2010; Meiklejohn *et al.*, 2013). L'importanza di studiare gli antagonisti autoctoni è apparsa come un compito urgente per migliorare le strategie per la protezione dei castagni (Addario *et Turchetti*, 2011; Francati *et al.* 2015; Shiga, 1999; Speranza *et al.*, 2009) tenendo conto del fatto che il controllo biologico di emergenza effettuato anche in Italia introducendo il parassitoide *Torymus sinensis* si è scoperto non essere esente da rischi (Gibbs *et al.*, 2011; Ferracini *et al.*, 2015). Tuttavia continuano gli studi sul suo comportamento (Graziosi *et Rieske*, 2013) e può essere molto interessante osservare ciò che avviene all'interno della galla prima che gli adulti emergano. I parametri ecologici sono significativi in molti casi per determinare gli esiti di interazioni degli agenti introdotti con le potenziali specie non-bersaglio e in tal modo valutare il rischio ambientale legato al controllo biologico (Louda *et al.*, 2003; Van Lenteren *et al.*, 2006a,b).

Il caso di studio: parassitoidi del cinipide galligeno del castagno

Il cinipide galligeno *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cinipidae) è considerato l'insetto maggiormente dannoso per il castagno a livello mondiale. Fitofago legato esclusivamente al genere *Castanea*, attacca sia il castagno europeo che gli ibridi euro-giapponesi. Deve il suo nome alla capacità di indurre la formazione di galle, ingrossamenti tondeggianti di tessuto vegetale, nella pianta ospite. Le galle limitano lo sviluppo dei germogli e di conseguenza la produzione di castagne che può registrare perdite che vanno dal 50 all'80% (OEPP/EPPO, 2005; Battisti *et al.*, 2014). La perdita di prodotto può essere diretta, a causa della mancata formazione dei fiori e indiretta, a causa della riduzione della superficie fogliare e quindi di quella fotosintetica

(Battisti *et al.*, 2014). Non esistono segnalazioni di moria del castagno causata dal cinipide (EFSA, Panel on Plant Health, 2011) tuttavia, in seguito ad attacchi ripetuti da parte del fitofago la pianta si indebolisce e diviene più vulnerabile a patologie fungine, ad esempio il cancro corticale, che possono provocarne la morte (Quacchia *et al.*, 2008).

Originario della Cina, (Oho *et Umeya*, 1975; Murakami, 1980; Li *et al.*, 2004) risulta introdotto da tempo in Giappone, Corea, Nepal (Yasumatsu, 1951; Shiraga, 1951; Cho *et Lee*, 1963; Abe *et al.*, 2007) e parte orientale degli Stati Uniti d'America (Payne *et al.*, 1975; Rieske, 2007); nel 2002 è stato rinvenuto per la prima volta in Europa in Piemonte (provincia di Cuneo) (Brussino *et al.*, 2002) ed è stato immediatamente inserito nella Lista A2 della European Plant Protection Organization (EPPO). Secondo il Reporting Service della EPPO il cinipide è attualmente presente (tra parentesi l'anno del suo rinvenimento) in Austria (2013), Croazia (2010), Francia (2005), Germania (2012), Ungheria (2013), Slovenia (2004), Portogallo (2014), Spagna (2012), Turchia (2014) ed è stato recentemente segnalato in Gran Bretagna (2015). Il fitofago risulta in corso di eradicazione in Svizzera (2009) e in Repubblica Ceca (2012), mentre è stato nuovamente segnalato in Olanda dopo che nel 2013 era stata dichiarata la sua eradicazione. In Italia è attualmente presente in tutte le regioni interessate dalla presenza di aree castanicole tra le quali si è diffuso sia tramite dispersione naturale che mediante commercio di piante infestate.

Il cinipide galligeno del castagno è un insetto di piccole dimensioni di colore nero con zampe giallo-brune. Si tratta di una specie univoltina che si riproduce per partenogenesi telitoca, dalle uova nascono quindi solo individui di sesso femminile e perciò, potenzialmente, un solo individuo può dare il via ad una nuova colonizzazione. Gli adulti sfarfallano tra fine maggio e fine luglio. Ogni femmina depone gruppi di 3-5 uova per gemma e può deporre complessivamente fino a un centinaio di uova. In una gemma si possono trovare fino a 30 uova. La schiusa delle uova avviene dopo circa 40 giorni e le larve permangono per tutto l'autunno e l'inverno allo stadio di I età. In questa fase la loro presenza all'interno della gemma è asintomatica e perciò molto

difficile da rilevare. La primavera successiva, alla ripresa vegetativa della pianta, le larve riprendono a nutrirsi inducendo la formazione delle galle. All'interno di una galla c'è un numero variabile di celle, ciascuna contenente una sola larva. Le larve si alimentano per circa 20-30 giorni, per poi impuparsi da metà maggio a metà luglio a seconda dell'altitudine, dell'esposizione e della varietà del castagno. Le possibilità di lotta diretta contro questo insetto non sono molte e i trattamenti insetticidi sono poco o nulla efficaci oltre che per l'assenza di principi attivi idonei, anche per le modalità di sviluppo del fitofago che rimane nell'ambiente per un periodo di tempo molto limitato. I trattamenti chimici sono inoltre assolutamente improponibili su alberi di grandi dimensioni e negli ambienti boschivi, dove dimora comunemente il castagno, per i gravi rischi ambientali conseguenti all'impiego di prodotti di sintesi (Alma, 2010).

La lotta biologica mediante l'introduzione del parassitoide specifico *Torymus sinensis* Kamijo (Hymenoptera, Torymidae), originario anch'esso della Cina, rappresenta il metodo più promettente di controllo del fitofago. *T. sinensis* è stato utilizzato per la prima volta in Giappone, successivamente in USA e, dal 2005, in Europa (Moriya *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2007; Quacchia *et al.*, 2008). In Piemonte, a dieci anni dalla sua introduzione, si sta assistendo ad una drastica riduzione dell'infestazione (Quacchia *et al.*, 2014).

Numerosi studi sono stati inoltre condotti sulle comunità dei parassitoidi autoctoni reclutati dal cinipide del castagno, si tratta di specie generaliste già presenti nel territorio che trovano nel fitofago alieno un nuovo ospite su cui svilupparsi. L'obiettivo di tali indagini è quello di conoscere la composizione in specie del complesso di parassitoidi indigeni e di valutare il loro contributo nel controllo delle infestazioni del fitofago (Speranza *et al.*, 2009; Quacchia *et al.*, 2012; Guerrieri *et al.*, 2010; Panzavolta *et al.*, 2013; Matošević *et al.*, 2013; Palmeri *et al.*, 2014; Francati *et al.*, 2015; Kos *et al.*, 2015). Nella maggior parte dei casi l'identificazione delle specie è stata fatta da tassonomi specialisti del gruppo degli Imenotteri Calcidoidei sulla base delle caratteristiche morfologiche degli esemplari adulti (Speranza *et al.*, 2009; Matošević *et al.*, 2013; Palmeri *et al.*, 2014; Francati *et al.*, 2015; Kos *et al.*, 2015) quindi mediante l'utilizzo delle chiavi dicotomiche disponibili in

letteratura (Askew, 1961; Graham, 1969; Bouček, 1970; Pujade-Villar, 1993; Graham *et* Gijswijt, 1998; Chinery, 2010; Askew, non pubblicato), del catalogo dei parassitoidi dei cinipidi delle querce (Askew, 2013) e/o mediante il confronto con esemplari determinati e depositati presso il Natural History Museum of London. Dal momento che gli stadi larvali non sono identificabili morfologicamente, per le determinazioni specifiche sono stati utilizzati esclusivamente esemplari adulti sfarfallati dalle galle del fitofago allevate in laboratorio.

In altri casi le identificazioni sono state affiancate da analisi biomolecolari (Guerrieri *et al.*, 2010; Quacchia *et al.*, 2012; Panzavolta *et al.*, 2013) in particolare per quei taxa comprendenti specie criptiche indistinguibili sulla base delle sole caratteristiche morfologiche; questo è il caso di *Eurytoma brunniventris* Ratzeburg e del complesso *Eupelmus urozonus* Dalman / *E. annulatus* Nees (Aebi *et al.*, 2007; Quacchia *et al.*, 2012), di *Megastigmus dorsalis* (Fabricius) (Quacchia *et al.*, 2012) e di *Torymus* sp. (Guerrieri *et al.*, 2010).

Il cinipide galligeno del castagno è stato rilevato in Sardegna nel 2007, nel territorio della Barbagia di Belvì (Nuoro) sul versante occidentale del complesso montuoso del Gennargentu, ed in particolare nel territorio di Aritzo da dove è sicuramente partita l'infestazione. Focolai sono stati successivamente rinvenuti anche nei comuni di Belvì, Desulo e Tonara. La sua introduzione sarebbe avvenuta tra il 2003 ed il 2005 da materiale vivaistico proveniente dal Piemonte (Pantaleoni *et al.*, 2007). Attualmente il fitofago esotico ha raggiunto anche le poche aree castanicole dell'Ogliastra. Risulta invece ancora assente in altre piccole ed isolate aree castanicole della Sardegna (Gallura, Monti Ferru, Goceano, etc).

Dopo un primo, quanto inutile, tentativo di distruzione delle branche attaccate da parte degli enti tecnici regionali e degli stessi castanicoltori, anche in Sardegna si è optato per l'utilizzo del parassitoide specifico *Torymus sinensis*. Nell'ambito del progetto "Controllo biologico del cinipide galligeno del castagno nella Barbagia di Belvì" finanziato dall'Amministrazione Provinciale di Nuoro, nel 2009 i ricercatori dell'Istituto per lo Studio degli

Ecosistemi del Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISE-CNR) insieme a colleghi dell'Università di Torino hanno eseguito il primo lancio del parassitoide esotico in un castagneto, accuratamente scelto, sito in Località Geratzia (Aritzo). Tra il 2010 e il 2011 sono stati effettuati altri 5 lanci sempre con materiale fornito dall'Università di Torino. Nel 2012 è stato possibile effettuare un lancio con insetti sfarfallati in Sardegna da galle raccolte nel primo sito di introduzione. Nello stesso anno, essendosi reso disponibile sul mercato materiale di *T. sinensis*, un'associazione locale di castanicoltori ha effettuato altri 8 lanci nel territorio oggetto dell'infestazione. Tra il 2013 ed il 2015 la Regione Sardegna ha finanziato l'acquisto di decine di lanci nell'ambito del "Programma regionale triennale di lotta al cinipide galligeno del castagno" distribuiti oltre che nel territorio della Barbagia di Belvì anche nella vicina provincia dell'Ogliastra di più recente infestazione.

Anche in Sardegna, come è avvenuto in molti altri comprensori in cui è giunto il Cinipide galligeno del castagno, sono stati compiuti molti sforzi per verificare quali e quanti parassitoidi indigeni venivano reclutati dal nuovo organismo invasivo. Nel 2010 e nel 2011, a differenza del 2009 in cui furono eseguiti esclusivamente campionamenti qualitativi di "orientamento", si è proceduto con campionamenti ad hoc di galle per valutare oltre che la presenza anche l'abbondanza e la composizione specifica delle comunità di parassitoidi locali. In particolare le galle raccolte venivano poste in allevamento in laboratorio raccogliendo e identificando gli individui mano a mano sfarfallati.

Questo tipo di approccio, per quanto utilissimo ed utilizzatissimo, non risulta però del tutto soddisfacente. Il numero di esemplari sfarfallati veniva infatti rapportato ad una unità di riferimento, la galla, nel cui interno potevano essere presenti un numero variabile di celle e quindi di esemplari del fitofago. Anche se il numero medio di celle può essere stimato, la percentuale di parassitizzazione calcolata sugli sfarfallamenti è per forza di cose molto approssimativa e spesso sovrastimata. Oltre a ciò, dagli sfarfallamenti, non si ottiene alcun dato sui fenomeni di super- e iper-parassitizzazione se non per debole inferenza con notizie note in letteratura. Per questi motivi, a partire dal

2012 si è deciso di affiancare all'allevamento delle galle anche l'attività di sezionamento di una parte di esse, descritta nel dettaglio più oltre.

I dati ottenuti con l'identificazione specifica dei parassitoidi indigeni allo stadio di larva o di pupa contenuti nelle galle mediante tecniche biomolecolari permetteranno di 1) valutare il reale tasso di parassitizzazione del cinipide quantificando con precisione il contributo delle singole specie di parassitoidi, 2) valutare l'eventuale iper-parassitizzazione, 3) avere dati temporalmente assai precisi, riferiti se non al giorno alla settimana seguente il campionamento (e non ai lunghi periodi di attesa degli sfarfallamenti), 4) verificare la presenza quantitativa del parassitoide esotico *Torymus sinensis* senza dover attendere i suoi sfarfallamenti nella primavera successiva e senza necessità di campionamenti ad hoc nella stagione invernale. *T. sinensis* infatti ha un ciclo biologico monovoltino, perfettamente sincronizzato con quello del suo ospite, rimane così entro le galle sino alla primavera successiva.

Il tema di questa tesi riguarda in particolare l'applicazione delle tecniche di identificazione biomolecolare attraverso il barcoding, il confronto della comunità di parassitoidi così delineata con quella ottenuta attraverso gli sfarfallamenti e la determinazione dei parassitoidi adulti su base morfologica, l'individuazione di punti discordanti tra le determinazioni su base biomolecolare e base morfologica con discussione dei sottesi problemi biologici.

MATERIALI E METODI

Campionamenti in campo

I rilievi hanno riguardato sette siti distribuiti nel territorio della Barbagia di Belvì, in provincia di Nuoro, in particolare nei Comuni di Tonara, Desulo, Aritzo e Belvì (tabella 1, figura 1). Le galle sono state raccolte da piante di castagno isolate all'interno di un bosco misto di querce ed altre essenze tipiche della macchia mediterranea o da piante facenti parte di piccoli castagneti da frutto o cedui semi-abbandonati e completamente circondati dal bosco.

Per tre anni di seguito (2012, 2013 e 2014) a cadenza bisettimanale, fra fine maggio e fine luglio (6 campionamenti/anno), da ciascuno dei 7 siti sono state prelevate 30 galle di cinipide del castagno (210 galle per campionamento, 1.260 galle per anno, 3.780 galle complessive, corrette a 3.750 mancando le 30 di un singolo campionamento nei tre anni a causa di condizioni meteo avverse). In laboratorio le galle venivano gradualmente aperte sezionandole in fette sottili con l'ausilio di un bisturi sotto binoculare ad adeguato ingrandimento. Tale operazione, particolarmente delicata, è stata preferita ad una sezione mediale (molto più rapida) per scongiurare la distruzione degli insetti presenti all'interno della galla.

Per ciascuna galla veniva registrato il numero di celle, e per ciascuna cella il contenuto: vuota, solo Cinipide, Cinipide e parassitoide, solo parassitoide, altro (normalmente presenza di un iperparassitoide). Per ciascun inquilino della cella veniva poi individuato lo stadio vitale (larva e sue dimensioni grossolane, pupa, adulto). In nota veniva inoltre eventualmente annotata qualsiasi altra informazione ritenuta utile sul contenuto di ciascuna cella. Complessivamente sono state esaminate poco più di 13.000 celle.

L'apertura delle galle veniva fatta entro 48 ore dalla loro raccolta in modo da raccogliere dati che rispecchiassero il più possibile la situazione reale al momento del prelievo del materiale in campo.

Tabella 1 - Siti di campionamento delle galle nel territorio della Barbagia di Belvì

Sito di campionamento	Comune	Latitudine	Longitudine	Altitudine (m slm)
1	Aritzo	39°57.6622' N	9° 11.7757' E	815
3	Aritzo	39°57.9144' N	9° 12,6660' E	1138
5	Desulo	40°1.2059' N	9° 13.3670' E	1160
10	Tonara	40°0.9450' N	9° 9,0876' E	930
12	Belvì	39°58.4538' N	9° 9,9006' E	750
13	Belvì	39°57.4740' N	9° 10.6020' E	715
14	Aritzo	39°56.8458' N	9° 11.9808' E	1000

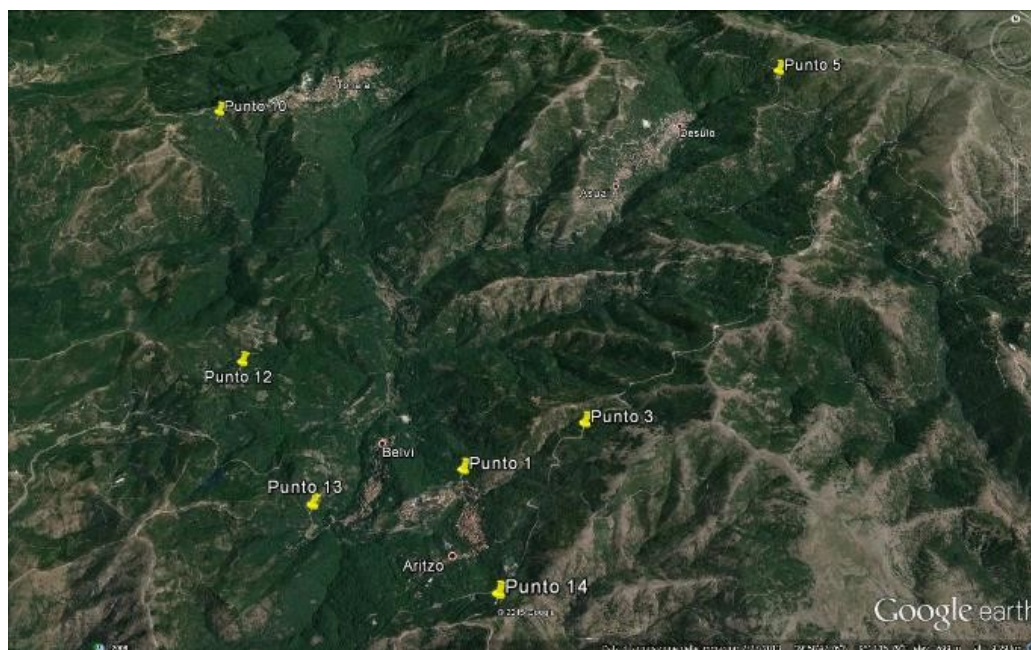


Figura 1. Siti di campionamento delle galle nel territorio della Barbagia di Belvì.

Con l'ausilio di un pennellino, tutti i parassitoidi (ed iperparassitoidi) venivano immediatamente e singolarmente immersi in alcool etilico al 95%, entro provette tipo Eppendorf opportunamente etichettate, in attesa di essere sottoposti ad analisi molecolare.

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Adulti determinati di riferimento

Gli individui adulti utilizzati per ottenere sequenze di confronto sono stati selezionati (tabella 2) tra quelli sfarfallati da galle del cinipide allevate in laboratorio e prelevate negli stessi siti di raccolta delle galle da cui sono state estratte le larve.

Questi individui sono stati determinati, su base morfologica, da un entomologo esperto ma non tassonomo specialista di Imenotteri Calcidoidei. Il determinatore ha potuto operare al massimo livello possibile di competenza “non specialistica” avendo potuto contare sui consigli e suggerimenti di uno specialista, oltre che sull’elenco delle specie sfarfallate dalle galle e su una parte di materiale di confronto correttamente determinato dallo stesso.



Figura 2. Interno della galla: pupa di parassitoide con sopra larva di iperparassitoide (in alto a sinistra), larva di parassitoide (in alto a destra), pupa di parassitoide (in basso a sinistra) nella cella accanto a quella di una pupa di *Dryocosmus kuriphilus* (in basso a destra).

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Analisi biomolecolari

Estrazione del DNA

Il DNA totale è stato estratto singolarmente da ciascun campione conservato in etanolo al 95% utilizzando il kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad) nel seguente modo: il campione è stato sciacquato in una provetta da 1,5 mL con 800 µL di acqua deionizzata sterile per 3 volte; omogeneizzato in 80 µl di resina Chelex del kit schiacciandolo con un puntale contro le pareti della provetta (Montero-Pau *et al.*, 2008); dopo aver aggiunto 5 µl di proteinasi K [20 mg/mL] è stato incubato per 60 min a 56°C e successivamente a 100°C per 8 min; dopo centrifugazione a 13.200 rpm per 5 min (Eppendorf 5415D), il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in una nuova provetta sterile da 1,5 mL e conservato a -20°C per le successive analisi.

Estrazione del DNA con metodo conservativo [adulti]

Al fine di evitare la distruzione degli insetti adulti di riferimento il DNA è stato estratto seguendo il protocollo gentilmente fornito dal Dott. Pasquale Cascone (Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, IPSP-CNR Napoli) tratto da Gebiola *et al.* (2009) modificato rispetto a Walsh *et al.* (1991). Il campione, prelevato dall'alcool al 95% in cui era conservato, è stato lasciato asciugare su carta 3MM quindi posizionato al fondo di una provetta sterile nella quale sono stati aggiunti 5 µl di proteinasi K [20 mg/mL]. Dopo centrifugazione a 13.200 rpm per 30 sec sono stati aggiunti 80 µl di resina Chelex del kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad). Il campione è stato incubato a 55°C per 60 min, successivamente a 100°C per 8 min e infine centrifugato a 13.200 rpm per 5 min. Il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in una nuova provetta sterile da 1,5 mL e conservato a -20°C per le successive analisi. L'esemplare adagiato sul fondo della provetta insieme alla resina Chelex è stato sciacquato con acqua deionizzata sterile e conservato in provette con etanolo al 95% per ulteriori analisi morfologiche.

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

L'amplificazione del gene citocromo *c* ossidasi I (COI) è stata eseguita in 25 µl di volume contenente circa 10 ng di DNA (1-2 µL); 2,5 µL di tampone 10X della polimerasi; 0,6 Unità di Taq DNA polimerasi ricombinante [5 U/µL] cioè 0,12 µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 2,5 mM Cloruro di Magnesio; 200 µM di ciascun desossiribonucleotide trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e 1 µM di ciascuno dei seguenti oligonucleotidi o primers (Folmer *et al.*, 1994) sintetizzati da Life Technologies:

(forward) LCO-1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

(reverse) HCO-2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

È stato usato un termociclatore PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ-Research) con il seguente programma: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min, seguita da 35 cicli di 30 sec a 94°C, 30 sec a 50°C e 40 sec a 72°C, con un ciclo finale di sintesi a 72°C per 10 min.

Gli amplificati sono stati analizzati in elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5% in TBE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) colorato con SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies). La corsa elettroforetica è stata effettuata a 5V/cm con cella elettroforetica Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) e alimentatore Power Pac 300 (Bio-Rad). Il gel è stato visualizzato e fotografato con un trans-illuminatore UV BioDoc-It™ Imaging System (UVP) collegato all'apparecchio Video Graphic Printer UP-890CE (Sony) per la stampa, su carta Sony type V (High Glossy) UPP-110 HG (110 mm x 18 mm).

Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento (dettagli nel paragrafo successivo "Protocollo sequenziamento") è stato eseguito direttamente sul prodotto di amplificazione purificato con Exosap (USB, Affimetrix, Cleveland, Ohio) e denaturato con HiDi™ Formamide (Applied Biosystems), usando ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABI, Foster City, CA, USA) ed il sequenziatore automatico ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems HITACHI). I cromatogrammi sono stati analizzati con il software BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999).

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Tabella 2. Elenco delle identificazioni morfologiche e corrispondente esito dell'analisi biomolecolare

Codice	ID morfologico	ID biomolecolare
1294	<i>Eurytoma brunniventris</i>	<i>Eurytoma longavena</i> [vedi]
333	<i>Eurytoma pistacina</i>	<i>Eurytoma</i> sp.
40	<i>Megastigmus almusiensis</i>	<i>Megastigmus almusiensis</i>
463	<i>Megastigmus dorsalis</i>	<i>Megastigmus</i> sp.
218	<i>Mesopolobus albitarsus</i>	<i>Mesopolobus albitarsus</i>
225	<i>Mesopolobus albitarsus</i>	<i>Mesopolobus tibialis</i>
926	<i>Mesopolobus amaenus</i>	<i>Mesopolobus lichtensteini</i>
1084	<i>Mesopolobus dubius</i>	<i>Mesopolobus mediterraneus</i>
973	<i>Mesopolobus lichtensteini</i>	<i>Mesopolobus lichtensteini</i>
957	<i>Mesopolobus mediterraneus</i>	<i>Mesopolobus lichtensteini</i>
881	<i>Mesopolobus sericeus</i>	<i>Mesopolobus sericeus</i> div aplotipo
854	<i>Mesopolobus tibialis</i>	<i>Mesopolobus tibialis</i>
1120	<i>Mesopolobus tibialis</i>	<i>Mesopolobus tibialis</i>
215	<i>Ormyrus nitidulus</i>	<i>Ormyrus nitidulus</i>
1093	<i>Ormyrus pomaceus</i>	<i>Ormyrus nitidulus</i>
1246	<i>Ormyrus wachtli</i>	<i>Ormyrus nitidulus</i>
138	<i>Sycophila biguttata</i>	<i>Sycophila biguttata</i>
126	<i>Sycophila iracemae</i>	<i>Sycophila biguttata</i> div aplotipo
1035	<i>Sycophila variegata</i>	<i>Sycophila</i> sp. [non <i>variegata</i>]
907	<i>Torymus auratus</i>	<i>Torymus auratus</i>
24	<i>Torymus flavipes</i>	<i>Torymus flavipes</i>
1176	<i>Torymus formosus?</i>	<i>Torymus</i> sp.
915	<i>Torymus formosus?</i>	<i>Torymus</i> sp.
302	<i>Torymus geranii</i>	<i>Torymus auratus</i>
984	<i>Torymus geranii</i>	<i>Torymus auratus</i>
1096	<i>Torymus roboris o nobilis?</i>	<i>Torymus</i> sp.

Protocollo di sequenziamento

Procedura

Purificazione dell'amplificato con EXOSAP:

In ghiaccio: 2 μ l di Exosap in ogni tubo da 0,2 mL

Centrifugare brevemente

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Aggiungere 5 μ l di amplificato

Miscelare con pipetta

Centrifugare brevemente

37° C per 15 min

80° C per 15 min

4° C ∞

Reazione di sequenziamento:

1 μ l di tampone 10x

1 μ l di primer 1,7 μ M (8,5 μ l del primer HCO-2198 10 μ M e
41,5 μ l di acqua deionizzata sterile)

1 μ l di BigDye v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied
Biosystems, ABI, Foster City, CA, USA)

Aggiungere 3 μ l di miscela ai 7 μ l di amplificato purificato con
Exosap

Centrifugare brevemente

96° C per 10 sec

49° C per 5 sec (si usa un grado in meno della
temperatura di annealing)

60° C per 2 min

Ripetere 25 volte

4° C ∞

Purificazione della reazione in piastra Sephadex:

Posizionare la piastra Sephadex su una con bordi e una senza
bordi usate, bloccandole con adesivo;

Centrifugare a 1700 rpm per 1 min;

Eliminare il liquido dalla piastra di raccolta;

Centrifugare a 1700 rpm per 1 min per asciugare la piastra;

Inserire una nuova piastra in polycarbonato senza bordi
(eventualmente ritagliarla e usare gli spaziatori) sulla
piastra di raccolta;

Aggiungere a ciascun pozzetto 10 μ l di reazione;

Centrifugare a 1700 rpm per 2 min.

Denaturazione della reazione purificata con Hi-Di formammide:

Trasferire i 10 µl delle reazioni purificate con Sephadex in una piastra con bordi per il sequenziamento nella quale sono stati precedentemente messi in ciascun pozzetto 10 µl di formammide scongelata.

Centrifugare brevemente a 1700 rpm

95° C per 2 min

4° C ∞

Sequenziamento automatico:

Per l'analisi dei frammenti di DNA le reazioni di sequenziamento vengono sottoposte ad elettroforesi capillare mediante il sequenziatore Abi Prism 3130xl Genetic Analyzer Applied Biosystems HITACHI a 16 capillari che utilizza il software ABI PRISM® 3100 Data Collection. Alla fine delle corse le sequenze vengono analizzate con il programma Sequencing Analysis Software v5.2.

Materiali utilizzati

3743 Corning Costar Tappi per 0,2 ml 1x8 strisce

3741 Corning Costar strisce 0,2 ml 1x8 tubi

4337450 Applied Biosystems BigDyeTerm v1.1 CycleSeq Kit,
100 reazioni (Applied Biosystems)

US78201 ExoSAP-IT for PCR Product Clean-Up 1 mL 500
reazioni (Affymetrics)

MSHVN4550 piastre Multiscreen HTS, HV, 0,45 µm,
trasparenti, non sterili (Merck Millipore)

17-0573-02 GE Health Sephadex G-50 Fine DNA Grade 100 g
(GE Healthcare Life Sciences)

6509 Thermowell® 96 Well Polycarbonate PCR Microplate,
Model P, Nonsterile, piastre senza bordi (Corning)

4311320 Hi-Di™ Formamide Genetic Analysis Grade 25 ml
(Applied Biosystems)

Angela Schiaffino

N8010560 MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (con bordi), 10 pezzi (Applied Biosystems)

4363929 POP-7™ Polymer for 3730/3730xl DNA Analyzers, 28 mL (Applied Biosystems)

4335613 3730 Running Buffer (10X) con EDTA, 500 mL (Applied Biosystems)

Strumentazioni

Centrifuga per piastre da 96 pozzetti Modello 5804 R (Eppendorf)

Sequenziatore a 16 capillari Abi Prism 3130xl Genetic Analyzer Applied Biosystems HITACHI

Pipettatrice multicanale n. 8 canali da 3-300 µL 3122000051 (Eppendorf)

Pipettatrice multicanale n. 8 canali da 0,5-10 µL 3122000019 (Eppendorf)

Identificazione delle sequenze COI

Con il pacchetto software Blast v. 2.2.31 (Altschul *et al.*, 1990), su base Linux, scaricato dal sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/run-blast-local/>) e installato su un computer locale sono stati creati due database locali (makeblastdb), uno contenente tutte le sequenze ottenute dal materiale estratto dalle galle, ed uno contenente le sequenze con identificazione specifica nota provenienti o da GenBank (Benson *et al.*, 2013) o ottenute da individui identificati morfologicamente nell'ambito di questo lavoro, in formato FASTA.

Il database di sequenze da identificare è stato poi sottoposto a query contro il database di quelle identificate, utilizzando il pacchetto blastn del software citato. Si è ottenuto così un file CSV contenente diversi parametri e statistiche del confronto tra sequenze del file di query e del file di database.

Per ciascuna delle sequenze identificate contenute nel secondo database sono stati così ottenuti dei valori di somiglianza con le sequenze non identificate. Tutte le sequenze con Hit Score superiore ad un valore soglia variabile secondo i taxa ma comunque situate intorno al 90,0% sono state

attribuite al genere di riferimento, se superiori al 97,5% provvisoriamente attribuite alla specie della sequenza di riferimento.

Un numero limitato di sequenze incerte sono state singolarmente sottoposte a query tramite BLAST on-line, utilizzando il database di Genbank. Di queste, alcune sono risultate appartenere a gruppi tassonomici diversi, altre sono risultate troppo corte per dare risultati significativi ed affidabili e sono state eliminate.

Al fine di valutare in modo più preciso anche le sequenze attribuite solo ad un genere ma non ad una singola specie, sono state eseguite delle analisi filogenetiche per tutte le sequenze appartenenti ad uno dei generi rinvenuti. Per ogni genere ottenuto, si è proceduto nel modo seguente.

A) Degli input file in formato FASTA sono stati impostati unendo le sequenze dei parassitoidi identificate tramite il metodo del blast locale, le sequenze degli adulti congenerici identificate in laboratorio e le sequenze presenti in GenBank di specie congeneriche.

B) Gli input file sono stati allineati tramite l'algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) implementato nel programma Mega v. 6 (Tamura *et al.*, 2013) e salvate nuovamente in formato FASTA. Successivamente, le sequenze sono state compresse in aplotipi identici utilizzando il software DAMBE v. 5 (Xia, 2013) e la piattaforma online di conversione di input file genetici ALTER (Glez-Peña *et al.*, 2010).

C) Gli input file FASTA contenenti gli aplotipi sono stati convertite in formato Phylip (.phy) tramite l'utilizzo della piattaforma online di conversione di input file genetici ALTER (Glez-Peña *et al.*, 2010) compatibile con il programma di inferenza filogenetica.

I filogrammi sono stati costruiti utilizzando il programma PhyML (Guindon *et al.*, 2010) implementato nella piattaforma online ATCG dell'Istituto Nazionale Francese di Bioinformatica (IFB; <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Il programma costruisce alberi filogenetici utilizzando l'algoritmo di Massima Verosimiglianza (Maximum Likelihood; ML). I modelli di evoluzione molecolare per ogni albero sono stati calcolati utilizzando il metodo Smart Model Selection (SMS) implementato nel

programma in versione Beta. Gli alberi prodotti hanno, come supporto statistico, una trasformazione bayesiana del test di massima verosimiglianza (Bayesian-like transformation of approximate likelihood Ratio Test - aBayes), una sistema rapido efficiente ed affidabile di verificare il supporto statistico nei filogrammi di massima verosimiglianza, implementato nel software PhyML (Anisimova *et al.*, 2011). Gli alberi prodotti dal programma, in formato newick, sono stati elaborati ed editati per la pubblicazione in tesi tramite il software FigTree v. 1.4. (Rambaut *et Drummond*, 2004). Ulteriori modifiche sono state apportate agli output grafici tramite il software Corel Draw v. X.

RISULTATI

Dati generali

Campioni raccolti e analizzati

Complessivamente sono stati raccolti 2.811 campioni di parassitoidi (410 nel 2012, 567 nel 2013 e 1.834 nel 2014), di questi 2.379, pari al 84,6%, sono stati analizzati. La percentuale di campioni non analizzati è rappresentata da larve troppo piccole per essere sottoposte alle metodiche di estrazione adottate (171 pari al 6,1% del totale) o da materiale danneggiato o smarrito (261 pari al 9,3% del totale).

Analisi riuscite

L'analisi biomolecolare completa (estrazione, amplificazione, sequenziamento) è riuscita su 1.539 campioni pari al 64,7% del totale. Le analisi venivano eseguite, in relazione alla strumentazione disponibile, in "batterie" di 12 campioni. La distribuzione degli insuccessi all'interno delle 214 batterie "complete" (con tutti i 12 campioni presenti) corrisponde sufficientemente bene ad una distribuzione di Poisson [quando la media risulta più o meno pari alla varianza, si può ragionevolmente supporre che la distribuzione si riferisca al modello casuale di Poisson (Scossiroli *et al.*, 1974)]. Questo sembra comportare che gli insuccessi siano dovuti ad errori casuali e non sistematici e che quindi i dati non vengano distorti.

Determinazioni riuscite

Una identificazione specifica è stata possibile per 1.502 delle 1.539 sequenze ottenute. Le rimanenti 37 sono risultate o appartenenti a *Dryocosmus kuriphilus*, o troppo corte (problemi di sequenziamento dovuti a debole amplificazione) o inquinate da DNA di altri organismi, per lo più Rickettsiaceae del genere *Wolbachia*.

Identificazioni ed elenco delle specie

In tabella 2 sono comparate le determinazioni di pochi adulti selezionati eseguite su base morfologica con le risultanze biomolecolari. Non trattandosi di un campione statistico – lo scopo era quello di ottenere materiale di confronto “biomolecolare” per la determinazione delle larve – non è possibile quantificare la percentuale di errore, ma sicuramente questa è risultata estremamente alta, in particolare nel genere *Mesopolobus* ricco di specie.



Figura 3. *Eupelmus azureus*: femmina a sinistra, maschio a destra.

Genere Eupelmus (Eupelmidae) [72 esemplari sequenziati] (figura 3)

Grazie ad una recente revisione (Al Khatib *et al.*, 2014, 2015) del cosiddetto complesso “*urozonus*” di questo genere, le sequenze COI di quasi tutte le specie di nostro interesse sono disponibili in GenBank meno una (*E.*

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

stenozonus). Non è quindi stato necessario utilizzare per le identificazioni sequenze di adulti identificati morfologicamente.

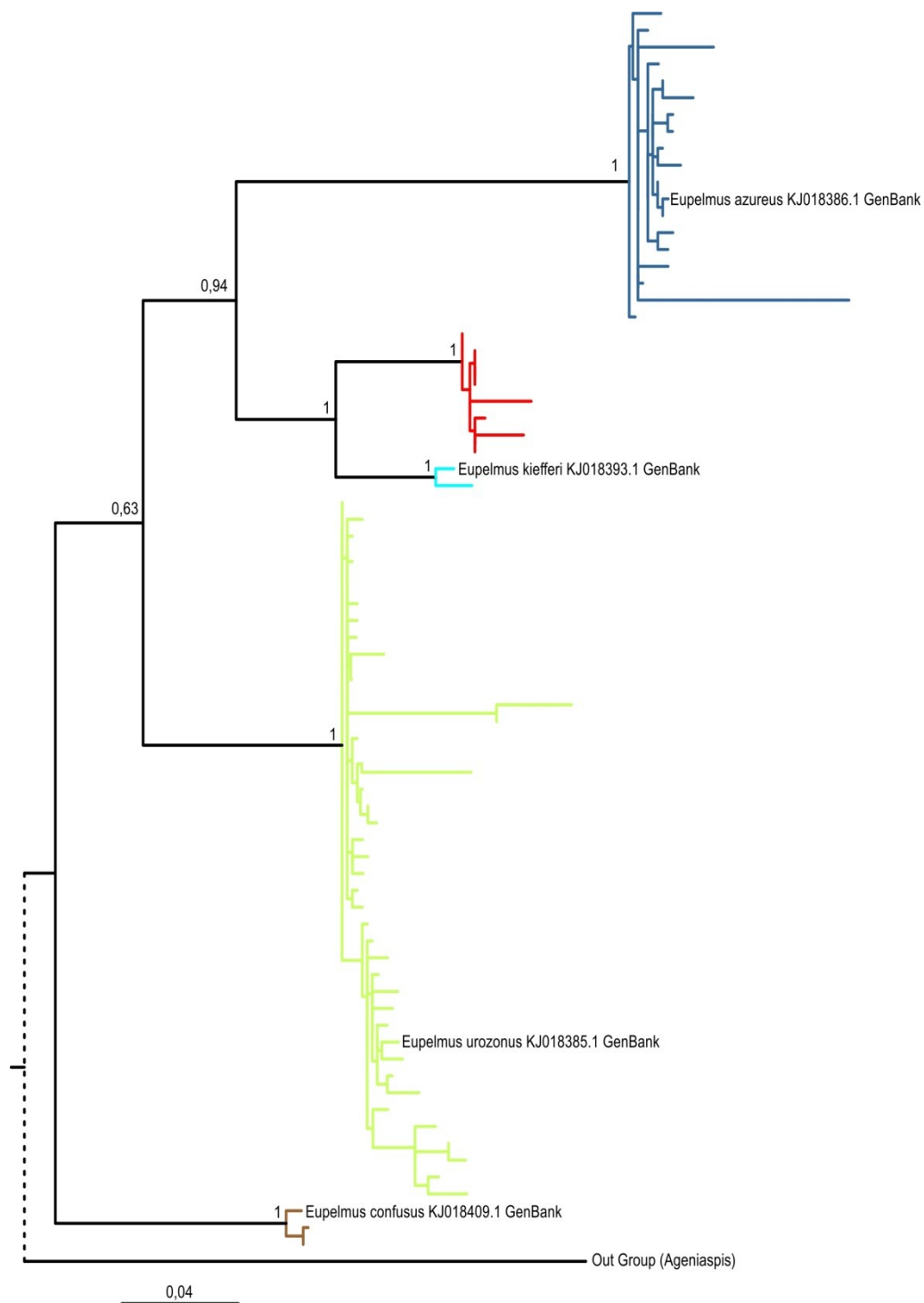


Figura 4. Genere *Eupelmus*, filogramma. Etichette dei soli esemplari adulti. Inserito solo un campione di sequenze per le specie più abbondanti.

Le specie individuate in queste ricerche sono 5 (figura 4). *E. urozonus* [45 es] risulta sicuramente la più abbondante, seguita da *E. azureus* [18 es]. Mentre è stato rinvenuto un solo esemplare di *E. kiefferi* e due di *E. confusus*. Infine dieci esemplari sono risultati appartenere a una quinta specie non identificata. Al momento non è possibile stabilire se questa possa essere proprio *E. stenozonus* di cui non sono al momento note sequenze COI.

Genere Eurytoma (Eurytomidae) [40 esemplari sequenziati] (figura 5)

Le specie di *Eurytoma* individuate con l'analisi delle sequenze COI sono tre, contro le due individuate morfologicamente (figura 6). Queste ultime sono *E. pistacina*, di cui però non sono stati rinvenuti esemplari entro le galle esaminate, ed *E. brunniventris* che, oltre a 6 soli esemplari da galle, ben corrisponde al neartico *E. longavena* (ponendo un interessante problema di sinonimie).



Figura 5. *Eurytoma brunniventris*: femmina a sinistra, maschio a destra.

La maggioranza degli esemplari provenienti dalle galle [34 es] risultano però formare una branca autonoma dell'albero entro la quale non si posiziona alcuna sequenza nota in GenBank o proveniente dagli adulti identificati morfologicamente. Evidentemente siamo di fronte ad un'ulteriore specie che andrà caratterizzata con ricerche future.

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

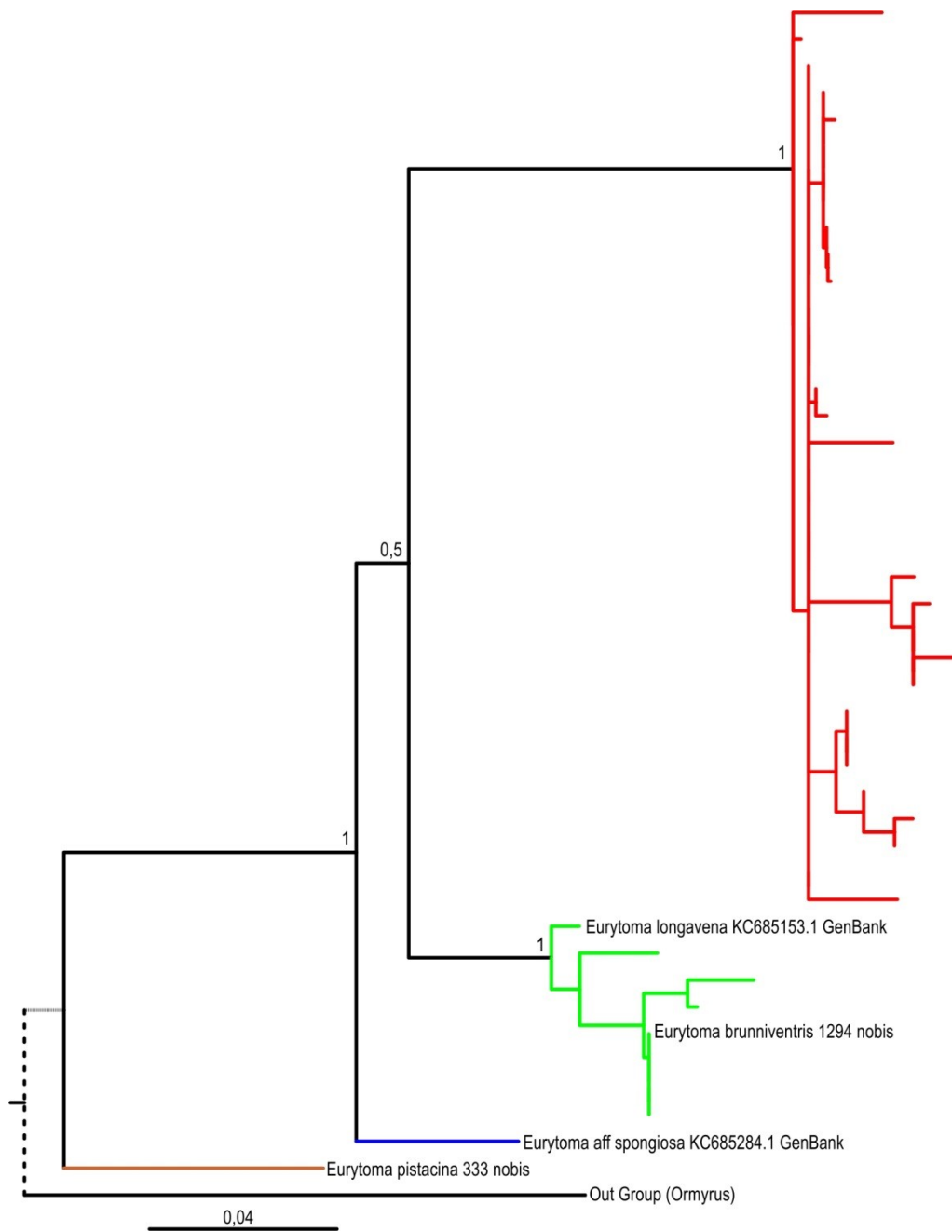


Figura 6. Genere *Eurytoma*, filogramma. Etichette dei soli esemplari adulti. Inserito solo un campione di sequenze per le specie più abbondanti.

Genere Sycophila (Eurytomidae) [132 esemplari sequenziati] (figura 7)

Le identificazioni delle poche specie di *Sycophila* rinvenute hanno posto un ampio campionario di problematiche (figura 8).



Figura 7. Femmine di *Sycophila variegata*, a sinistra, e *S. biguttata*, a destra.

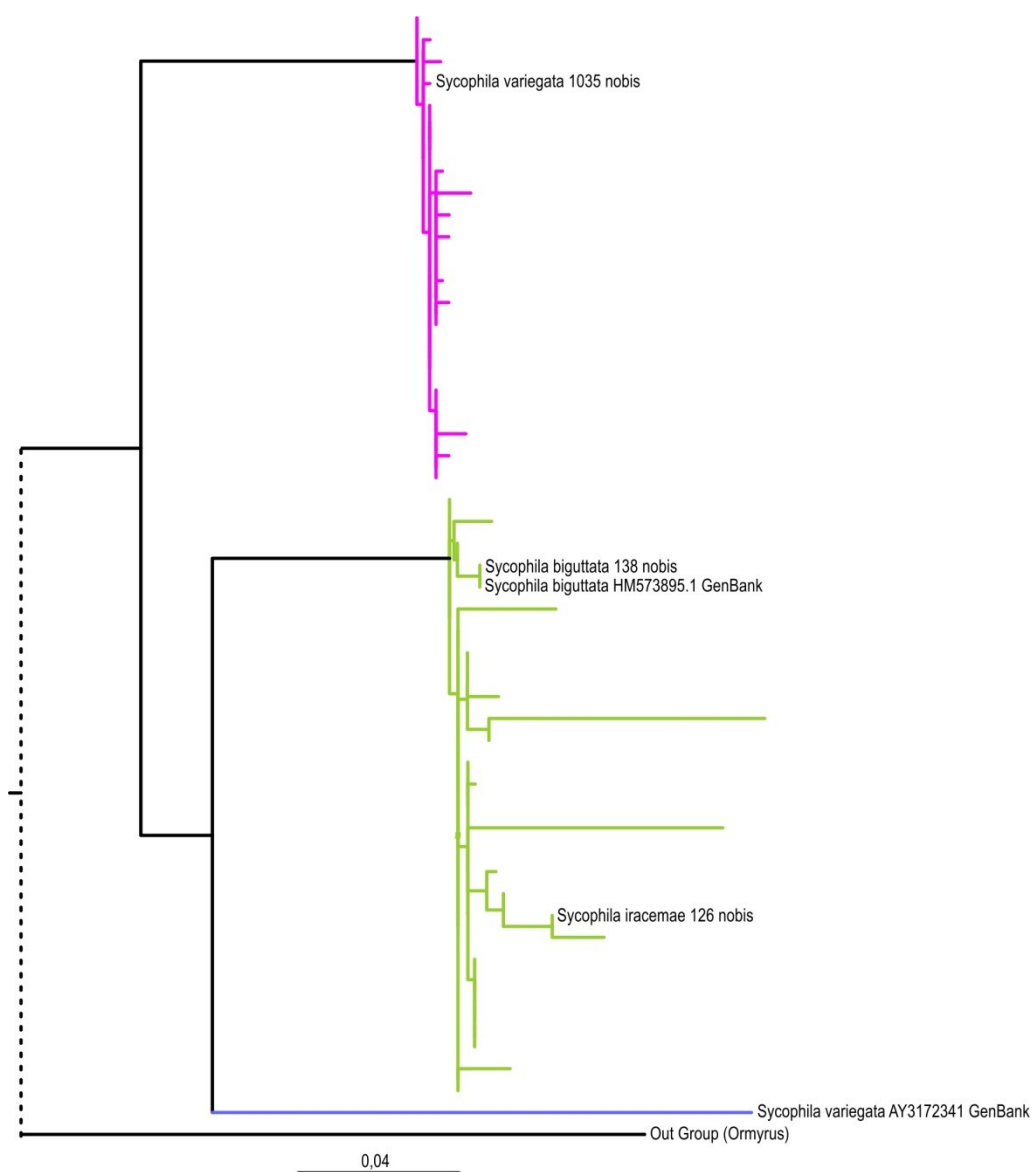


Figura 8. Genere *Eurytoma*, filogramma. Etichette dei soli esemplari adulti. Inserito solo un campione di sequenze per le specie più abbondanti.

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

La maggioranza degli individui estratti dalle galle [106 es] corrispondono all'adulto da noi determinato con *S. variegata*, ma la sequenza attribuita a *S. variegata* su GenBank risulta ben diversa e filogeneticamente distante. La rimanente parte di esemplari corrispondono a *S. biguttata* [26 es], in questo caso con corrispondenza tra adulto da noi determinato e sequenza in GenBank. Invece l'adulto determinato come *S. iracemae* è risultato anch'esso

Genere Mesopolobus (Pteromalidae) [237 esemplari sequenziati] (figura 9)

Nonostante i diversi *Mesopolobus* rappresentino una quota essenziale delle biocenosi di parassitoidi delle galle e delle mine, in cui entrano con molte specie alcune delle quali particolarmente abbondanti, la loro identificazione risulta assai problematica. L'entomologo non specialista (ed in parte anche lo specialista) deve basare le proprie identificazioni su base morfologica utilizzando chiavi non aggiornate e non affidabili, mentre una identificazione su base biomolecolare si scontra con un database scarno in numero di specie e non sempre sicuro come identificazioni.



Figura 9. *Mesopolobus tibialis*: femmina a sinistra, maschio a destra.

Il quadro ottenuto con queste ricerche (figura 10) è infatti particolarmente complesso. La sola super-abbondante specie *M. tibialis* [200 es] sembra porre pochi problemi di identificazione: nell'albero filogenetico prodotto il clade corrispondente a questa specie è ben individuato e gli aplotipi che lo compongono, pur numerosissimi, sono raggruppati in modo molto

omogeneo. Questo anche se solo due dei tre esemplari adulti appartenenti a questa specie sono stati correttamente determinati. Ben diversa è la situazione degli esemplari riferibili a *M. sericeus* [30 es]. In questo caso i diversi aplotipi si raggruppano in due gruppi principali, uno contenente solo due individui provenienti da queste ricerche e la sequenza di *M. sericeus* depositata in GenBank. Il secondo, a sua volta suddiviso in tre rami, contenente la sequenza dell'adulto qui determinato come *M. sericeus*. Se ci si trovi di fronte ad una specie estremamente variabile o ad una serie di specie gemelle dovrà giocoforza essere tema di ulteriori ricerche.

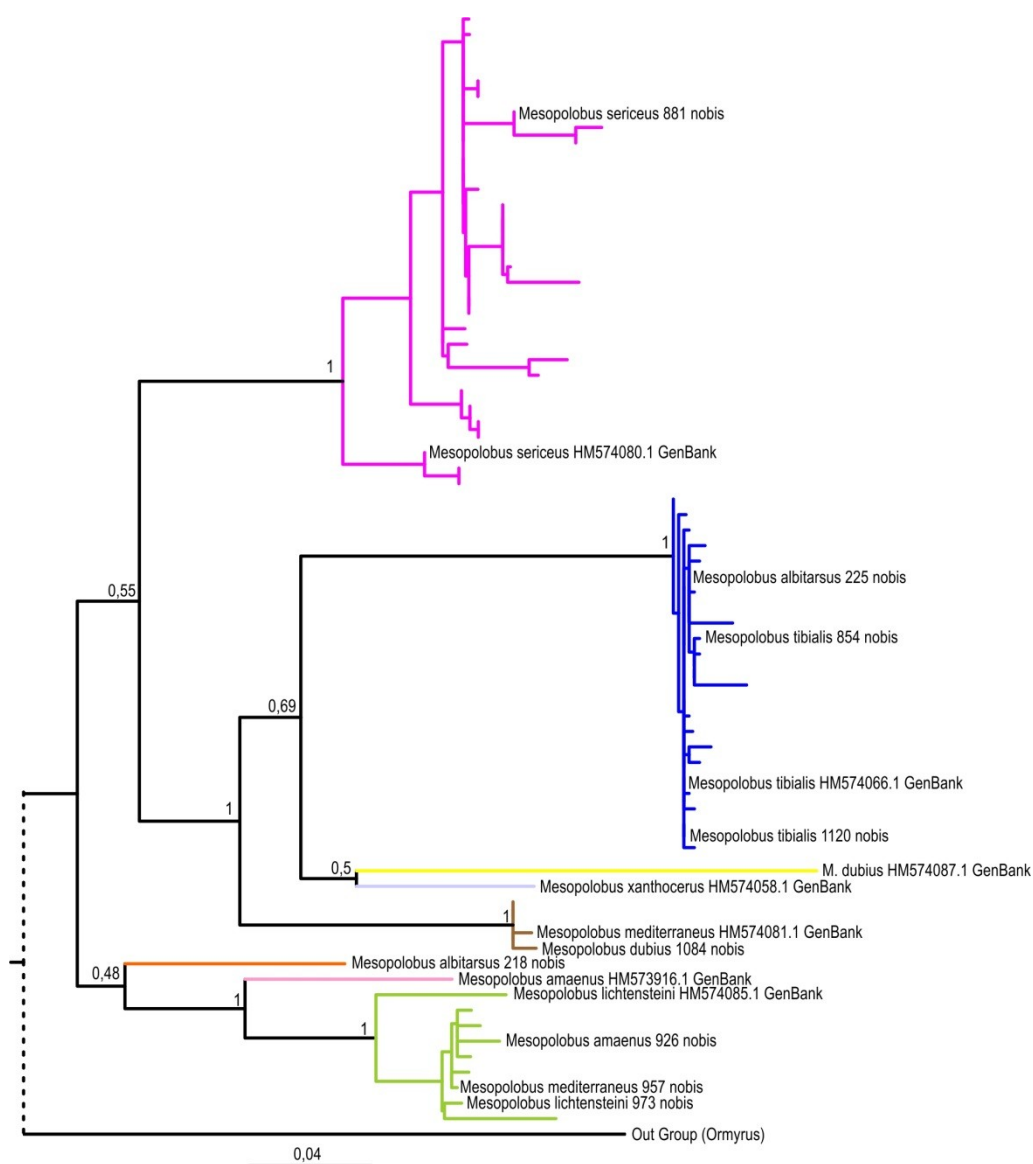


Figura 10. Genere *Mesopolobus*, filogramma. Etichette dei soli esemplari adulti. Inserito solo un campione di sequenze per le specie più abbondanti.

Angela Schiaffino

Uso di tecniche di identificazione molecolare nello studio dei parassitoidi del cinipide galligeno del castagno
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Ma anche per le rimanenti specie, meno rappresentate nel campione, la situazione è particolarmente intricata. Due larve hanno prodotto sequenze simili all'adulto qui determinato come *M. dubius* e ad un *M. mediterraneus* depositato in GenBank. La sequenza di *M. dubius* presente in GenBank ha destino proprio. Uno dei due adulti determinati qui come *M. albitarsus* non corrisponde ad alcun esemplare estratto dalle galle né ad altre sequenze note (tra le quali non è presente quella di *M. albitarsus*). Tre adulti attribuiti a tre diverse specie (*M. lichtensteini*, *M. amaenus*, *M. mediterraneus*) vengono raggruppati insieme ad alcune larve [5 es] ed a *M. lichtensteini* presente in GenBank. Mentre sia *M. amaenus* che *M. mediterraneus* (come abbiamo già visto) presenti in GenBank risultano ben differenziati.

Genere Ormyrus (Ormyridae) [74 esemplari sequenziati] (figura 11)

La situazione tassonomica di questo genere sembra particolarmente intricata per la grande variabilità genetica delle sue popolazioni e/o per una ancora mal definita delimitazione delle diverse specie. Fatto sta che anche se gli esemplari estratti dalle galle si posizionano in tre gruppi tra loro ben definiti, non sembra altrettanto semplice attribuire loro un nome (figura 12).



Figura 11. Femmine di *Ormyrus pomaceus*, a sinistra, e *Or. nitidulus*, a destra.

Il gruppo di esemplari più numeroso [49 es], pur all'interno di una grande variabilità genetica, corrisponde ad una delle sequenze presenti in GenBank attribuita a *O. pomaceus*, ma a nessuno degli adulti da noi

determinati. Mentre un altro singolo esemplare corrisponde ad una sequenza totalmente differente, sempre attribuita ad *O. pomaceus* presente in GenBank.

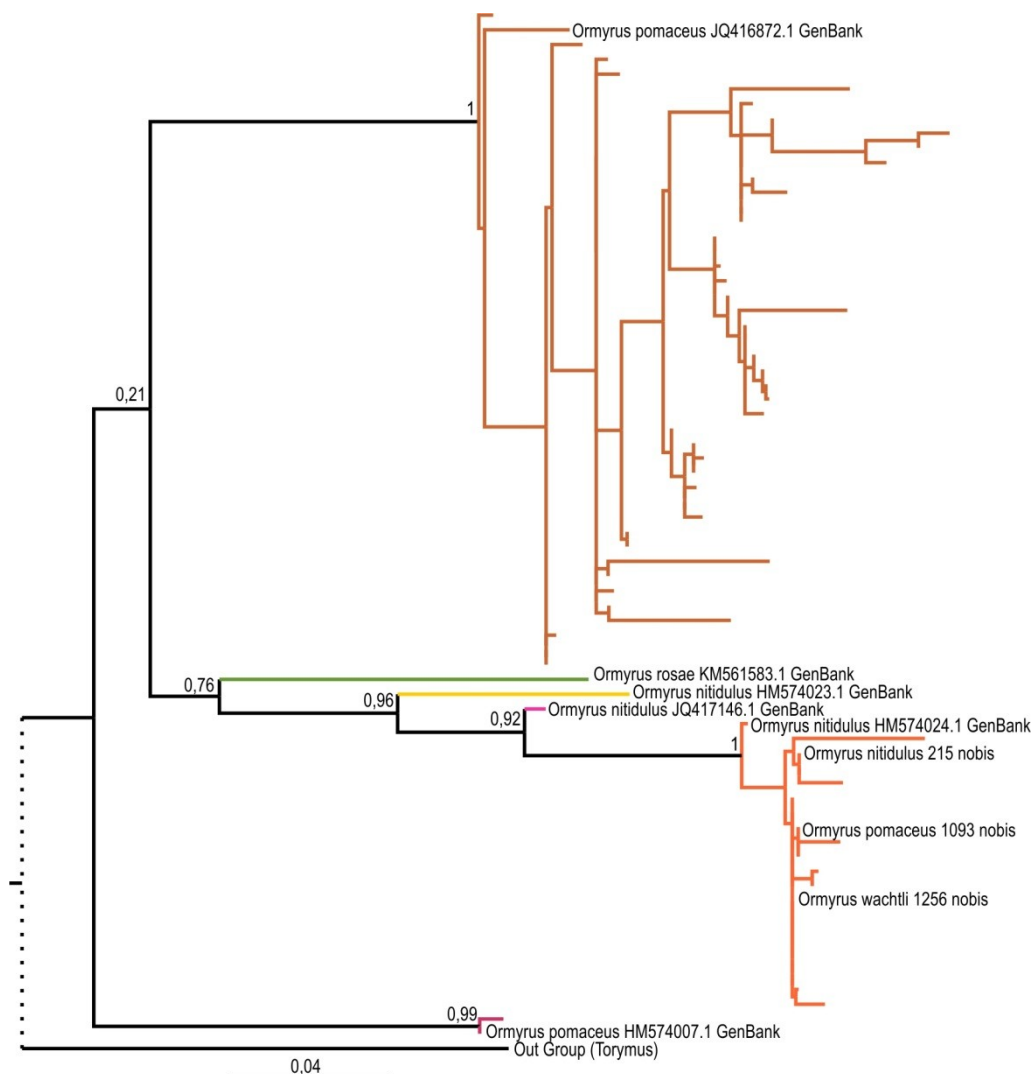


Figura 12. Genere *Ormyrus*, filogramma. Etichette dei soli esemplari adulti. Inserito solo un campione di sequenze per le specie più abbondanti.

Le sequenze rimanenti [24 es] corrispondono a quelle dei tre adulti da noi determinati sotto i nomi di *O. pomaceus*, *O. wachtli* e *O. nitidulus*. Tutte queste sono simili a una sequenza attribuita a quest'ultima specie presente su GenBank. Altre sequenze di GenBank, riferite a *O. nitidulus*, sembrano ben differenziate sia pur filogeneticamente vicine a queste.

Genere *Megastigmus* (*Torymidae*) [19 esemplari sequenziati] (figura 13)

Pur nell'ambito di una o due specie, anche nel genere *Megastigmus* troviamo una situazione intricata nell'interpretazione tassonomica delle sequenze COI (figura 14).



Figura 13. *Megastigmus dorsalis* femmina.

Infatti gli esemplari prelevati dalle galle, gli adulti determinati da noi e le sequenze da GenBank pur appartenendo nominalmente quasi esclusivamente ad una sola specie si raggruppano in almeno 2 gruppi dei quali: il primo e più numeroso [16 es] si divide a sua volta in tre rami contenenti rispettivamente le sequenze dei due adulti da noi determinati come *M. dorsalis* e *M. almusiensis*, e una ciascuna di due sequenze in GenBank attribuite a *M. dorsalis*. Una terza sequenza attribuita in GenBank a *M. dorsalis* rientra nella seconda branca principale dell'albero con pochi [3 es] esemplari provenienti dalle galle. Una quarta specie, *M. stigmatizans*, inserita da GenBank solo per confronto forma un ramo esterno ai gruppi contenenti le diverse sequenze di *M. dorsalis*.

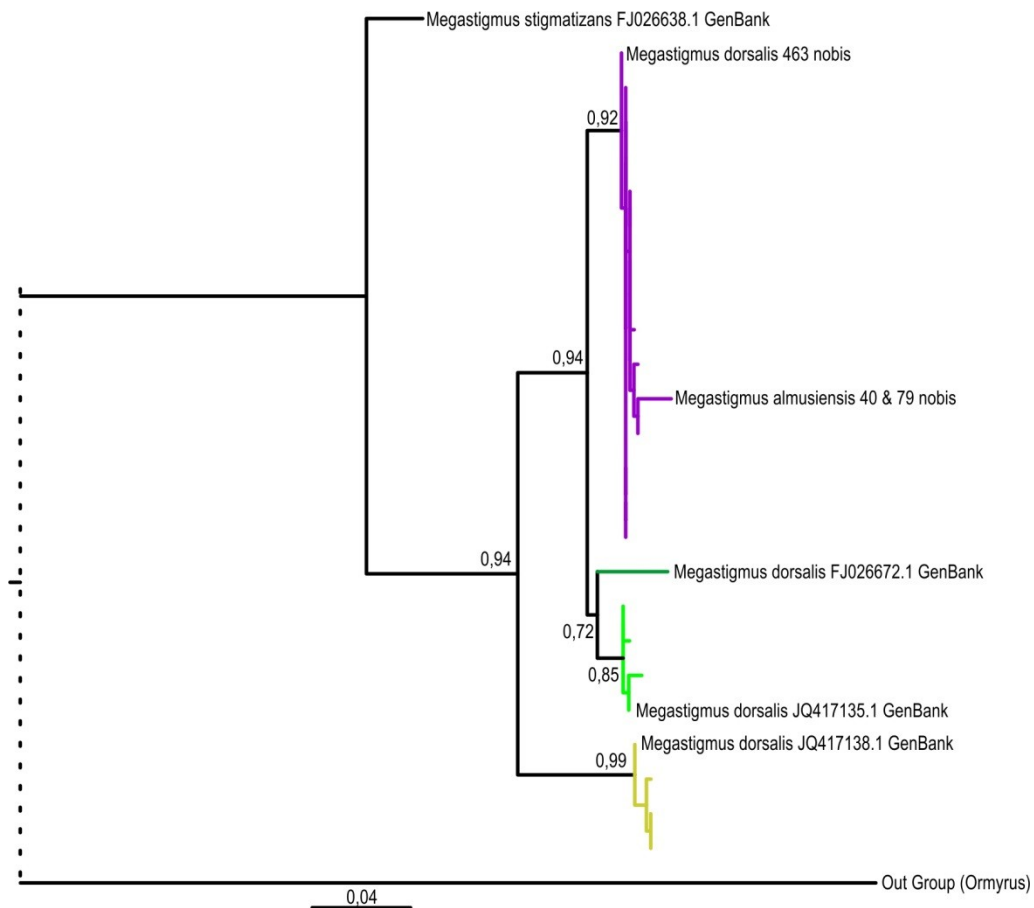


Figura 14. Genere *Megastigmus*, filogramma. Etichette dei soli esemplari adulti. Inserito solo un campione di sequenze per le specie più abbondanti.

Genere *Torymus* (*Torymidae*) [924 esemplari sequenziati] (figura 15)

Quasi i due terzi degli esemplari estratti dalle galle appartenevano a questo genere, di gran lunga il più abbondante (figura 16). A sua volta *T. auratus* è risultata la specie più abbondante [439 es]. Mentre abbondanze simili presentano *T. flavipes* [256 es] e *T. sinensis* [202 es].

Dal punto di vista tassonomico non sono stati rilevati particolari problemi per *T. auratus* che ha mostrato anche una buona omogeneità genetica. Scarsa variabilità comune anche a *T. flavipes* specie che però registra la presenza di un taxon gemello [7 es], situazione per altro già nota (Kartinen *et al.*, 2010).

Assai interessante invece il risultato relativo a *T. sinensis* che è presente con due gruppi di aplotipi ben differenziati, dei quali uno riferibile a *T.*

beneficus, specie giapponese con la quale probabilmente è avvenuta una ibridazione in passato.



Figura 15. *Torymus auratus* femmina in alto a sinistra, *Torymus sp.* maschio in alto a destra, *Torymus sinensis* femmina in basso a sinistra e *Torymus flavipes* femmina in basso a destra.

Riguardo alle specie più rare gli adulti da noi identificati come *T. geranii* sono risultati identici a *T. auratus*, mentre la sequenza di *T. geranii* presente in GenBank è ben differenziata. I tre adulti dubitativamente identificati come *T. formosus* e *T. roboris aut nobilis* sono risultati simili tra loro, ben differenziati da tutte le specie presenti in GenBank e non riferibili ad alcun esemplare estratto dalle galle.

Infine non siamo riusciti ad attribuire alcuna specie ad un relativamente piccolo gruppo di esemplari [20 es], piuttosto variabile geneticamente.

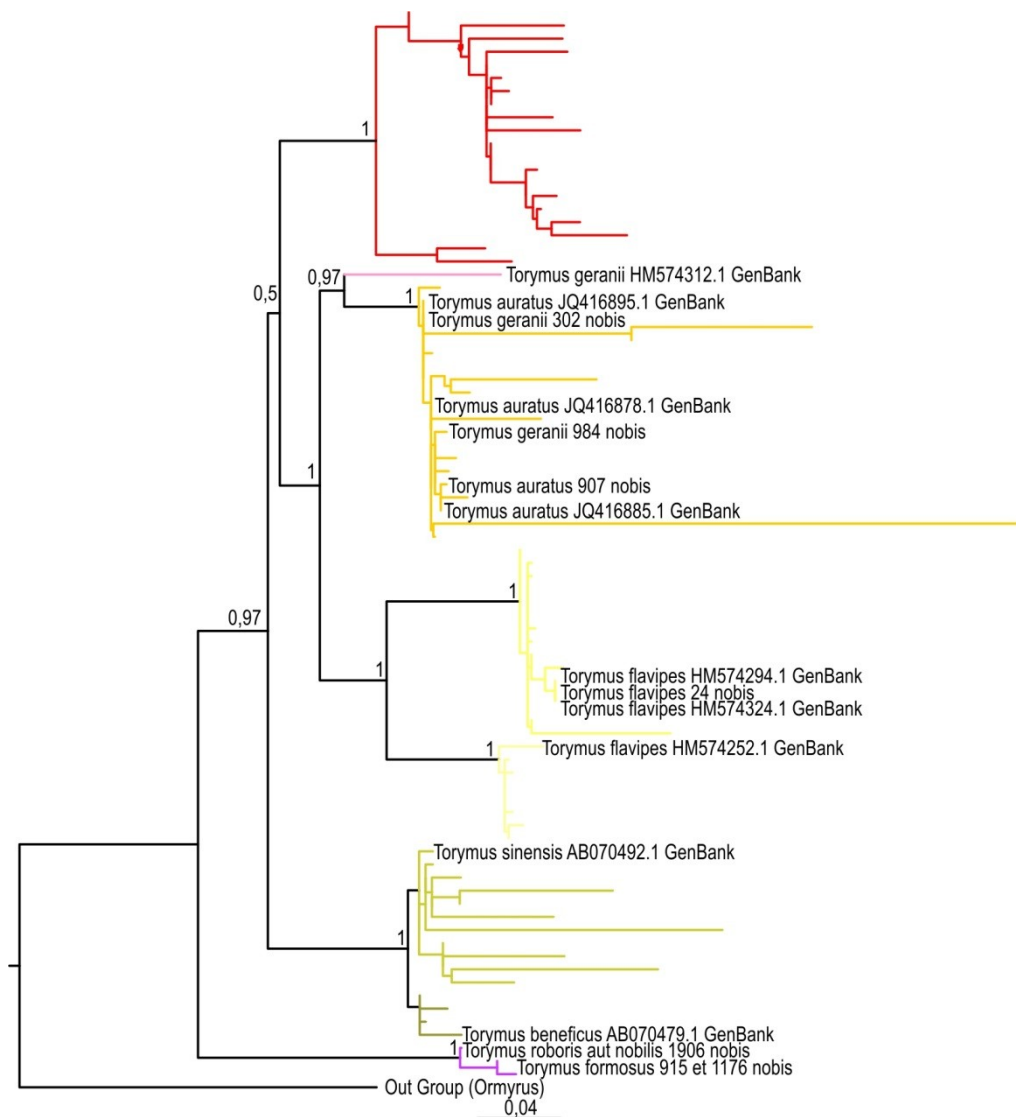


Figura 16. Genere *Torymus*, filogramma. Etichette dei soli esemplari adulti. Inserito solo un campione di sequenze per le specie più abbondanti.

DISCUSSIONE

L'applicazione di una metodologia di identificazione biomolecolare (DNA barcoding), apparentemente di routine, al materiale raccolto per indagini ecologiche poteva sembrare ad un esame preliminare una ricerca priva di interesse. Le condizioni iniziali per un suo impiego teoricamente scevro da problemi erano infatti tutte soddisfatte. Infatti, oltre alle necessarie attrezzature e ai moderni laboratori che le ospitavano, si stavano mettendo in campo sia le adeguate competenze nell'esecuzione delle analisi sia in quelle entomologiche per la determinazione del materiale di confronto. Si possedeva un elenco di specie validato da uno stimato specialista, vi era una collezione di riferimento dalla quale estrarre il DNA e sequenziare il frammento necessario, si poteva contare non solo su tutte le chiavi di identificazione disponibili ma anche su anticipazioni ed informazioni sulle novità in corso di pubblicazione. Insomma vi erano le migliori condizioni affinché un entomologo con una certa esperienza tassonomica potesse tranquillamente porsi all'opera.

La realtà non ha completamente smentito questo quadro positivo ma ha portato alla luce numerosi problemi che, più che ostacolare l'esecuzione di questa e di future ricerche ecologiche, ha aperto scenari conoscitivi di cui sarà assolutamente necessario tener conto in futuro. Se da un lato le identificazioni su base morfologica non si sono dimostrate del tutto affidabili, se non sottoposte alle esperte valutazioni dell'entomologo specialista, anche il barcoding mostra limiti non facilmente superabili in applicazioni routinarie.

Di seguito si tenterà di dar conto dei problemi riscontrati.

Difficoltà nell'identificazione morfologica

L'identificazione morfologica non è sempre possibile. Per ogni gruppo tassonomico vengono utilizzati, si può dire "tradizionalmente", determinati caratteri presenti su determinati stadi vitali. Nella maggioranza dei casi negli insetti è possibile identificare, ad esempio, solo gli adulti. Nei pochi gruppi in

cui esistono studi sulle differenze morfologiche tra larve le informazioni sono limitate, per lo più, a larve mature.

Ma anche quando si ha a che fare con il “giusto” stadio vitale i problemi non si esauriscono. Chiunque abbia un minimo di esperienza sa quali difficoltà si possono incontrare ad utilizzare, ad esempio, le chiavi dicotomiche per le determinazioni di alcuni gruppi di insetti. Oltre alle difficoltà terminologiche, vi sono enormi problemi interpretativi e altrettanto enormi problemi di variabilità intraspecifica dei caratteri. La “chiave” è spesso un ausilio a chi abbia già acquisito una certa esperienza sul taxon considerato e/o possieda una collezione di riferimento correttamente determinata.

Gli errori evidenziati nella tabella 2 sono il chiaro segnale di queste difficoltà sia pure all’interno di un gruppo estremamente complesso con numerose specie molto prossime morfologicamente una all’altra.

Difficoltà nell’identificazione tramite barcoding

L’ottenimento di una buona sequenza COI non garantisce una rapida e decisiva identificazione specifica. Ben altre condizioni devono contemporaneamente avverarsi.

Problemi legati all’identificazione del materiale di partenza

La prima condizione è conoscere altre sequenze COI sicuramente attribuite a quella specie e possibilmente già presenti in GenBank (anche se questo non è strettamente indispensabile). Nonostante che i parassitoidi di insetti galligeni e minatori siano stati recentemente fatti oggetto di numerose pubblicazioni di ampio respiro, nel nostro piccolo campione abbiamo riscontrato almeno 6 specie senza alcun riferimento in GenBank. Questa ovviamente è una limitazione inevitabilmente destinata ad affievolirsi col passare del tempo.

Ma mentre l’assenza di sequenze attribuite ad una specie tenderà a diminuire non vi è, e probabilmente non vi potrà neppure essere, alcuna garanzia che non aumentino le sequenze non correttamente attribuite. Questo è

un grave problema legato all'identificazione morfologica del materiale di partenza.

Problemi legati alla presenza di specie gemelle o di gruppi di specie criptiche

Il DNA barcoding può essere uno strumento utilissimo nel discriminare specie gemelle o gruppi di specie criptiche, ma la condizione necessaria è che vi siano studi di approfondimento che validino le differenze nelle sequenze COI come rappresentative di specie diverse.

Una differenza tra due sequenze che superi il 2,5/3% di differenziazione normalmente sta ad indicare che si è in presenza di specie diverse, ma ciò non sempre è vero variando la cosa tra taxa diversi o in presenza di specie particolarmente variabili. Di difficile interpretazione è ad esempio quanto riscontrato in queste ricerche con *Mesopolobus sericeus*. Se si sia in presenza di numerose specie criptiche o di una sola specie assai variabile, come abbiamo tentativamente ipotizzato, sarà risposta demandata a futuri studi.

Ma anche casi con differenze maggiori possono far concludere erroneamente si tratti di specie diverse e solo in pochi casi, con ricerche specifiche a monte, si può affermare il contrario (si veda paragrafo successivo).

Problemi legati alla cosiddetta “cattura del mitocondrio”

Una sempre più ampia bibliografia testimonia di come fenomeni di ibridazione locale possano portare ad introgressione di pool genici tra specie diverse e al fenomeno della “cattura del mitocondrio”. In parole poverissime avviene che la specie A (maschio) si ibridi con la specie B (femmina). La prole ibrida può essere in grado di riaccoppiarsi con una delle due specie parentali (backcrossing) e se, in particolare, una femmina ibrida si riaccoppia con un maschio della specie parentale A può, attraverso una serie di successivi backcrossing, riuscire a costituire una popolazione con pool genico quasi completamente appartenente alla specie A e mitocondrio della specie B.

Questo fenomeno è quasi sicuramente avvenuto tra *Torymus sinensis* e *Torymus beneficus* (Yara, 2004; Yara *et al.*, 2007 e 2010) nel periodo in cui il primo fu introdotto in Giappone. Il materiale di *T. sinensis* introdotto in Italia

presenta tutti e due i corredi mitocondriali ed anche se l'analisi del barcoding sembrerebbe dimostrare la presenza delle due specie, in realtà ci troviamo di fronte alle tracce di un vecchio fenomeno di cattura del mitocondrio.

In situazione del tutto analoga, come risultato del barcoding, è *T. flavipes*, ma in questo caso vi sono evidenze di differenze anche nel corredo nucleare (Kaartinen *et al.*, 2010). Le due “branche” di *T. flavipes* rappresentano quindi due specie gemelle.

CONCLUSIONI

La capacità di identificare un gruppo tassonomico di insetti su base morfologica si acquisisce con l'esperienza ed una particolare sensibilità nel discriminare piccole differenze in un contesto spesso variabile di espressione fenetica della specie. Chiaramente non si può basare su questa capacità che si potrebbe definire "artistica" l'esito delle innumerevoli ricerche ecologiche che necessitano di numerose identificazioni di una grande quantità di diversi taxa (Gotelli, 2004).

Le tecniche biomolecolari sembrano, ed in gran parte sono, particolarmente utili per superare queste difficoltà. Esse forniscono una grande quantità di "caratteri" sufficientemente costanti da usare con metodi oggettivi nelle identificazioni. Non bisogna tuttavia pensare che queste possano sostituire completamente la tassonomia morfologica, soprattutto in una fase nella quale la corretta identificazione di materiale di confronto risulta indispensabile.

Con queste ricerche è stato dimostrato, in un gruppo "difficile" ma molto studiato, come un'integrazione tra morfologia e genetica sia ancora assolutamente necessaria e come, spesso, liste di specie vengano prodotte con un'accuratezza ancora insoddisfacente.

L'uso simultaneo di morfologia e barcoding ha permesso qui l'individuazione di almeno tre specie completamente non identificate, di numerosi problemi con gruppi di specie criptiche, e di problemi di cattura del mitocondrio. L'integrazione di queste tecniche sembra aprire prospettive entusiasmanti in molti settori della biologia.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia tutto il personale e i responsabili di sede degli Istituti dell'Area di Sassari del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), presso i quali la sottoscritta è stata ospitata: l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (ISE) ed in particolare Laura Loru per la sua preziosa attività di co-tutoraggio, Leonarda Fadda, Xenia Fois e Marcella Fara per l'indispensabile e disinteressato aiuto nei campionamenti in campo e nella "lavorazione" delle galle in laboratorio, Pierfrancesco Sechi per aver condiviso le sue competenze nell'elaborazione dei dati; l'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) e in particolare Giambattista Maestrale e tutte le colleghe per il prezioso supporto nelle analisi genetiche.

Un ringraziamento particolare ai ricercatori della sede di Napoli dell'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) del CNR: Pasquale Cascone per i suggerimenti nell'estrazione non distruttiva del DNA degli esemplari adulti di riferimento ed Emilio Guerrieri che ha offerto le proprie competenze per indirizzarci nell'identificazione morfologica di tali esemplari.

Doverosi ringraziamenti ai finanziatori di questa ricerca: l'Amministrazione Provinciale di Nuoro nell'ambito del progetto "Controllo biologico del cinipide galligeno del castagno nella Barbagia di Belvì" e la Regione Autonoma della Sardegna nell'ambito del "Programma triennale di lotta biologica al Cinipide galligeno del castagno (*Dryocosmus kuriphilus*, Yasumatsu) in Sardegna".

Infine un affettuoso ringraziamento va ai tanti colleghi amici per il loro incoraggiamento.

BIBLIOGRAFIA

- Abe Y., Melika G., Stone G. N. (2007). The diversity and phylogeography of cynipid gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Oriental and eastern Palearctic regions, and their associated communities. *Oriental Insects* 41: 169–212.
- Addario E., Turchetti T. (2011). Parasitic fungi on *Dryocosmus kuriphilus* in *Castanea sativa* necrotic galls. *Bulletin of Insectology* 64: 269–273.
- Aebi A., Schönrogge K., Melika G., Quacchia A., Alma A., Stone G.N. (2007). Native and introduced parasitoids attacking the invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *OEPP/EPPO Bulletin* 37: 166–171.
- Al Khatib F., Fusu L., Cruaud A., Gibson G., Borowiec N., Rasplus J.-Y., Ris N., Delvare G. (2014). An integrative approach to species discrimination in the *Eupelmus urozonus* complex (Hymenoptera, Eupelmidae), with the description of 11 new species from the Western Palearctic. *Systematic Entomology* 39: 806–862.
- Al Khatib F., Fusu L., Cruaud A., Gibson G., Borowiec N., Rasplus J.-Y., Ris N., Delvare G. (2015). Availability of eleven species names of *Eupelmus* (Hymenoptera, Eupelmidae) proposed in Al Khatib et al.(2014). *ZooKeys* 505: 137–145. doi: 10.3897/zookeys.505.9021
- Alma A. (2010). Considerazioni sulle attuali conoscenze inerenti il Cinipide del castagno. *Atti della Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Rendiconti* 58: 121–123.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.

- Anisimova M., Gil M., Dufayard J.F., Dessimoz C., Gascuel O. (2011). Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology* 60: 685–99.
- Askew R.R. (1961). A study of the biology of species of the genus *Mesopolobus* Westwood (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with cynipid galls on oak. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 113: 155–173.
- Askew R.R., Melika G., Pujade-Villar J., Schönrogge K., Stone G.N., Nieves-Aldrey J.L. (2013). Catalogue of parasitoids and inquilines in cynipid oak galls in the West Palaearctic. *Zootaxa* 3643 (1): 14.
- Battisti A., Benvegnù I., Colombari F., Haack R.A. (2014). Invasion by the chestnut gall wasp in Italy causes significant yield loss in *Castanea sativa* nut production. *Agricultural and Forest Entomology* 16: 75–79.
- Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: D36–D42. doi: 10.1093/nar/gks1195.
- Bouček Z. (1970). On some British *Megastigmus* (Hym. Torymidae), with a revised key to the west European species. *Entomologist's Gazette* 21: 265–275.
- Brussino G., Bosio G., Baudino M., Giordano R., Ramello F., Melika G. (2002). Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. *Informatore Agrario* 58: 59–61.
- Campbell B., Heraty J., Rasplus J.-Y., Chan K., Steffen-Campbell J., Babcock C. (2000). Molecular systematics of the Chalcidoidea using 28S-D2 rRNA in “Hymenoptera evolution, biodiversity and biological control”. (Fourth International Hymenoptera Conference, Canberra, Australia, 1999). Andrew Austin Ed. Pages 59–73.

- Casiraghi M., Labra M., Ferri E., Galimberti A., De Mattia F. (2010). DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics* 4: 440–453. doi: 10.1093/bib/bbq003
- Caterino M.S., Cho S., Sperling F.A.H. (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45: 1–54.
- Chinery M. (2010). Guida agli insetti d'Europa. Atlante illustrato a colori.- Franco Muzzio Editore, Roma, Italia.
- Cho D.Y., Lee S.O. (1963). Ecological studies on the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, and observations of the damage caused to the tree by this insect. *Korean Journal of Plant Protection* 2: 47–54 (in Korean).
- Cooper W.R., Rieske L.K. (2007). Community associates of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus*, (Hymenoptera: Cynipidae) in eastern North America. *Annals of the Entomological Society of America* 100: 236–244.
- Dhananjeyan K.J., Paramasivan R., Tewari S.C., Rajendran R., Thenmozhi V., Victor Jerald Leo S., Venkatesh A., Tyagi, B.K. (2010). Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium. *Tropical Biomedicine* 27: 47–53.
- Edgar R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32: 1792–1797.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH) (2011). Guidance on the environmental risk assessment of plant pests. *EFSA Journal* 9(12), 2460, 121 pp., doi: 10.2903/j.efsa.2011.2460

- EPPO (2005). Data sheets on quarantine pests / Fiches informatives sur les organismes de quarantaine: *Dryocosmus kuriphilus*. *OEPP/EPPO Bulletin* 35: 422–424.
- Ferracini C., Ferrari E., Saladini M.A., Pontini M., Corradetti M., Alma A. (2015). Non-target host risk assessment for the parasitoid *Torymus sinensis*. *BioControl* 60: 583–594.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- Francati S., Alma A., Ferracini C., Pollini A., Dindo M.L. (2015). Indigenous parasitoids associated with *Dryocosmus kuriphilus* in a chestnut production area of Emilia Romagna (Italy). *Bulletin of Insectology* 68: 127–134.
- Gebiola M., Bernardo U., Monti M.M., Navone P., Viggiani G. (2009). *Pnigalio agraulis* (Walker) and *Pnigalio mediterraneus* Ferrière and Delucchi (Hymenoptera: Eulophidae): two closely related valid species. *Journal of Natural History* 43: 2465–2480.
- Gibbs M., Schönrogge K., Alma A., Melika G., Quacchia A., Stone G.N. (2011). *Torymus sinensis*: a viable management option for the biological control of *Dryocosmus kuriphilus* in Europe? *BioControl* 56: 527–538. doi: 10.1007/s10526-011-9364-8
- Glez-Peña D., Gómez-Blanco D., Reboiro-Jato M., Fdez-Riverola F., Posada D. (2010) ALTER: program-oriented format conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research Web Server* issue. ISSN: 0305–1048
- Gotelli N.J. (2004). A taxonomic wish-list for community ecology. *Philosophical Transaction of the Royal Society London B* 359: 585–597. doi: 10.1098/rstb.2003.1443

- Graham M.W.R. (1969). The *Pteromalidae* of north-western Europe (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology Supplement* 16: 1–908.
- Graham M.W.R., Gijswijt M.J. (1998). Revision of the European species of *Torymus* Dalman (s. lat.) (Hymenoptera: Torymidae). *Zoologische Verhandelingen (Leiden)* 317: 1–202.
- Graziosi I., Rieske L.K. (2013). Response of *Torymus sinensis*, a parasitoid of the gallforming *Dryocosmus kuriphilus*, to olfactory and visual cues. *Biological Control* 67: 137–142.
- Guerrieri E., Bernardo U., Iodice L., Gebiola M. (2010). Identificazione morfo-bio-molecolare ed interazioni trofiche degli antagonisti autoctoni di *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu in Campania: metodologia e risultati preliminari. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LVIII, 2010*, 115–120.
- Guindon S., Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P. D. N., Hickey D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167–172.
- Hall T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B* 270: 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related

- species. *Proceedings of the Royal Society London B* (Suppl.) 270: S96–S99. doi: 10.1098/rsbl.2003.0022
- Hreck J., Miller S. E., Quicke D. L. J., Smith M. A. (2011). Molecular detection of trophic links in a complex insect host–parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources* 11: 786–794.
- Kaartinen R., Stone G.N., Hearn J., Lohse K., Roslin T. (2010). Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. *Ecological Entomology* 35: 623–638.
- Kambhampati S., Smith P.T. (1995). PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology* 4: 233–236.
- Kos K., Kriston E., Melika G. (2015). Invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), its native parasitoid community and association with oak gall wasps in Slovenia. *European Journal of Entomology* 112: 698–704.
- Lee M.S.Y. (2004). The molecularisation of taxonomy. *Invertebrate Systematics* 18: 1–6.
- Li Y., Zhou X., Feng G., Hu H., Niu L., Hebert P. D. N., Huang D. (2010). DNA BARCODING COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic *taxa* and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae). *Molecular Ecology Resources* 10: 31–40.
- Li Y.Z., Yi Y.H., Zheng Z.L., Xie Z.F. (2004). The spatial distribution of chestnut gall wasp and sampling techniques in the chestnut plantation. *Journal of South China Agricultural University* 25: 62–65 (in Chinese).
- Louda S.M., Pemberton R.W., Johnson M.T., Follett P.A. (2003). Nontarget effects: the Achilles' heel of biological control? *Annual Review of Entomology* 48: 365–396.

- Matošević D., Melika G. (2013). Recruitment of native parasitoids to a new invasive host: first results of *Dryocosmus kuriphilus* parasitoid assemblage in Croatia. *Bulletin of Insectology* 66: 231–238.
- Meiklejohn K.A., Wallman J.F., Dowton M. (2013). DNA barcoding identifies all immature life stages of a forensically important flesh fly (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences* 58: 184–187.
- Memmott J., Godfray H.C.J. (1994). The use and construction of parasitoid webs. *Parasitoid Community Ecology* (ed. B.A. Hawkins & W. Sheehan), pp. 300-318. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Montero-Pau J., Gómez A., Muñoz J. (2008). Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 218–222.
- Moriya S., Shiga M., Adachi I. (2003). Classical biological control of the chestnut gall wasp in Japan. Proceedings of the 1st international symposium on biological control of arthropods. Honolulu, Hawaii. USDA Forest Service, Washington, pp. 407–415.
- Munro J.B., Heraty J.M., Burks R.A., Hawks D., Mottern J., Cruaud A., Rasplus J.-Y., Jansta P. (2011). A molecular phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). *PLoS ONE* 6 (11), e27023. doi: 10.1371/journal.pone.0027023.
- Murakami Y. (1980). Recent topics on the chestnut gall wasp, with special reference to a report from China. *Nogyô oyobi Engei Agriculture and Horticulture* 55: 249–253 (in Japanese).
- Oho N., Umeya K. (1975). Chestnut gall wasp is found in the People's Republic of China. *Shokubutsu Boeki Plant Protection* 29: 463–464 (in Japanese).

- Palmeri V., Cascone P., Campolo O., Grande S.B., Laudani F., Malacrino A., Guerrieri E. (2014). Hymenoptera wasps associated with the Asian gall wasp of chestnut (*Dryocosmus kuryphilus*) in Calabria, Italy. *Phytoparasitica* 42: 699–702.
- Pantaleoni R.A., Loru L., Sassu A., Loddo C. (2007). Il cinipide del castagno in Sardegna: una nuova preoccupante presenza nella Barbagia di Belvì. *Notiziario sulla protezione delle piante* 21: 203–206.
- Panzavolta T., Bernardo U., Bracalini M., Cascone P., Croci F., Gebiola M., Iodice L., Tiberi R., Guerrieri E. (2013). Native parasitoids associated with *Dryocosmus kuriphilus* in Tuscany, Italy. *Bulletin of Insectology* 66: 195–201.
- Payne J.A. (1978). Oriental chestnut gall wasp: new nut pest in North America. *Proceedings of the American Chestnut Symposium*. West Virginia University Press, Morgantown, WV (US), 86–88.
- Payne J.A., Menke A.S., Schroeder P.M. (1975). *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), an Oriental chestnut gall wasp in North America. *USDA Cooperative Economic Insect Report* 25: 903–905.
- Pujade-Villar J. (1993). Especies de *Mesopolobus* (Hym., Pteromalidae) asociadas a agallas de Cynipini (Hym., Cynipidae) del nordeste ibérico y notas sobre la validez de *M. lichtensteini* (Mayr, 1903). *Eos* 69: 63–73.
- Quacchia A., Ferracini C., Nicholls J.A., Piazza E., Saladini M.A., Tota F., Melika G., Alma A. (2012). Chalcid parasitoid community associated with the invading pest *Dryocosmus kuriphilus* in north-western Italy. *Insect Conservation and Diversity* 6: 114–123. doi: 10.1111/j.1752-4598.2012.00192.x
- Quacchia A., Moriya S., Bosio G. (2014). Effectiveness of *Torymus sinensis* in the biological control of *Dryocosmus kuriphilus* in Italy. *Acta Horticulturae* (ISHS) 1043: 199–204.

- Quacchia A., Moriya S., Bosio G., Scapin I., Alma A. (2008). Rearing, release and settlement prospect in Italy of *Torymus sinensis*, the biological control agent of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *BioControl* 53: 829–839.
- Rambaut A., Drummond A.J. (2012). FigTree version 1.4 – University of Edinburgh, Edinburgh, UK.
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N. (2007). BARCODING BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N. (2013). A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE* 8(8): e66213. doi:10.1371/journal.pone.0066213
- Rieske L.K. (2007). Success of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus*, on chestnut in the USA: a historical account. *OEPP/EPPO Bulletin* 37: 172–174.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sartor C., Torello Marinoni D., Quacchia A., Botta R. (2012). Quick detection of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) in chestnut dormant buds by nested PCR. *Bulletin of Entomological Research* 102: 367–371. doi: 10.1017/S0007485311000812
- Scossiroli R. E., Clementel S., Scossiroli S. (1974). *Metodi statistici per l'ecologia. Analisi delle distribuzioni di frequenza*. Zanichelli, Bologna. 218 pp.
- Shiga M. (1999). Classical biological control of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus*: present status and interactions between an introduced parasitoid, *Torymus sinensis*, and native parasitoids. *In*:

- Biological invasions of ecosystems by pest and beneficial organisms. Ed. Yano E., Matsuo K., Shiyomi M., Andow D.A., National Institute of Agro-Environmental Sciences, Tsukuba, Japan, 175–188.
- Shiraga T. (1951). *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) and its protection. *Nogyo Oyobi Engei Agriculture and Horticulture* 26: 167–170 (in Japanese).
- Smith M.A., Eveleigh E.S., McCann K.S., Merilo M.T., McCarthy P.C., Van Rooyen K.I. (2011). Barcoding a quantified food web: crypsis, concepts, ecology and hypotheses. *PLoS ONE* 6 (7), e14424. doi: 10.1371/journal.pone.0014424.
- Smith M.A., Rodriguez J.J., Whitfield J.B., Deans A.R., Janzen D.H., Hallwachs W., Hebert P.D.N. (2008). Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 12359–12364.
- Speranza S., Stacchiotti M.; Paparatti B. (2009). Endemic parasitoids of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cinipidae) in Central Italy. 4th International Chestnut Symposium, Book Series: *Acta Horticulturae* 844: 421–423. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.844.58
- Stahlhut J.K., Fernández-Triana J., Adamowicz S.J., Buck M., Goulet H., Hebert P.D.N., Huber J.T., Merilo M.T., Sheffield C.S., Woodcock T., Smith M.A. (2013). DNA barcoding reveals diversity of Hymenoptera and the dominance of parasitoids in a sub-arctic environment. *BMC Ecology* 13–2. doi: 10.1186/1472-6785-13-2.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

- Van Lenteren J.C., Bale J., Bigler F., Hokkanen H.M.T., Loomans A.J.M. (2006a). Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annual Review of Entomology* 51: 609–634.
- Van Lenteren J.C., Loomans A.J.M. (2006b). Environmental risk assessment: methods for comprehensive evaluation and quick scan. *In: Environmental impact of invertebrates for biological control of arthropods: methods and risk assessment*. Ed. Bigler F., Babendreier D., Kuhlmann U., Wallingford, UK, CAB International, 254–272.
- Van Veen F.J.F., Belshaw R., Godfray H.C.J. (2003). The value of the ITS2 region for the identification of species boundaries between *Alloxysta* hyperparasitoids (Hymenoptera: Charipidae) of aphids. *European Journal of Entomology* 100: 449–453.
- Walsh P.A., Metzger D.A., Higuchi R. (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506–513.
- Xia X. (2013). DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30: 1720–1728.
- Yara K. (2004). Relationship between the introduced and indigenous parasitoids *Torymus sinensis* and *T. beneficus* (Hymenoptera: Torymidae) as inferred from mt-DNA (COI) sequences. *Applied Entomology and Zoology* 39: 427–433.
- Yara K. (2006). Identification of *Torymus sinensis* and *T. beneficus* (Hymenoptera: Torymidae), introduced and indigenous parasitoids of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), using the ribosomal ITS2 region. *Biological Control* 36: 15–21.
- Yara K., Kunimi Y. (2009). Discrimination of *Torymus sinensis* Kamijo (Hymenoptera: Torymidae) and *T. beneficus* Yasumatsu et Kamijo and

their hybrids by allele-specific PCR. *Applied Entomology and Zoology* 44: 275–280. 10.1303/aez.2009.275

Yara K., Sasawaki T., Kunimi Y. (2007). Displacement of *Torymus beneficus* (Hymenoptera : Torymidae) by *T. sinensis*, an indigenous and introduced parasitoid of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera : Cynipidae), in Japanese chestnut fields: Possible involvement in hybridization. *Biological Control* 42: 148–154.

Yara K., Sasawaki T., Kunimi Y. (2010). Hybridization between introduced *Torymus sinensis* (Hymenoptera: Torymidae) and indigenous *T. beneficus* (late-spring strain), parasitoids of the Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae). *Biological Control* 54: 14–18.

Yasumatsu K. (1951). A new *Dryocosmus* injurious to chestnut trees in Japan (Hym., Cynipidae). *Mushi* 22: 89–93.

INDICE

INTRODUZIONE	3
Il caso di studio: parassitoidi del cinipide galligeno del castagno	
MATERIALI E METODI	13
Campionamenti in campo	
Adulti determinati di riferimento	
Analisi biomolecolari	
<i>Estrazione del DNA</i>	
<i>Estrazione del DNA con metodo conservativo [adulti]</i>	
<i>Reazione a catena della polimerasi (PCR)</i>	
<i>Sequenziamento del DNA</i>	
<i>Protocollo di sequenziamento</i>	
<i>Identificazione delle sequenze COI</i>	
RISULTATI	24
Dati generali	
<i>Campioni raccolti e analizzati</i>	
<i>Analisi riuscite</i>	
<i>Determinazioni riuscite</i>	
Identificazioni ed elenco delle specie	
<i>Genere Eupelmus (Eupelmidae)</i>	
<i>Genere Eurytoma (Eurytomidae)</i>	
<i>Genere Sycophila (Eurytomidae)</i>	
<i>Genere Mesopolobus (Pteromalidae)</i>	
<i>Genere Ormyrus (Ormyridae)</i>	
<i>Genere Megastigmus (Torymidae)</i>	
<i>Genere Torymus (Torymidae)</i>	

DISCUSSIONE	38
Difficoltà nell'identificazione morfologica	
Difficoltà nell'identificazione tramite barcoding	
<i>Problemi legati all'identificazione del materiale di partenza</i>	
<i>Problemi legati alla presenza di specie gemelle o di gruppi di specie criptiche</i>	
<i>Problemi legati alla cosiddetta "cattura del mitocondrio"</i>	
CONCLUSIONI	42
RINGRAZIAMENTI	43
BIBLIOGRAFIA	44