



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

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



Indirizzo Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo

Ciclo XXVIII

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)

dr. Enrico Muscas

Direttore della Scuola prof. Antonello Cannas

Referente di Indirizzo prof. Alberto Satta

Docente Guida prof. Andrea Lentini

TABLE OF CONTENTS

Riassunto	3
Abstract	4
Introduzione	5
Chapter I	
<i>“Variation of life-history parameters of Planococcus ficus (Hemiptera: Pseudococcidae) in response to grapevine nitrogen fertilization”</i>	8
Abstract	9
Introduction	9
Materials and methods	10
Results	12
Discussion	14
Acknowledgments	16
References	16
Chapter II	
<i>“Total ground cover in Mediterranean vineyards: effects on the development of the vine mealybug and grapevine yield and quality”</i>	19
Abstract	20
Introduction	21
Materials and methods	25
Results	29
Discussion	32
Acknowledgments	35
References	36
Tables and figures	41

Chapter III

<i>“Effetti della confusione sessuale e del ritardo della fecondazione sulla biologia di <i>Planococcus ficus</i> e sui parametri demografici delle sue popolazioni”</i>	46
Riassunto	47
Introduzione	48
Materiali e metodi	52
Risultati	61
Discussione	69
Bibliografia	74
Tabelle e figure	79

Chapter IV

<i>“Laboratory evaluation of suitability of the vine mealybug, <i>Planococcus ficus</i>, as host for <i>Leptomastix dactylopii</i>”</i>	106
Abstract	107
Introduction	108
Materials and methods	111
Results	117
Discussion	119
Acknowledgments	122
References	123
Tables and figures	129
Acknowledgments	134

Riassunto

Planococcus ficus è un fitofago chiave nelle più importanti regioni viticole del mondo. I trattamenti chimici impiegati per il contenimento delle infestazioni possono avere ripercussioni negative per l'ambiente e per la salute dell'uomo e, dato l'elevato potenziale biotico della specie e la sua etologia, non sempre risultano efficaci. In questa tesi di dottorato si riportano i risultati di una ricerca tesa a valutare l'efficacia di tecniche di lotta a basso impatto ambientale. In particolare, sono stati valutati con prove di campo e in ambiente protetto gli effetti delle tecniche di gestione del suolo e della concimazione azotata sullo sviluppo e la riproduzione della cocciniglia. Inoltre, sono state condotte prove di laboratorio e di campo per studiare gli effetti del ritardo degli accoppiamenti e della confusione sessuale sulla biologia dell'insetto e sui parametri demografici delle sue popolazioni. Infine è stato condotto uno studio di laboratorio per valutare l'idoneità di *P. ficus* quale ospite del parassitoide *Leptomastix dactylopii*. I risultati ottenuti mostrano che lo sviluppo e i parametri riproduttivi della cocciniglia sono influenzati dall'inerbimento del vigneto e dalle concimazioni azotate. La confusione sessuale ha determinato una riduzione e un ritardo degli accoppiamenti accompagnati da una minore fecondità delle femmine. *L. dactylopii* ha la capacità di parassitizzare *Planococcus ficus* e ha mostrato una capacità di sviluppo comparabile a quella ottenuta sul suo ospite preferito *Planococcus citri*. Complessivamente i risultati indicano che appropriate pratiche culturali e le tecniche di lotta a basso impatto ambientale possono efficacemente integrare i trattamenti chimici nel contenimento delle popolazioni della cocciniglia farinosa della vite.

Parole chiave: Cocciniglia farinosa della vite, gestione del suolo, fertilizzazione azotata. confusione sessuale, *Leptomastix dactylopii*

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Abstract

Planococcus ficus is a key pest in the most important grape-growing regions. Its effective chemical control is difficult to achieve owing to its biotic potential and concealed habit. In addition, insecticide applications represent a threat for environment and human health. In this PhD thesis, alternative control techniques to reduce *P. ficus* populations were evaluated. Specifically, the effects of different cover crop management systems as well as of increasing nitrogen fertilization regimes on the life-history parameters of the mealybug were investigated in a commercial vineyard and in a greenhouse, respectively. Moreover, laboratory and field trials were carried out to determine the influence of delayed mating and mating disruption on biological and demographic parameters of *P. ficus*. Finally, the potential of the parasitoid *Leptomastix dactylopii* as a biological control agent against the vine mealybug was evaluated under laboratory conditions. The results obtained show that both ground covers and nitrogen fertilization affect developmental and reproductive parameters of the mealybug. Mating disruption reduced and delayed matings, whereas *L. dactylopii* successfully developed on *P. ficus* and showed a performance comparable to that of its preferred host, *Planococcus citri* (Risso). The results indicate that accurate cultural practices and environmentally friendly control methods may effectively integrate the conventional chemical control against *P. ficus*.

Key words: vine mealybug, soil management, nitrogen fertilization, mating disruption, *Leptomastix dactylopii*

Introduzione

La cocciniglia farinosa della vite *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera Pseudococcidae) è uno dei principali fitofagi delle aree viticole mediterranee. La dannosità di questa specie è legata alla notevole sottrazione di linfa vegetale e all'emissione di abbondanti quantità di melata su cui si sviluppano strati di fumaggine che impediscono la normale attività fotosintetica dell'apparato fogliare. Inoltre, la specie ha la capacità di trasmettere il virus associato all'accartocciamento fogliare della vite (GLRa V-3) e può pertanto rappresentare una minaccia anche a basse densità di popolazione.

Per combattere le infestazioni della cocciniglia generalmente si fa ricorso a prodotti chimici di sintesi, quali esteri fosforici, regolatori di crescita e acidi tetronici, la cui efficacia è spesso poco soddisfacente in quanto una parte della popolazione delle cocciniglie rimane per tutto l'anno protetta sotto la corteccia o, in presenza di terreni sabbiosi, anche sotto il colletto della vite sfuggendo alle irrorazioni insetticide e causando una continua reinfestazione della vegetazione. Un eccessivo impiego dei mezzi chimici ha inoltre un notevole impatto sui nemici naturali che mantengono i fitofagi della vite a bassi livelli di densità.

Le nuove norme comunitarie sull'uso sostenibile dei pesticidi (Direttiva 2009/128/CE del 21 ottobre 2009; GU dell'Unione Europea L 309 del 24 novembre 2009) impongono l'adozione della difesa integrata e promuovono tecniche alternative all'uso dei prodotti fitosanitari, con l'obiettivo di ridurre i rischi che i mezzi chimici di sintesi possono rappresentare per la salute umana e per l'ambiente. Nell'ambito della difesa integrata assumono di conseguenza una notevole importanza tutte le tecniche di lotta a basso impatto ambientale quali appropriate pratiche colturali, l'impiego di feromoni per la confusione sessuale e la lotta biologica. Tra le pratiche agronomiche, che potenziano la resistenza dell'ambiente alle infestazioni degli insetti dannosi attraverso una maggiore

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

complessità dell'agroecosistema, la gestione del suolo che prevede l'inerbimento naturale o artificiale può avere notevoli effetti sull'artropodofauna infeudata al vigneto incrementando l'abbondanza di ausiliari. Inoltre, la competizione del cotico erboso con le viti può modificare la fisiologia delle piante e condizionare indirettamente le popolazioni dei fitofagi della vite. Incrementi delle infestazioni nelle colture sono generalmente associati ad elevati livelli di azoto nella pianta ed in particolare alle concentrazioni aminoacidiche, vantaggiose soprattutto per le specie fitomize, quali cocciniglie, cicaline e afidi, che si nutrono di linfa vegetale. Pertanto, tutte le pratiche colturali volte a limitare l'eccessivo rigoglio vegetativo delle piante contribuiscono a ridurre il potenziale biotico delle popolazioni dei fitomizi.

La recente sintesi del feromone sessuale di *Planococcus ficus* ha aperto una nuova prospettiva per lo sviluppo di programmi di difesa con la tecnica della confusione sessuale anche nei confronti di questa specie. Questa tecnica di lotta è stata impiegata con risultati incoraggianti su oltre 11.000 ettari di vigneto in California, in Argentina e in Sardegna dove formulati microincapsulati o erogatori di feromone a membrana sembrano ridurre l'infestazione della cocciniglia. La valutazione dell'efficacia della confusione sessuale attraverso la sola stima dell'infestazione potrebbe però essere imprecisa poiché la distribuzione fortemente aggregata delle cocciniglie rende difficile sia una stima affidabile della densità di popolazione sia la definizione di parcelle omogenee per i confronti fra trattamenti. Appare pertanto importante studiare gli effetti di questa tecnica di lotta sui parametri biologici e demografici che condizionano la capacità di crescita delle popolazioni.

Un'importante alternativa all'impiego di insetticidi di sintesi è rappresentata dalla lotta biologica con l'impiego di parassitoidi allevati in biofabbriche e liberati in campo nei periodi più favorevoli alla loro attività. L'Imenottero Encirtide *Leptomastix dactylopii* (Howard) viene impiegato efficacemente in programmi di controllo biologico di *Planococcus citri* (Risso), sia su agrumi che su piante ornamentali in serra. In letteratura non vengono riportati studi sull'impiego di *L.*

dactylopii nella lotta a *P. ficus* nell'agroecosistema vigneto, sebbene ricerche di laboratorio condotte dal Dipartimento di Agraria dell'Università di Sassari e dal Dipartimento per la Ricerca nella Arboricoltura di Agris Sardegna abbiano comunque messo in evidenza la capacità di questo parassitoide di svilupparsi sulla cocciniglia farinosa della vite.

La ricerca condotta nell'ambito del mio dottorato ha avuto lo scopo valutare gli effetti che diverse tecniche di lotta hanno sulla biologia e sui parametri riproduttivi di *P. ficus*. In particolare gli argomenti trattati sono:

- 1) ruolo dell'inerbimento sui parametri fisiologico-produttivi della vite e sullo sviluppo di *Planococcus ficus*;
- 2) influenza della concimazione azotata sullo sviluppo e sui parametri riproduttivi di *Planococcus ficus*;
- 3) effetti della confusione sessuale e del ritardo della fecondazione sulla biologia di *Planococcus ficus* e sui parametri demografici delle sue popolazioni;
- 4) potenziale impiego di *Leptomastix dactylopii* come agente di controllo biologico delle popolazioni della cocciniglia farinosa della vite.

La tesi è divisa in capitoli che riportano una ricerca già pubblicata, un'altra inviata in una rivista internazionale mentre altre due sono in fase di prima stesura.

Chapter I

Variation of life-history parameters of Planococcus ficus (Hemiptera: Pseudococcidae) in response to grapevine nitrogen fertilization

Published on **Journal of Applied Entomology** as:

A.Cocco, P. M. Marras, E. Muscas, A. Mura, A. Lentini

Variation of life-history parameters of Planococcus ficus (Hemiptera: Pseudococcidae) in response to grapevine nitrogen fertilization

I collected and analyzed most of the data and contributed to writing the manuscript

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

ORIGINAL CONTRIBUTION

Variation of life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in response to grapevine nitrogen fertilization

A. Cocco¹, P. M. Marras², E. Muscas¹, A. Mura¹ & A. Lentini¹¹ Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia, University of Sassari, Sassari, Italy² Dipartimento per la Ricerca nell'Arboricoltura, Agris Sardegna, Cagliari, Italy**Keywords**

body size, development time, fecundity, SPAD, survival, vine mealybug

Correspondence

Arturo Cocco (corresponding author), Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia, University of Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italy. E-mail: accocco@uniss.it

Received: August 25, 2014; accepted: November 6, 2014.

doi: 10.1111/jen.12192

Abstract

The effects of different nitrogen fertilization regimes on body size and selected life-history parameters (development time, survival, fecundity and fertility) of the vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), were investigated on potted grapevines under laboratory and greenhouse conditions. In both trials, five groups of four grapevines each were supplied with 0, 0.25, 0.5, 1.0 or 2.0 g/l of ammonium nitrate fertilizer for a month and then artificially infested with 200 first-instar vine mealybugs (24 h of age). The concentration of nitrogen on grape leaves was measured during both experiments by a SPAD chlorophyll metre, showing statistical differences among treatments. The nitrogen fertilization significantly affected the investigated *P. ficus* parameters, providing consistent results in both laboratory and greenhouse trials. The vine mealybug females exhibited higher survival and fecundity, larger body size and lower development time on plants supplied with higher nitrogen fertilization rates. Survival, body size and fecundity of *P. ficus* were positively correlated with the leaf nitrogen concentration, whereas the development time was negatively correlated. Fertility did not vary significantly among treatments. Our results show that high nitrogen regimes increase the reproductive performance of *P. ficus* on grapevines and point out the importance of implementing balanced fertilization plans in grapevine IPM programs to reduce population densities and prevent insect outbreaks.

Introduction

The vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), is a serious pest in important grape-growing regions, such as the Mediterranean Basin, Middle East, South Africa, California, Mexico and Argentina (Ben-Dov 1994; Walton and Pringle 2004; Lentini et al. 2008; Daane et al. 2012). Mealybugs cause direct damage to vines by sucking phloem sap and, indirectly, by excreting large amounts of honeydew which promotes the growth of sooty mould, thereby reducing the photosynthetic activity. Clusters infested with mealybugs or honeydew are unmarketable as fresh table grapes and have an increased risk of ochratoxin A contamination,

which is known to affect the quality of wine grapes (Chiotta et al. 2010). Moreover, *P. ficus* vectors the grapevine leafroll-associated virus (GLRaV) and the Shiraz and corky bark diseases (Cabaleiro and Segura 1997; Charles et al. 2006), which reduce crop yield up to 60–70% as well as wine quality (Charles et al. 2006). The chemical control of the vine mealybug with broad-spectrum insecticides has been widely used with effective results but showed negative effects on non-target organisms (Daane et al. 2012). Therefore, new pesticides have been introduced (Daane et al. 2006; Mansour et al. 2010) and more environmentally friendly control methods have been tested (Walton et al. 2006; Karamaouna et al. 2013; Cocco et al. 2014).

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Life parameters of phytophagous insects are strongly affected by the chemical composition of host plants (Mattson 1980; Leather 1994; Koricheva et al. 1998). Consequently, the severe mealybug infestations in grapevine cultivations could be attributed to the increasing use of vigorous clones and to cultural practices that modify the plant physiology (e.g. higher nitrogen rates and irrigation regimes; Dalla Montà et al. 2001).

The nitrogen concentration in plant tissues is a significant factor in food quality for herbivorous species (Jansson et al. 1991; Wang et al. 2006). In fact, the physiology of many phloem-sucking insects is strongly influenced by the content of free amino acids, which are the main nitrogen compounds in the phloem sap (Ziegler 1975; Prestidge and McNeill 1983). For example, aspartic and glutamic acid, valine and alanine acted as phagostimulants for the cassava mealybug, *Phenacoccus herreni* Cox and Williams, whereas lysine, ornithine, asparagine, methionine and histidine played mainly a nutritive function (Calatayud et al. 2002). Amino acid composition in the phloem sap is usually unbalanced for nutritional requirements of mealybugs (Calatayud et al. 2002), which are not able to synthesize the lacking compounds, as they are deficient in specific enzymes and have a negligible protease activity (Kehr 2006). However, lacking amino acids are synthesized *ex novo* by two species of β - and γ -proteobacteria endosymbionts located in specialized organs of the mealybug guts (bacteriomes; von Dohlen et al. 2001). Nitrogen fertilization modifies the concentration of amino acids in the phloem sap and could hence influence the development of populations of phloem-sucking insects.

Many studies showed increased performance of phytophagous pests at higher nitrogen rates and host preference for nitrogen-fertilized plants (Hunt et al. 1992; Bentz et al. 1995; Wang et al. 2006). Increasing rates of nitrogen supplied to red- and green-variegated coleus resulted in higher fecundity and shorter development time in the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) (Hogendorp et al. 2006). Similarly, the pink sugarcane mealybug, *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell), showed higher pre-imaginal survival rates on sugarcane plants subjected to increasing nitrogen rates under laboratory conditions (Rae and Jones 1992). On the other hand, high nitrogen regimes lowered or had no effect on the reproductive performance of a number of insects (Bethke et al. 1998; Fischer and Fiedler 2000). Other studies pointed out that host plants subjected to abiotic stress, such as drought, fire or nutritional deficiencies, were more suitable as food sources to herbivorous insects (Matt-

son and Haack 1987; Hacker and Bertness 1995). Changes in plant physiology might reduce plant defence compounds and increase the concentration of available nitrogen in the host tissues, enhancing the pest reproductive performance (Rhoades 1979; White 1984). Moreover, other factors than nitrogen fertility, such as planting date and climatic conditions, can affect the pest population density (Slosser et al. 1998; Cisneros and Godfrey 2001; Bi et al. 2005). In conclusion, the general nitrogen limitation hypothesis postulated by White (1993) cannot be extended to all pest species (Fischer and Fiedler 2000).

Mealybug outbreaks in vineyards have increased significantly in recent years, probably as a result of cultural practices oriented to higher crop yield. Consequently, we aimed to determine whether nitrogen fertilization affects the development parameters of *P. ficus*. With this goal, laboratory and greenhouse experiments were undertaken to investigate the influence of increasing rates of grapevine nitrogen fertilization on body size, development time, survival, fecundity and fertility of the vine mealybug.

Materials and Methods

The influence of nitrogen fertilization on *P. ficus* reared on grapevines was tested under laboratory and semi-field conditions. The laboratory experiment was carried out during spring-summer 2011 in a walk-in environmental chamber at a mean temperature (\pm SE) of $26.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (range $22.8\text{--}31.5^\circ\text{C}$), relative humidity (\pm SE) of $71.4 \pm 0.8\%$ (range $54.7\text{--}83.3\%$) and luminosity (\pm SE) of 3063.6 ± 75.9 lux (range $1250.6\text{--}6044.6$ lux). Illumination was provided by a combination of daylight entering through the windows and fluorescent lamps Fluora L36W/77 (Osram, Munich, Germany) for 16 h per day. The greenhouse trial was conducted in July–August 2012 under natural photoperiod at $25.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$ (range $14.7\text{--}38.4^\circ\text{C}$) and $63.5 \pm 2.7\%$ relative humidity (range $23.1\text{--}97.9\%$). The greenhouse was covered with a polypropylene shading net (50% shade) to reduce direct sunlight. Climatic data during the laboratory and greenhouse experiments were monitored with an EM50 datalogger (Decagon Devices, Pullman, WA) and an EBI 20-TH datalogger (Ebro, Ingolstadt, Germany), respectively.

In both laboratory and greenhouse experiments, 20 vines (cultivar Vermentino, rootstock 1103P), 1.2 m tall and rooted in plastic pots (22 cm in diameter, 9 l in volume) containing an inert growing substrate (40% pumice, 30% washed sand and 20% sphagnum peat moss), were used. Plants were

randomly assigned to five treatments with different rates of ammonium nitrate fertilizer (NH_4NO_3 , 26% total nitrogen, YaraBela 26; Yara Italia, Milano, Italy): 0 (untreated control), 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 g/l. Higher nitrogen concentrations were not used to avoid an excessive increase in the total dissolved solids (TDS) of the nutritive solution, which could affect the grapevine uptake physiology (Grattan 2002). The different fertilizer rates were applied weekly to vines with the same watering regime of 1.5 l per plant, providing a total amount of 0, 4.13, 8.25, 16.5 and 33.0 g of ammonium nitrate per vine, respectively. The tested doses correspond to field fertilization rates of 0, 3.2, 6.4, 12.9 and 25.7 kg N/ha, respectively, considering a density of 3000 vines per hectare. The highest dose investigated (25.7 kg N/ha) was lower than that applied in wine-producing vineyards, given that the seasonal nitrogen requirement of field growing vines ranges from 27 to 59 kg N/ha, depending on the grape yield (5–25 t/ha; Bavaresco et al. 2010). However, producing vines have much higher nitrogen requirements than nursery plants, as 35–48% of nitrogen absorbed annually is accumulated on bunches and therefore removed at harvest (Conradie 1986). Moreover, a variable fraction of nitrogen fertilizer applied in vineyards is lost by leaching and soil adsorption, depending on soil composition and pH. Therefore, although a comparison is difficult to make, the range of nitrogen rates investigated in this study was of the same magnitude as that commonly used in commercial vineyards. During both experiments, vines of all treatments were provided twice with 4 g/l of monopotassium phosphate (KH_2PO_4 , 30% P_2O_5 , 20% K_2O , Phito-PK; Chemia, Ferrara, Italy) applied to leaves, whereas a micronutrient solution of 0.5 g/l of Lysodin Multimax (Intrachem Bio Italia, Bergamo, Italy) containing 0.5% boron, 0.02% cobalt, 0.5% copper, 2% iron, 0.5% manganese, 0.02% molybdenum and 0.5% zinc was applied once to the substrate.

Measurement of nitrogen content

The nitrogen content in leaves was assessed during the experiments to point out changes in tissue concentration at different fertilizer regimes. The total nitrogen determination in plant tissues is usually carried out by the Kjeldahl digestion method (Nevo and Coll 2001; Hogendorp et al. 2006; Wang et al. 2006), which requires the collection of leaves and is a time-demanding procedure. Moreover, the continuous removal of leaves from vines during the experiments would significantly affect the results. The SPAD 502 Chlorophyll Meter (Minolta, Osaka, Japan) has

previously been used as a non-destructive tool to estimate the nitrogen concentration on grapevine leaves (Shaahan et al. 1999; Porro et al. 2001). The SPAD metre is a hand-held device that measures in the field the concentration of chlorophyll on leaves. The magnitude of the relationship between SPAD values and leaf nitrogen percentage is influenced by grapevine cultivar, rootstock, climatic conditions (sun exposure, temperature and relative humidity), presence of plant diseases, growth period and other factors that affect the chlorophyll synthesis (Porro et al. 2001). Therefore, we tested the reliability of this assessment tool in a preliminary trial by relating SPAD readings to the leaf nitrogen content of grapevines fertilized with different nitrogen regimes (Cocco et al. 2013). The percentage of total nitrogen on leaves measured with the Kjeldahl method was highly positively correlated with SPAD readings ($r^2 = 0.989$) and fitted a linear function ($y = 13.09x + 6.97$; $F_{1,4} = 346.76$; $P < 0.001$; Cocco et al. 2013). Accordingly, the nitrogen content in each vine was reliably estimated during the experiments by taking SPAD measures at 7–21-day intervals from the day of mealybug release to the end of the trials.

Insect rearing

The vine mealybug colony was started from ovipositing adult females collected from a vineyard in north-western Sardinia (Italy) and maintained on sprouted potatoes (cultivar Spunta) at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 60–70% RH, in constant darkness. Mealybug species were determined by RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction) with species-specific primers (Demontis et al. 2007).

Vine mealybug parameters

In each experiment, fertilized plants were allowed to acclimate to the different nitrogen rates and unfertilized vines to deplete nitrogen reserves for 1 month before being infested with *P. ficus* mealybugs. To reduce handling, immatures were released on vines using a leaf disc transport procedure modified by Hogendorp et al. (2006). To facilitate the collection of mealybugs of the same age, a number of ovisacs were transferred with a sable brush from the rearing colony to 2×2 cm cardboards, which were placed over fresh grape leaf discs, 5.5 cm in diameter, lying over water-soaked cotton pads. After 24 h, cardboards were withdrawn and 200 newly emerged first-instar mealybugs settled on leaf discs were counted under a dissecting microscope, removing the exceeding individuals.

Vines were inoculated by securing leaf discs on the abaxial (lower) surface of 3–4 median leaves with hair clips. In the greenhouse experiment, infested leaves were covered with spun-bonded polypropylene fabric (Agribon AG-15, 18.65 g/m², 90% light transmission) sealed with plastic bands at the bottom and top ends, so as to form a cage and protect mealybugs from natural enemies. All vine leaves, petioles and canes of vines were checked daily starting 3 weeks after infestation, to detect adult females at the onset of oviposition. The first 20 females that started to oviposit in each vine were collected, along with eggs previously oviposited, and stored in 70% ethanol. Whenever <20 mealybugs survived to the oviposition stage, all the females were collected from vines. The influence of different nitrogen rates on life parameters of *P. ficus* females was investigated by determining mealybug body size, fecundity, development time, fertility and survival. The body size of each female was measured as the length from the edge of the head to the anal lobes under a dissecting microscope using an ocular micrometre. The fecundity was determined by counting the eggs already laid and those inside the females after dissecting mealybug bodies with a scalpel (Hogendorp et al. 2006). The days of collection of each female were recorded, to assess the development time from hatching to ovipositing female. The fertility was assessed for 20 ovipositing females per treatment, which were randomly collected with a sable brush and placed in sealed plastic containers stored at room temperature. After fifteen days, ovisacs were torn apart with an insect pin, and unhatched eggs and dead first-instar nymphs were counted, determining the percentage of egg eclosion (fertility) as first-instar nymphs/(first-instar nymphs + unhatched eggs). For the purpose of assessing the mealybug survival, all adult females (young and ovipositing mealybugs) were counted on each plant, when in fact adult males could not be collected due to their small size and short lifespan. Therefore, *P. ficus* survival was estimated as: adult females/(released first-instar nymphs × percentage of released females). The percentage of females released in the field was determined by assessing the proportion of females in the rearing colony. As a result, a number of ovisacs were collected from the colony and the eggs were sexed following the method applied by Ross et al. (2011) to *P. citri*. A total of 11 070 *P. ficus* eggs were sexed, with a female percentage of 60.3%, in accordance with the study of Rotundo and Tremblay (1982), which observed a similar proportion of *P. ficus* females (58%) in their colony. As all grapevines were exposed to the same climatic conditions and had the same cultural

practices (watering, phosphorus potassium fertilization), differences in the investigated parameters of vine mealybugs were attributed to the different nitrogen fertilization regimes.

Statistical analysis

The SPAD values were compared among treatments throughout the experiments using repeated measures analysis of variance and separated by Tukey's test for multiple comparisons ($P < 0.05$; PROC MIXED, SAS Institute 2008). Differences in biological parameters of *P. ficus* (survival, development time, mealybug body size, fecundity and fertility) were tested with analysis of variance, and means significantly different were separated by Tukey's *post hoc* comparison test ($P < 0.05$; PROC GLIMMIX, SAS Institute 2008). The influence of the leaf nitrogen concentration with mealybug development was investigated by regressing *P. ficus* life parameters against SPAD values ($P < 0.05$; PROC REG, SAS Institute 2008). Numeric data were log-transformed when needed to meet the assumption of homogeneity of variance. However, data are presented in tables and figures as mean values \pm SE to allow comparisons with other studies.

Results

Measurement of nitrogen content

During the laboratory experiment, SPAD values showed an upward trend in all treatments, even though the patterns of increase over time were different among treatments (fig. 1a). Mean values increased progressively from the unfertilized plants to vines supplied with 2.0 g/l of ammonium nitrate (table 1). Significant differences were observed among treatments ($F_{4,108} = 18.01$; $P < 0.001$), with SPAD readings of unfertilized vines being the lowest and those of plants fertilized with 1.0 and 2.0 g/l of N the highest. Under greenhouse conditions, untreated plants showed a significantly lower SPAD value than fertilized plants ($F_{4,135} = 34.68$; $P < 0.001$), which were not significantly different among each other (fig. 1b, table 1).

Laboratory experiment

The development period from first-instar nymph to ovipositing female on unfertilized vines was significantly longer than that on plants supplied with nitrogen ($F_{4,395} = 26.83$; $P < 0.001$; table 2), and gradually decreased at higher rates of nitrogen, with the lowest

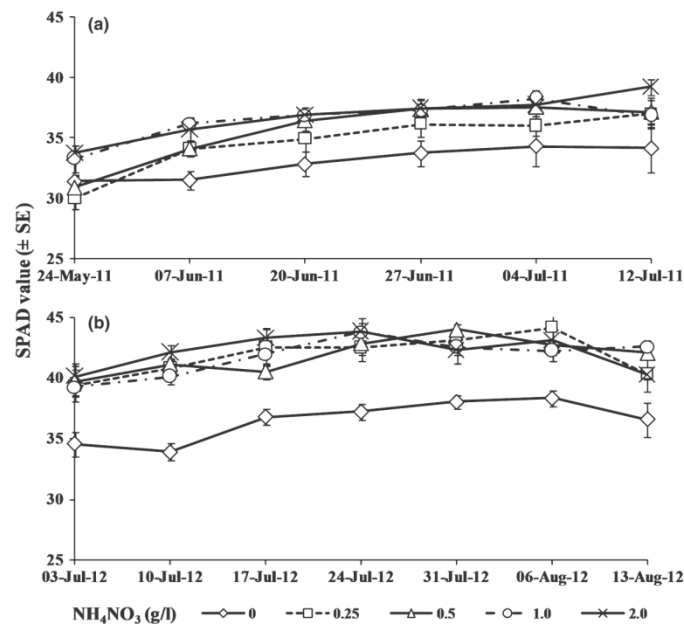


Fig. 1 Patterns of mean SPAD values (\pm SE) of grapevine leaves at different nitrogen regimes. (a) Laboratory experiment and (b) screenhouse experiment. Note that scale on y-axis originates at SPAD value = 25.

Table 1 Mean SPAD values (\pm SE) on grapevine leaves at different nitrogen regimes under laboratory and screenhouse conditions

	Treatment (g/l ammonium nitrate)				
	0	0.25	0.50	1.0	2.0
SPAD value \pm SE					
Laboratory	32.90 \pm 0.48 c	34.72 \pm 0.59 b	35.63 \pm 0.58 ab	36.50 \pm 0.41 a	36.83 \pm 0.45 a
Screenhouse	36.47 \pm 0.41 b	41.83 \pm 0.50 a	41.84 \pm 0.38 a	41.77 \pm 0.36 a	42.14 \pm 0.40 a

Means within rows with the same letter are not significantly different by repeated measure analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test ($P < 0.05$).

value being observed on plants supplied with 2.0 g/l of ammonium nitrate. The mealybug survivorship was lowest on unfertilized plants, whereas the highest survival rate was detected on vines provided with 1.0 and 2.0 g/l of ammonium nitrate ($F_{4,15} = 8.47$; $P < 0.001$; table 2).

The body size of ovipositing females was significantly smaller ($F_{4,395} = 6.45$; $P < 0.001$), and the fecundity was lower ($F_{4,395} = 3.46$; $P = 0.009$) on mealybugs reared on unfertilized vines (table 2). The mean fertility was higher than 95% in all the treatments and was not affected by nitrogen regimes ($F_{4,95} = 0.81$; $P = 0.521$; table 2).

All the investigated life parameters of *P. ficus* except the fertility were significantly related to SPAD values

of grapevines. The development time was inversely correlated with the nitrogen concentration on leaves, as assessed by SPAD readings ($r^2 = 0.352$; $F_{1,18} = 9.77$; $P = 0.006$; table 3). Conversely, the vine mealybug survivorship ($r^2 = 0.330$; $F_{1,18} = 8.88$; $P = 0.008$), body size ($r^2 = 0.238$; $F_{1,18} = 5.62$; $P = 0.029$) and fecundity ($r^2 = 0.348$; $F_{1,18} = 9.59$; $P = 0.006$) increased linearly with the nitrogen content on leaves.

Screenhouse experiment

Under seminatural conditions, the development time decreased significantly from mealybugs reared on unfertilized plants to those developed on plants

Table 2 Life-history parameters (mean \pm SE) of *Planococcus ficus* on vines supplied with different nitrogen regimes under laboratory conditions

Treatment (g/l ammonium nitrate)	Mean development time (days \pm SE)	Mean survival (% \pm SE)	Mean body size (mm \pm SE)	Mean fecundity (n. eggs \pm SE)	Mean fertility (% \pm SE)
0	30.19 \pm 0.39 a	22.37 \pm 3.16 b	2.31 \pm 0.04 b	74.18 \pm 5.49 b	97.58 \pm 1.13 a
0.25	27.63 \pm 0.23 b	42.26 \pm 7.75 ab	2.57 \pm 0.04 a	95.30 \pm 4.67 a	97.21 \pm 1.09 a
0.50	27.29 \pm 0.20 b	41.43 \pm 4.87 ab	2.47 \pm 0.05 a	99.29 \pm 4.95 a	97.28 \pm 1.56 a
1.0	27.59 \pm 0.32 b	53.86 \pm 2.24 a	2.48 \pm 0.05 a	91.36 \pm 5.59 a	95.30 \pm 2.37 a
2.0	26.19 \pm 0.24 c	59.24 \pm 4.93 a	2.61 \pm 0.04 a	94.86 \pm 5.59 a	99.20 \pm 0.31 a

Means within columns with the same letters are not significantly different by analysis of variance followed by Tukey's comparison test ($P < 0.05$).

Life parameters	Slope (\pm SE)	Intercept	F	d.f.	r ²	P ^a
Development time (days)	-0.6191 \pm 0.1981	49.6196	9.77	1,18	0.352	0.006*
Survival (%)	0.0490 \pm 0.0165	-1.2922	8.88	1,18	0.330	0.008*
Body size (mm)	0.0505 \pm 0.0213	0.7047	5.62	1,18	0.238	0.029*
Fecundity (n. eggs)	5.1158 \pm 1.6520	-89.6975	9.59	1,18	0.348	0.006*

^aAsterisks (*) indicate significant correlation between variables by regression analysis ($P < 0.05$).

Table 3 Regression parameters and statistics of the relationship between life-history parameters of *Planococcus ficus* reared on grapevines under laboratory conditions and SPAD values**Table 4** Life-history parameters (mean \pm SE) of *Planococcus ficus* on vines supplied with different nitrogen regimes under screenhouse conditions

Treatment (g/l ammonium nitrate)	Mean development time (days \pm SE)	Mean survival (% \pm SE)	Mean body size (mm \pm SE)	Mean fecundity (n. eggs \pm SE)
0	43.50 \pm 0.87 a	0.83 \pm 0.34 b	1.76 \pm 0.03 c	22.00 \pm 1.63 d
0.25	38.09 \pm 0.72 ab	9.11 \pm 2.19 ab	2.20 \pm 0.06 bc	42.93 \pm 4.70 c
0.50	37.75 \pm 1.37 ab	4.97 \pm 2.79 ab	2.45 \pm 0.05 ab	48.00 \pm 3.45 bc
1.0	37.50 \pm 0.55 b	9.53 \pm 3.13 ab	2.47 \pm 0.05 a	62.39 \pm 5.53 b
2.0	32.94 \pm 0.47 c	14.91 \pm 3.58 a	2.67 \pm 0.04 a	81.86 \pm 4.94 a

Means within columns with the same letters are not significantly different by analysis of variance followed by Tukey's comparison test ($P < 0.05$).

supplied with 2.0 g/l of nitrogen ($F_{4,177} = 17.21$; $P < 0.001$; table 4). Nitrogen regimes significantly affected the mealybug survival ($F_{4,15} = 3.96$; $P = 0.022$), with the lowest rate observed on untreated plants and the highest survivorship recorded on plants receiving 2.0 g/l of ammonium nitrate. The largest mealybugs were collected from plants fertilized with 1.0 and 2.0 g/l of nitrogen, as compared to those observed on unfertilized plants ($F_{4,177} = 14.84$; $P < 0.001$). Similarly, the fecundity of mealybugs significantly increased in highly fertilized vines ($F_{4,177} = 11.79$; $P < 0.001$; table 4). To allow a solid statistical comparison among treatments, the fertility was not assessed as insufficient adult females were collected in some plants.

Similar to the laboratory experiment, regression analyses between SPAD values and the selected

vine mealybug parameters were always significantly correlated ($P < 0.05$; table 5), showing that survival ($r^2 = 0.307$; $F_{1,18} = 7.99$; $P = 0.011$), body length ($r^2 = 0.532$; $F_{1,18} = 20.46$; $P < 0.001$) and fecundity ($r^2 = 0.451$; $F_{1,18} = 14.81$; $P = 0.001$) increased at higher nitrogen concentrations on leaves, whereas development time ($r^2 = 0.224$; $F_{1,18} = 5.19$; $P = 0.035$) was inversely related to the nitrogen content.

Discussion

The grapevine nitrogen fertilization significantly influenced the investigated parameters of *P. ficus* except the fertility, showing consistent results in both laboratory and screenhouse conditions. The development time was negatively correlated with nitrogen

Table 5 Regression parameters and statistics of the relationship between life-history parameters of *Planococcus ficus* reared on grapevines under screenhouse conditions and SPAD values

Life parameters	Slope (\pm SE)	Intercept	F	d.f.	r ²	p ^a
Development time (days)	-0.9468 \pm 0.4157	76.5412	5.19	1,18	0.224	0.035*
Survival (%)	0.0151 \pm 0.0053	-0.5379	7.99	1,18	0.307	0.011*
Body size (mm)	0.1160 \pm 0.0256	-2.3967	20.46	1,18	0.532	<0.001*
Fecundity (n. eggs)	6.8123 \pm 1.7701	-226.4930	14.81	1,18	0.451	0.001*

^aAsterisks (*) indicate significant correlation between variables by regression analysis ($P < 0.05$).

fertilization, with mealybugs reared on grapevines supplied with high nitrogen rates developing faster than those on unfertilized plants. The time from first-instar nymph to ovipositing female was lower in the laboratory trial than under seminatural conditions, as immatures developed in a range of temperatures (22.8–31.5°C) close to optimal conditions. On the other hand, the lowest and highest temperatures during the screenhouse experiment (14.7–38.4°C) were close to or beyond the lower and upper development thresholds of *P. ficus*, thus prolonging the development time. The developmental biology of *P. ficus* was studied at constant temperatures yielding different results. Walton and Pringle (2005) assessed the lower, optimum and upper development temperatures as 16.59, 27.84 and 35.61°C, respectively. Conversely, Varikou et al. (2010) estimated lower and upper development thresholds as 14.30 and 32.51°C, respectively, and the optimal temperature as 27.00°C, attributing disparities to the different experimental conditions (grapevine cultivar, photoperiod, host plant part used as substrate). A positive influence of nitrogen fertilization on development time was observed in other phloem-feeding insects, such as *P. citri* and *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Hogendorp et al. 2006; Wang et al. 2006), whereas no significant effect was observed on *Macrosiphum pisi* (Kalt.) reared on garden peas (Barker and Tauber 1951).

The mealybug survival significantly increased at higher nitrogen regimes in both experiments. Lower values were observed in the screenhouse trial, as during their development, mealybugs were exposed to lower and higher temperatures than during the laboratory experiment. As natural enemies were excluded in both experiments, the observed mortality was attributed to abiotic factors and/or plant nutritional conditions. Higher mortality on unfertilized or low-fertilized plants could be due to nutritional limitations, as observed on *Bemisia tabaci* Gennadius reared on poinsettia (Bentz et al. 1995).

The size of ovipositing mealybugs was positively correlated with the nitrogen applied to grapevines, and bigger *P. ficus* females showed higher fecundity in both experiments, similar to observations on

other mealybugs such as *P. citri* and *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn) (Grimes and Cone 1985; Hogendorp et al. 2006). The nitrogen supply had a stimulating effect on *P. ficus* fecundity, which was not significantly different among fertilized treatments in the laboratory trial, yet increased linearly at higher nitrogen rates in the screenhouse trial. The larger number of eggs laid by mealybugs reared on high nitrogen-fertilized grapevines might be due to the higher nutritional value of phloem sap, which led to a higher reproductive performance of ovipositing females (White 1993). The fecundity observed during the experiments was lower than that recorded in other studies (Cocco et al. 2011; Waterworth et al. 2011), in which mealybug females oviposited more than 150 eggs. However, those studies applied different experimental setups, considering that mealybugs oviposited freely inside arenas or plastic containers. Our findings are consistent with results observed in other phloem-sucking pests, including *P. citri* and *P. maidis* (Hogendorp et al. 2006; Wang et al. 2006), whereas higher rates of nitrogen did not increase pest fecundity of greenhouse whiteflies and *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Bentz et al. 1995; Moon et al. 1995; Jauset et al. 2000).

In this study, increasing nitrogen fertilization levels applied weekly to vines significantly affected body size and some life-history parameters of *P. ficus*. However, the fertilizer application strategy could also have affected the result. For example, Jansson and Smilowitz (1986) observed a faster development of *Myzus persicae* (Sulzer) on potato when ammonium nitrate was applied as a single dose. Other studies showed that the uptake and translocation of nitrogen by grapevines is affected by time of application (Conradie 1986), and this could influence the pest development.

High nitrogen regimes affect the development of fungal diseases by reducing grapevine resistance to powdery mildew, grey mould and downy mildew (Bavaresco and Eihach 1987; R'Houma et al. 1998). In highly fertilized vines, alterations in the biochemical mechanisms that slow the pathogenesis process

and decrease synthesis of phytoalexins were observed (Bavaresco and Eihach 1987).

The nitrogen fertilization is one of the most important cultural practices in viticulture and is essential for grapevine vegetative growth, crop yield, must composition and wine quality (Spayd et al. 1994; Keller et al. 1998). Different nitrogen regimes are needed to produce high-quality red or white wines, also depending on soil characteristics and climatic conditions (van Leeuwen and Seguin 2006). Low nitrogen fertilization rates increased the quality of red wines (e.g. Cabernet Sauvignon) by reducing the grapevine vigour and enhancing the phenolic content of berries and wine (Choné et al. 2001). Conversely, moderate and regular nitrogen supply increased the aroma potential of grapes for the production of white wines (e.g. Sauvignon blanc; Peyrot des Gachons et al. 2005).

In conclusion, nitrogen fertilization affects the quality and quantity of crop yield, uptake and tissue concentration of other nutrients (Wolf et al. 1983), and development of diseases. In addition, our findings showed the influence of nitrogen on body size, development time, survival and fecundity of *P. ficus* reared on grapevines. Therefore, rational fertilization plans should take into account not only soil composition and plant uptake (Bavaresco et al. 2010), but also the potential damage by pests and diseases and be implemented in grapevine IPM programmes. To reach more practical results, further applied studies will be carried out comparing nitrogen rates used in commercial vineyards, to determine the optimal doses that are unfavourable to mealybug population build-up, and ensuring at the same time high quantitative and qualitative production of grapes.

Acknowledgements

The authors thank Tiziana Nuvoli and Massimiliano Giuseppe Mameli for technical assistance. This research was funded in part by APQ Filiera Vitivinicola (Project SQFVS, CONVISAR) and Autonomous Region of Sardinia.

References

- Barker JS, Tauber OE, 1951. Fecundity of and plant injury by the pea aphid as influenced by nutritional changes in the garden pea. *J Econ Entomol*, 44, 1010–1012.
- Bavaresco L, Eihach R, 1987. Investigations on the influence of N fertilizer on powdery mildew (*Oidium tuckeri*), downy mildew (*Plasmopara viticola*) and on phytoalexin synthesis in different grapevine varieties. *Vitis*, 26, 192–200.
- Bavaresco L, Gatti M, Fregoni M, 2010. Nutritional deficiencies. In: Methodologies and results in grapevine research. Ed. by Delrot S, Medrano H, Or E, Bavaresco L, Grando S, Springer, Dordrecht, 165–191.
- Ben-Dov Y, 1994. A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae, and Putoidae) with data on geographical distribution, host plants, biology, and economic importance. Intercept Ltd., Hampshire.
- Bentz JA, Reeves J III, Barbosa P, Francis B, 1995. Nitrogen fertilizer effect on selection, acceptance, and suitability of *Euphorbia pulcherrima* (Euphorbiaceae) as a host plant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ Entomol*, 24, 40–45.
- Bethke JA, Redak RA, Schuch UK, 1998. Melon aphid performance on chrysanthemum as mediated by cultivars, and different levels of fertilization and irrigation. *Entomol Exp Appl*, 88, 41–47.
- Bi JL, Lin DM, Lii KS, Toscano NC, 2005. Impact of cotton planting date and nitrogen fertilization on *Bemisia argentifolii* populations. *Insect Sci*, 12, 31–36.
- Cabaleiro C, Segura A, 1997. Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Dis*, 81, 283–287.
- Calatayud PA, Polania MA, Guillaud J, Mùnera DF, Hamon JC, Bellotti AC, 2002. Role of single amino acids in phagostimulation, growth, and development of the cassava mealybug *Phenacoccus herreni*. *Entomol Exp Appl*, 104, 363–367.
- Charles JG, Cohen D, Walker JTS, Forgie SA, Bell VA, Breen KC, 2006. A review of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3). *N Z Plant Prot*, 59, 330–337.
- Chiotta ML, Ponsone ML, Torres AM, Combina M, Chulze SN, 2010. Influence of *Planococcus ficus* on *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A incidence in vineyards from Argentina. *Lett Appl Microbiol*, 51, 212–218.
- Choné X, van Leeuwen C, Chéry P, Ribéreau-Gayon P, 2001. Terroir influence on water status and nitrogen status of non irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): vegetative development, must and wine composition. *S Afr J Enol Vitic*, 22, 8–15.
- Cisneros JJ, Godfrey LD, 2001. Midseason pest status of the cotton aphid (Homoptera: Aphididae) in California cotton: is nitrogen a key factor? *Environ Entomol*, 30, 501–510.
- Cocco A, Coinu M, Lentini A, Serra G, Delrio G, 2011. Mating disruption field trials to control the vine mealybug *Planococcus ficus*. *IOBC/WPRS Bull*, 67, 215–221.
- Cocco A, Marras PM, Nuvoli T, Mameli MG, Lentini A, 2013. Preliminary results on the influence of nitrogen fertilization on the development of *Planococcus citri* and *Planococcus ficus* on grapevine. *IOBC/WPRS Bull*, 85, 19–24.

- Cocco A, Lentini A, Serra G, 2014. Mating disruption of the vine mealybug, *Planococcus ficus*, in vineyards using reservoir pheromone dispensers. *J Insect Sci*, 14, 144.
- Conradie WJ, 1986. Utilization of the grape-vine as affected by time of application and soil type. *S Afr J Enol Vitic*, 7, 76–83.
- Daane KM, Bentley WJ, Walton VM, Malakar-Kuenen R, Millar JG, Ingels CA, Weber EA, Gispert C, 2006. New controls investigated for vine mealybug. *Calif Agric*, 60, 31–38.
- Daane KM, Almeida RPP, Bell VA, Walker JTS, Botton M, Fallahzadeh M, Mani M, Miano JL, Sforza R, Walton VM, Zaviezo T, 2012. Biology and management of mealybugs in vineyards. In: *Arthropod management in vineyards: pests, approaches, and future directions*. Ed. by Bostanian NJ, Charles V, Isaacs R, Springer, Dordrecht, 271–307.
- Dalla Montà L, Duso C, Malagnini V, 2001. Current status of scale insects (Hemiptera: Coccoidea) in the Italian vineyards. *Boll Zool Agr Bachic*, 33, 343–350.
- Demontis MA, Ortu S, Cocco A, Lentini A, Migheli Q, 2007. Diagnostic markers for *Planococcus ficus* (Signoret) and *Planococcus citri* (Risso) by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. *J Appl Entomol*, 131, 59–64.
- von Dohlen CD, Kohler S, Alsop ST, McManus WR, 2001. Mealybug β -proteobacterial endosymbionts contain γ -proteobacterial symbionts. *Nature*, 412, 433–436.
- Fischer K, Fiedler K, 2000. Response of the copper butterfly *Lycaena tityrus* to increased leaf nitrogen in natural food plants: evidence against the nitrogen limitation hypothesis. *Oecologia*, 124, 235–241.
- Grattan SR, 2002. Irrigation water salinity and crop production. ANR Publication 8066, University of California, Oakland, CA.
- Grimes EW, Cone WW, 1985. Life history, sex attraction, mating, and natural enemies of the grape mealybug, *Pseudococcus maritimus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Ann Entomol Soc Am*, 78, 554–558.
- Hacker SD, Bertness MD, 1995. A herbivore paradox: why salt marsh aphids live on poor-quality hosts. *Am Nat*, 145, 192–210.
- Hogendorp BK, Cloyd RA, Swiader JM, 2006. Effect of nitrogen fertility on reproduction and development of citrus mealybug, *Planococcus citri* Risso (Homoptera: Pseudococcidae), feeding on two colors of coleus, *Solenostemon scutellarioides* L. Codd. *Environ Entomol*, 35, 201–211.
- Hunt DWA, Drury CF, Maw HEL, 1992. Influence of nitrogen on the performance of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on tomato. *Environ Entomol*, 21, 817–821.
- Jansson RK, Smilowitz Z, 1986. Influence of nitrogen on population parameters of potato insects: abundance, population growth, and within-plant distribution of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Environ Entomol*, 15, 49–55.
- Jansson RK, Leibe GL, Sanchez CA, Lecrone SH, 1991. Effects of nitrogen and foliar biomass on population parameters of cabbage insects. *Entomol Exp Appl*, 61, 7–16.
- Jauset AM, Sarasua MJ, Avilla J, Albajes R, 2000. Effect of nitrogen fertilization level applied to tomato on the greenhouse whitefly. *Crop Prot*, 19, 255–261.
- Karamaouna F, Kimbaris A, Michaelakis A, Papachristos D, Polissiou M, Papatsakona P, Tsora E, 2013. Insecticidal activity of plant essential oils against the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *J Insect Sci*, 13, 142.
- Kehr J, 2006. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *J Exp Bot*, 57, 767–774.
- Keller M, Arnink KJ, Hrazdina G, 1998. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. I. Effect on grapevine growth, fruit development, and ripening. *Am J Enol Vitic*, 49, 333–340.
- Koricheva J, Larsson S, Haukioja J, 1998. Insect performance on experimentally stressed woody plants: a meta-analysis. *Annu Rev Entomol*, 43, 195–216.
- Leather SR, 1994. Life history traits of insect herbivores in relation to host quality. In: *Insect-plant interactions*, Vol. 5. Ed. by Bernays EA, CRC Press, Boca Raton, FL, 176–207.
- van Leeuwen C, Seguin G, 2006. The concept of terroir in viticulture. *J Wine Res*, 17, 1–10.
- Lentini A, Serra G, Ortu S, Delrio G, 2008. Seasonal abundance and distribution of *Planococcus ficus* on grape vine in Sardinia. *IOBC/WPRS Bull*, 36, 267–272.
- Mansour R, Grissa Lebdi K, Rezgui S, 2010. Assessment of the performance of some new insecticides for the control of the vine mealybug *Planococcus ficus* in a Tunisian vineyard. *Entomol Hell*, 19, 21–33.
- Mattson WJ, 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen. *Annu Rev Ecol Syst*, 11, 119–161.
- Mattson WJ, Haack RA, 1987. Role of drought in outbreaks of plant-eating insects. *Bioscience*, 37, 110–118.
- Moon CE, Lewis BE, Murray L, Sanderson SM, 1995. Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) development, reproduction, and longevity on hydroponically grown wheat with varying nitrogen levels. *Environ Entomol*, 24, 367–371.
- Nevo E, Coll M, 2001. Effect of nitrogen fertilization on *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae): variation in size, color, and reproduction. *J Econ Entomol*, 94, 27–32.
- Peyrot des Gachons C, van Leeuwen C, Tominaga T, Soyer JP, Gaudillere JP, Dubourdieu D, 2005. The influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc in field conditions. *J Sci Food Agric*, 85, 73–85.

- Porro D, Dorigatti C, Stefanini M, Ceschini A, 2001. Use of SPAD meter in diagnosis of nutritional status in apple and grapevine. *Acta Hort*, 564, 243–252.
- Prestidge RA, McNeill S, 1983. The role of nitrogen in the ecology of grassland Auchenorrhyncha. In: Nitrogen as an ecological factor. Ed. by Lee JA, McNeill S, Rorison IH, Blackwell, Oxford, 257–281.
- Rae DJ, Jones RE, 1992. Influence of host nitrogen levels on development, survival, size and population dynamics of sugarcane mealybug, *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) (Homoptera: Pseudococcidae). *Aust J Zool*, 40, 327–342.
- Rhoades DF, 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: Herbivores – their interaction with secondary plant metabolites. Ed. by Rosenthal GA, Janzen H, Academic Press, New York, NY, 3–54.
- R’Houma A, Cherif M, Boubaker A, 1998. Effect of nitrogen fertilizing, green pruning and fungicide treatments on Botrytis bunch rot of grapes. *J Plant Pathol*, 80, 115–124.
- Ross L, Dealey EJ, Beukeboom LW, Shuker DM, 2011. Temperature, age of mating and starvation determine the role of maternal effects on sex allocation in the mealybug *Planococcus citri*. *Behav Ecol Sociobiol*, 65, 909–919.
- Rotundo G, Tremblay E, 1982. Hybridization and sex-pheromone responses in two closely related mealybug species (Homoptera: Pseudococcidae). *Syst Entomol*, 7, 475–478.
- SAS Institute, 2008. SAS/ETS® 9.2 user’s guide. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Shaahan MM, El-Sayed AA, Abou El-Nour EAA, 1999. Predicting nitrogen, magnesium and iron nutritional status in some perennial crops using a portable chlorophyll meter. *Sci Hortic*, 82, 339–348.
- Slosser JE, Pinchak WE, Rummel DR, 1998. Biotic and abiotic regulation of *Aphis gossypii* Glover in west Texas dryland cotton. *Southwest Entomol*, 23, 31–65.
- Spayd S, Wample R, Evans R, Stevens R, Seymour B, Nagel C, 1994. Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am J Enol Vitic*, 45, 34–41.
- Varikou K, Birouraki A, Bagis N, Kontodimas DC, 2010. Effect of temperature on the development and longevity of *Planococcus ficus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Ann Entomol Soc Am*, 103, 943–948.
- Walton VM, Pringle KL, 2004. Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Homoptera: Pseudococcidae), a key pest in South African vineyards. A review. *S Afr J Enol Vitic*, 25, 54–62.
- Walton VM, Pringle KL, 2005. Developmental biology of vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Homoptera: Pseudococcidae), and its parasitoid *Coccidoxenoides perminutus* (Timberlake) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Afr Entomol*, 13, 143–147.
- Walton VM, Daane KM, Bentley WJ, Millar JG, Larsen TE, Malakar-Kuennen R, 2006. Pheromone-based mating disruption of *Planococcus ficus* (Homoptera: Pseudococcidae) in California vineyards. *J Econ Entomol*, 99, 1280–1290.
- Wang JJ, Tsai JH, Broschat TK, 2006. Effect of nitrogen fertilization of corn on the development, survivorship, fecundity and body weight of *Peregrinus maidis* (Hom., Delphacidae). *J Appl Entomol*, 130, 20–25.
- Waterworth RA, Wright IM, Millar JG, 2011. Reproductive biology of three cosmopolitan mealybug (Homoptera: Pseudococcidae) species, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni*, and *Planococcus ficus*. *Ann Entomol Soc Am*, 104, 249–260.
- White TCR, 1984. The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia*, 63, 90–105.
- White TCR, 1993. The inadequate environment – nitrogen and the abundance of animals. Springer, Berlin.
- Wolf TK, Heaseler CW, Bergman EL, 1983. Growth and foliar elemental composition of Seyvel Blanc grapevines as affected by four nutrient solution concentration of nitrogen, potassium and magnesium. *Am J Enol Vitic*, 34, 271–277.
- Ziegler H, 1975. Nature of transported substances. In: Encyclopedia of plant physiology. Volume 1. Transport in plants I, Phloem transport. Ed. by Zimmermann MH, Milburn JA, Springer-Verlag, Berlin, 59–100.

Chapter II

*Total ground cover in Mediterranean vineyards: effects on the development
of the vine mealybug and grapevine yield and quality*

Ready to be submitted to: **Agriculture, Ecosystems & Environment** as:

E. Muscas, A. Cocco, L. Mercenaro, A. Mura, G. Nieddu, A. Lentini

*Total ground cover in Mediterranean vineyards: effects on the development of the vine
mealybug and grapevine yield and quality*

I collected and analyzed most of the data and contributed to writing the manuscript

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Abstract

The influence of total cover crops on developmental and reproductive parameters of the vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) was evaluated in a two-year field trial in a commercial vineyard in northwestern Sardinia. Concurrently, the grapevine growth, yield and quality of berries were determined. The investigated total cover crops (natural covering, legume mixture and permanent grass cover) were compared with conventional soil tillage, selected as reference treatment.

The examined *P. ficus* biological parameters were affected by the floor covering in both years, with faster development time and higher survival, fecundity and fertility of mealybugs developed under legume and tillage conditions. The vine mealybug showed higher performance on grapevines with higher nitrogen content and vigor. Ground covers competed with grapevines for water and nutrients, resulting in a lower food quality for *P. ficus*. In addition, the floor vegetation competition reduced the crop yield and affected some quality parameters of berries. In particular, grass covering increased the content of sugar, anthocyanins and polyphenols, improving the general quality of must. Total cover cropping strongly affected the trophic system grapevine – pest and, if optimized, can improve the yield quality and create unfavorable conditions to *P. ficus* development.

Keywords: *Planococcus ficus*, mealybug development, mealybug fecundity, *Vitis vinifera*, berry composition, tillage.

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Introduction

Cover cropping is an important ecological vineyard management tool. The beneficial effects of this techniques are well known and several goals may be reached through cover cropping as, for example, soil erosion control, nitrogen and organic matter management, control of grapevine vigor, improved soil structure. In the Mediterranean region, where viticulture is strongly affected by rainfall seasonality, a large number of experiments has been carried out to evaluate the hydrological competition between herbaceous plants and vine, to better define the response on vegetative growth, yield, berry and wine quality of vineyards subjected to different cover crop management (Monteiro and Lopes, 2007; Guerra and Steenwerth, 2012; Mercenaro et al., 2014). After a period of hesitation, nowadays viticulture consultants and enologists advise to use cover crops even in Mediterranean areas. The most commonly used cover crops belong to the Poaceae (cereals or grasses) and the Fabaceae (legumes) families (Guerra and Steenwerth, 2012), although a large number of vineyards are covered by permanent resident vegetation (Colugnati et al., 2004). Obviously, in order to attain the potential benefits of covering, it is a key point to select accurately the correct species and varieties. In an attempt to achieve several benefits simultaneously, cover crops are often a mix of grasses, legumes and other forbs (Guerra and Steenwerth, 2012). In fact, legumes colonize more rapidly the soil and improve soil fertility due to their capacity to fix atmospheric nitrogen, while grasses are able to provide a large amount of biomass that can help increase vineyard organic matter over time and reduce soil compaction (Colugnati et al., 2004). As it appears in the bibliography, the floor management technique is widely spread but limited to inter-rows alleys (Gontier et al., 2011), while the weeds along the row are generally controlled by herbicide. However, the continued use of herbicides over time is bringing to weed resistance to

herbicides (Powles et al., 1997), accumulation in the soil and contamination of groundwater (Thurman et al., 1996).

Mainly for environmental reason, a new integrated cultivation set of rules is mandatory from 2014 in the EU countries (European Union, 2009); according to this new obligation, the use of numerous current herbicides and pesticides is forbidden (Mercenaro et al., 2014). Many of the critical environmental issues associated with production in agriculture are directly affected by floor management practices. Protecting surface and ground water quality, minimizing soil erosion and reducing the risk to workers and environment from agricultural chemicals, are all issues that can be solved by best management practices (Bettiga et al., 2009). New regulation and environmental issues led grape growers to find new strategies to manage weeds along the row. Total grass cover in vineyard, where cover crop is present between and along the rows, can be a management tool that, avoiding herbicides during the crop cycle, can bring vineyards closer to natural conditions.

Few authors report information regarding influence of total grass cover on grapevine, especially when cultivated in semi arid conditions. Van Huyssteen and Weber (1980), working on Chenin blanc in South Africa, affirm that a vineyard under dryland conditions must be free of weed competition during the growing season of the vines, otherwise practices in which weeds and/or cover crops are only controlled, but not killed, will result in a serious decrease in vegetative growth and yield. At the opposite, Ferrini et al. (1996) in a vineyard cv. Sangiovese in Italy, comparing soil tilled with different ground covers, claim that grape quality was improved by using a permanent cover crop, regardless of the kind of the plant cover tested. Tesic et al. (2007) report that completely covered floor altered canopy architecture and reduced vine vigor and yield in cv. Chardonnay via reduced water availability, but only after cover crop has been imposed for two or three years. Similar results were found from Gontier et al. (2011) where, after four years of study, total grass

cover does not seem to be a soil management technique suitable for vineyard with medium to high production goal.

Habitat manipulation to promote pest control can be achieved through improvements in the natural enemy complex (top-down effects) or via the food resource (bottom-up effects) (Landis et al., 2000). The management of ground covers, such as seeded cover crops or natural vegetation, is an important element of integrate pest management of pests and pathogens in agroecosystems. Grapevines with lower vegetative growth, as a consequence of competition with intercropped perennial grass cover crop, exhibited a lower grey mould incidence (Valdés-Gómez et al., 2008). Plant diversity at field and landscape scale influences orchard pest control mostly positively but also negatively in some cases (Simon et al., 2010; Veres et al., 2013). In California, a reduced abundance of *Erythroneura* leafhoppers and thrips was observed in an organic vineyard managed with a summer cover crop, concurrently with increased populations of generalist predators (Nicholls et al., 2000). In addition, mowing of cover crops forced parasitoids and predators to move to surrounding grapevines, resulting in a decline of leafhopper population. In cover-cropped vineyards, higher population abundance of ants was observed, as ant nesting is not disrupted by soil tillage (Serra et al., 2006). Density of tending ants is positively related with that of mealybugs, as ants develop a mutualistic association with mealybugs protecting the pest from natural enemies in return for honeydew thereby favoring the pest population increase (Daane et al., 2007; Mgocheki and Addison, 2010; Mansour et al., 2012). Other studies pointed out a significant reduction in leafhopper density in cover cropped vineyards (Daane and Costello, 1998; Costello and Daane, 2003), although the difference was due to the lower food quality for leafhoppers. In fact, cover cropped grapevines showed a lower plant vigor, highlighted by a lower pruning weight and concentration of nitrogen on petioles.

Since cover crops affect the plant vigor and could indirectly influence the pest abundance, we studied the effects of the soil management on development and reproductive parameters of the vine mealybug, *Planococcus ficus* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae), which is a key pest widespread in the main wine and table grape areas. *Planococcus ficus* severely reduce the economic yield of table grape and the quality of wine grape, in addition of being a vector of several viruses and diseases (Daane et al., 2012). Chemical control is the standard method to reduce the pest density, although it is often unsatisfactory due to the fact that mealybugs prefer concealed locations under the bark or in the roots. Therefore, active ingredients with novel modes of action and more sustainable control strategies have been tested with promising results (Mansour et al., 2010; Cocco et al., 2014). In addition, cultural management practices in vineyards can effectively contribute in reducing the mealybug population density. Previous studies showed the indirect influence of soil fertilization the fitness of *P. ficus*, which exhibited a higher survival and fecundity and lower development time when reared on potted grapevines provided with increasing nitrogen rates (Cocco et al., 2015).

In the perspective of a more sustainable viticulture and a reduced use of herbicides, we investigated the effect of several total cover crops on the biology of the vine mealybug in a two-year survey conducted in a commercial vineyard under Mediterranean climatic conditions. Selected biological parameters of *P. ficus* were recorded, as well as grapevine growth and crop yield parameters and ground cover characteristics.

Materials and methods

Study site and experimental design

The experiment was carried out in 2014 and 2015, in a 17-years old commercial vineyard, cv. Carignano, located at 40 m a.s.l. in the Nurra Valley (40°33'28''44 N; 08°19'19''56 E), northwestern Sardinia (Italy). The vines are grafted onto 779 P rootstock, trained by a cordon spur pruned and spaced 2.7 m between rows and 1.0 m within rows. The site has relatively uniform soil that is calcareous alluvial, with an average depth of 60-70 cm, and the following physicochemical characteristics: sand 51.0%, clay 24.9%, silt 24.1%; pH = 7.44; organic matter content = 16 g kg⁻¹. Vines were drip-irrigated three times per year from late June to mid August (corresponding to about 700 m³ ha⁻¹ year⁻¹). The experimental vineyard is, characterized by a typical central Mediterranean climate, with mild winter and hot dry summer, and precipitations mostly occurring between October and May. Daily temperature, relative humidity and rainfall during the survey were recorded by a weather station placed in the experimental vineyard.

Before sowing, the soil was shallowly prepared by two passages at 25 cm and 15 cm depth, and subsequently fertilized with 10 N kg ha⁻¹, 14 P kg ha⁻¹ and 30 K kg ha⁻¹. The trial was conducted in a randomized complete block design with four replications, comparing the following soil management systems: (ST) soil tillage; (NC) natural covering dominated by annual grasses (about 80%); (LM) cover crop of legume mixture: *Medicago polymorpha* cv Anglona (50%) and *Trifolium yannanicum* cv Gosse (50%); (PG) cover crop by a summer semi-dormant perennial grass, *Dactylis glomerata* cv Currie (80%), and an annual self-reseeding grass, *Lolium rigidum* cv Nurra (20%).

Measurements were taken along 20 vines in the central of three adjacent rows forming each experimental plot. Cover crops were sowed between and within rows on October 2012 by hand,

using a seeding rate of 30 kg ha⁻¹ in LM, PG plots, and rolled immediately afterwards. No herbicide were used during the trial and weeds within the rows in ST were removed by hand hoeing.

Vine mealybug biological parameters

Mealybugs were obtained from a mass rearing colony maintained at the Department of Agricultural Sciences of the University of Sassari on sprouted potato inside Plexiglas cages (30 × 30 × 30 cm) with two sides covered with mesh for ventilation. The culture was maintained at 26 ± 1 °C, 60-70% RH, in constant darkness. Experimental plants were preliminarily inspected to ensure the absence of mealybugs in the canopy and under the bark. Then, vines were artificially inoculated with hatching eggs following a procedure modified from that of Cocco et al. (2015) in order to minimize *P. ficus* handling. A number of ovipositing females were placed with a sable-hair brush (gauge 000) in 2 × 2 cm cardboards and allowed to oviposit for 24 hours, after which females were removed and eggs were counted under a dissecting microscope by gently inspecting the cottony masses with a needle and divided in groups of 500. Egg batches were held in a growth chamber at 25 °C for 7 days and then used to infest three plants per plot by securing cardboards to the abaxial surface of 3-4 median leaves. The surveys started infesting grapevines on 30 May 2014 and 3 June 2015 and ended on 16 and 20 July in 2014 and 2015, respectively. During their development, mealybugs were protected from natural enemies by covering the artificially-infested leaves with a cage of spun-bonded polypropylene fabric (Agribon AG-15, 18.65 g m⁻², 90% light transmission) secured at both ends with plastic bands. Starting three weeks after egg release, all leaves, petioles and stems inside the cages were inspected daily and the first 20 females at the onset of oviposition were collected with a sable-hair brush (gauge 00) and placed inside plastic containers (length = 4.0 cm, diameter = 3.5 cm). The collection dates were registered in order to determine the development time from egg eclosion to ovipositing female. Mealybugs were allowed to oviposit inside the containers stored at

room temperature for two months, upon which the fecundity was determined under a dissecting microscope by counting the number of first instar nymphs and eggs, whereas the fertility was calculated as the percentage of hatched first-instar nymphs. The survival to adulthood was estimated by counting young and ovipositing mealybugs in each plant, whereas males could not be counted due to their small size and short lifespan. Therefore, the mealybug survival was estimated as follows: $[\text{adult females}/(\text{released first-instar nymphs} \times \text{percentage of egg females released})] \times 100$, assuming a percentage of female eggs of 60.3% (Cocco et al., 2015).

Grapevine and cover crop measurements

The content of nitrogen on leaves was estimated with the SPAD 502 Chlorophyll Meter (Minolta, Osaka, Japan), which is a non-destructive portable tool to measure the chlorophyll concentration on leaves. The nitrogen concentration on grapevine leaves is highly related with SPAD readings (Cocco et al., 2015). Estimation of leaf nitrogen content was carried out six and eight times in 2014 and 2015, respectively, by measuring on each plant infested with *P. ficus* mealybugs SPAD values on five leaves opposite to basal clusters.

Twenty vines per plot were evaluated for grapevine growth and productivity. The number of buds, shoots and clusters per vine were recorded in order to determine real and potential bud fertility. Thinning of shoots after bud break was necessary to eliminate supernumerary shoots. All the investigated grapevines were harvested on the same dates (7 October 2014 and 12 October 2015). At harvest, vine yield and yield composition (cluster and berry weights and number of cluster per vine) were determined by weighing ten clusters randomly chosen for each replicate and 10 berries randomly picked for each cluster. From veraison to harvest, 600 berries per plot were randomly collected every two weeks in order to assess the evolution of fruit composition. Berries were weighed, crushed and the total soluble solids (°Brix) and titratable acidity of juice was determined

in accordance with the procedures of Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2006). The total anthocyanins were evaluated by spectrophotometry, measuring ultraviolet absorption at 280 nm (Di Stefano and Cravero, 1991).

In winter, at the dormant season, the weight of the dry pruning wood was recorded in order to estimate the vegetative growth. Weight of pruning wood was also used to calculate the Ravaz Index (calculated as the ratio between crop yield and pruning wood).

Statistical analysis

Means of *P. ficus* biological parameters (development time, survival, fecundity and fertility) were compared using a general linear mixed model (PROC GLMM, SAS Institute 2008) using a normal and binomial distribution models for numerical and percentage data, respectively. Significantly different means were separated by Fisher's Least Significant Difference test ($P < 0.05$). Similarly, grapevine growth and yield data were analyzed separately for each year by a general linear mixed model followed by Fisher's test ($P < 0.05$). Patterns of SPAD values during the experiments were separated among treatments by repeated measure analysis of variance and Fisher's test ($P < 0.05$) (PROC MIXED, SAS Institute 2008). Data from plants affected by esca disease were not included in the statistical analyses.

Results

Climatic trends during the survey

Surveys on *P. ficus* were conducted in the same period of time (June-mid July) in 2014 and 2015, with a 4-day shift onwards in 2015, and lasted 48 and 47 days, respectively. In 2015, field trial was carried out at higher temperature, with overall mean and maximum temperatures of 22.2 and 28.5 °C (2014) and 23.4 and 31.7 °C (2015) (Fig. 1). Widest differences were observed in July, when the mean and maximum temperatures were 22.7 and 27.9 °C in 2014, compared to 27.2 and 36.5 °C, respectively, recorded in 2015. Relative humidity during the surveys ranged from 63% (June 2014) to 69.4% (June 2015) showing no clear difference between years. Rainfall was very low in both years, with a total precipitation of 22 and 10.1 mm in 2014 and 2015, respectively.

Vine mealybug biological parameters

All the investigated vine mealybug biological parameters were significantly affected by ground covers in both years. In 2014, the development time from hatching egg to ovipositing female of *P. ficus* was significantly longer in NC and PG, while the shortest development was observed on mealybugs feeding on ST grapevines (Table 1). Similarly, in 2015, mealybugs on NC and PG covering showed a significantly longer development time compared to those in ST and LM. The survival rate in 2014 showed a significant difference between NC and PG cover crop, while in 2015 the higher value was recorded in LM. In the first year of the survey, fecundity of mealybugs was significantly higher in mealybugs developed in ST and LM grapevines compared with those reared in NC. In the following year, the number of eggs oviposited by mealybugs in LM was significantly higher than that observed in ST treatment, which in turn was significantly different than that

recorded in NC and PG. The fertility was statistically higher in LM (2014 and 2015) and in ST plots (2015) compared to NC and PG.

Grapevine and cover crop measurements

SPAD values increased in 2014 from mid May to late June, thereby declining as the veraison started and maintaining constant in July (Fig. 2). All the treatment showed significantly different mean SPAD values, being ST the highest and NC the lowest (Table 2). However, considering the period of observation on mealybugs (late May- mid July), grapevines in ST and LM showed significantly higher SPAD reading. In 2015, the pattern SPAD reading was similar all treatments, as values increased in until late June, decreased until early August and increased reached a maximum in mid August (Fig. 2). ST and LM treatments showed significantly higher values compared to those of PG and NC plots (Table 2). The same statistical difference would be observed if considering the period of the pest trial.

Grapevine yield was statistically different between treatments during the trial. Soil traditionally managed, compared to the investigated cover crops, allowed higher plant production in both 2014 and 2015 (Table 3). For what concerns production levels of cropped treatments, vines on PG exhibited the lower values with respect to NC and LM vines. Regardless of imposed treatment, production in 2014 was lower compared to the second year of experiment. For instance, the yield of plants on PG was 1.98 and 3.02 kg vine⁻¹ in 2014 and 2015, respectively (Table 3). In relation to production components, the number of clusters per vine was statistically lower in PG crop, suggesting that the lower production observed also depended on a lower number of cluster per vine. The cluster weight was higher in ST plots in both years, while different cover crop techniques did not influence the bunch weight. Cluster weight was not affected by vintage. Berry weight ranged between 2.83 and 1.96 g in 2014 and 2.82 and 2.49 g in 2015. In both years, lower values were

observed in LM vines, while plants on NC plots showed significantly higher values. As cluster weight, changes berry weight concur to explain differences in grape yield.

Different soil management techniques influenced grapevine vigor, determined as the weight of pruning wood. In the first year, ST treatment showed values statistically higher than all the other treatments (0.8 kg vine⁻¹), with vines on PG exhibiting lower values (0.52 kg vine⁻¹). The Ravaz index did not seem affected by the different treatments. In vines undergoing experimental covering, the index resulted lower than that of vines conventionally managed (Table 3). Pruning weight and Ravaz index cannot be determined in 2015 as pruning will occur in January 2016.

The berry composition was significantly influenced by treatments, but not for all measured parameters (Table 4). In the first year, total soluble solids increased steadily in all treatments and at harvest, 127 DAA (Days After Anthesis), the sugar level detected on PG vines was statistically higher than LM and ST treatments. In 2015, ripening was delayed in the season and grapes were harvested 137 DAA. Similarly to the previous year, soluble solids were significantly higher on vines on PG (20.8 °Brix) than other treatments (Table 4). Titratable acidity at harvest was not significantly different among treatments in both years.

Total anthocyanins and polyphenols differed significantly among treatments (Table 4). Regarding the first experimental year, as for total anthocyanins, statistical differences were observed only at harvest time, when NC depressed the synthesis of the components responsible for the color in the berry resulting in a lower value (459.8 mg L⁻¹). In 2015, NC confirmed observations of the previous year, but in addition it has been observed that PG accumulated more total anthocyanins. For what concerns total polyphenols, at harvest time, grape in LM treatment exhibited significantly lower values in both years.

Discussion

All the investigated biological parameters of *P. ficus* were affected by the ground management system, in particular development time, fecundity and fertility. Mealybugs developed on grapevines managed with tillage and legume covering showed faster development and higher reproductive parameters, whereas those reared on vines with natural covering exhibited lower performance in terms of development time, fecundity and fertility. Results were generally consistent in both years. Irrespective of the imposed treatment, the development time slightly decreased in 2015, while both fecundity and fertility were lower compared with 2014. This was probably due to different patterns and regimes of temperature that depressed the investigated reproductive parameters of ovipositing females. Changes in temperature conditions greatly affect development and longevity of the vine mealybug (Walton and Pringle, 2005; Varikou et al., 2010).

The soil management system had a significant influence the nitrogen content on grapevines. Plants were not subject at all to nutrient competition in tilled plots, while in the legume covering fixed symbiotically nitrogen was provided to grapevines by *Medicago* and *Trifolium* cover. Conversely, natural and grass cover crops competed with grapevines for nitrogen, thereby negatively affecting its concentration on leaves. Increased pest performance was observed on mealybugs developed on plants with higher leaf nitrogen content and vigor, in accordance with findings on *P. ficus* on potted grapevines (Cocco et al., 2015). Similarly, higher leaf nitrogen concentration resulted in higher fecundity and body size and shorter development time in the congeneric species *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae) on coleus (Hogendorp et al., 2006). The higher nutritional value of phloem sap concurred to increase the number of eggs laid and the eclosion rate (White, 1993).

Legume and grass ground covers intercropped with cash crops can cause nutrient competition, thereby modifying the phenology of the host plants and the pest development. Soybean grown with an alfalfa living mulch exhibited smaller size and lower nitrogen concentration, resulting in a reduced intrinsic growth rate of *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae) (Schmidt et al., 2007). Similarly, Lundgren and Fergen (2010) observed a shorter development time and smaller size of *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), developed in a maize crop planted after a winter grass cover crop. However, the response of pests to plant vigor cannot be generalized. For instance, the nutrient competition between Brussels sprout and intercropped malting barley increased food consumption and growth rate on *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae), but in contrast reduced the population density of *Brevicoryne brassicae* L. (Heteroptera: Aphididae) (Bukovinszky et al., 2004).

In our study, the cover crop management system affected development and reproductive parameters of *P. ficus* through a bottom-up regulation process, as grass and natural covering reduced grape growth and nitrogen content. Similarly, reduction of leafhopper populations in cropped vineyards has been related to reduced host quality, as a consequence of nutritional competition between grapevines and cover crop (Costello and Daane 2003). A bottom-up integrated pest management program, based on habitat management, cultural practices, and a minimum use of pesticides, proved to be effective in a commercial apple orchard in a long term trial (Prokopy, 2003).

Cover crops can influence the development of insect populations by harboring and sheltering pests and beneficials. For instance, floor vegetation increases the abundance of generalist predators such as spiders (Daane and Costello, 1998; Nicholls et al., 2000). Conversely, higher density of pests due to the ground management system was observed in intercropped peach orchards, where winter annual grass shelter catfacing bugs which migrate to peach flowers causing fruit damage (Meagher and Meyer, 1990). In addition, presence of untilled soil in vineyards promote ant nesting and

increase their population density (Serra et al., 2006). Many species of ants disrupt the activity of the vine mealybug parasitoid complex, resulting in higher pest *P. ficus* infestation (Mgocheki and Addison, 2010).

The choice of cover crop species should consider their potential harboring of stolbur phytoplasma (bois noir), transmitted by *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera: Cixiidae) (Maixner et al., 2001). The potential cover crop species *Dianthus deltoids* L., *Lotus corniculatus* L., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, and *Vicia villosa* Roth were successfully inoculated by *H. obsoletus* and should therefore be excluded in cover crop mixtures. Conversely, a selected green cover compared to bare soil could effectively reduce the *H. obsoletus* population density, as a consequence of reduced density of host species of the pest, among which *Convolvulus arvensis* L. and *Urtica dioica* L. (Maixner, 2007). In our study, legume and grass mixtures were of *M. polymorpha* – *T. yanninicum* and *D. glomerata* – *L. rigidum*, respectively, that are not listed as potential vectors of bois noir disease.

However, the choice of the cover crop is related to a number of reasons and cannot be made only in the perspective of pest management. Concerning the productivity traits, the traditional management of the soil allowed to harvest higher yields, due to the absence of competition for water and nutrients. As reported by other authors, the cover crop can improve the quality of the productions. Lopes et al. (2008) working on cabernet sauvignon in a non-irrigated vineyards, reports that intercropped natural covering in a multiyear trial reduced the vegetative growth and improved the quality of berries by reducing the titratable acidity and increasing the content of polyphenols and anthocyanins. Our results partially confirm findings of Lopes et al. (2008), as in both experimental years cover crops did not reduce the titratable acidity of grapes while influenced differently vigor, total soluble solids and total anthocyanins. In fact, only the perennial grass cover crop improved the quality parameters of berries, probably as a consequence of an increased competition for nitrogen

and water supply. On the contrary, the legume covering, applied to cultivar Carignano that is notoriously reluctant to accumulate sugar, further negatively affected the soluble solid concentration. The choice of cover crops, along with the selection of the most appropriate methods and timing of the turf establishment, is therefore necessarily cultivar-dependent.

Our findings indicate the influence of total cover cropping on grapevine growth, yield and on berry quality. If optimized, the total cover crop can represent a sustainable tool to improve the quality of wines, while creating, at the same time, unfavorable conditions to vine mealybug development.

Generalization on the most suitable ground management system in vineyards cannot be made, as response to cover crop is variety-dependent and each vineyard is different in terms of soil, plant vigor, productivity, quality of must. Our findings indicate the importance of the ground cover management on the trophic system grapevine – *P. ficus*. Therefore, in addition to other factors, cover crops should be taken into account in pest management programs.

Acknowledgments

This study was carried out within the project “Gestione del suolo in viticoltura: effetti sulla fisiologia della pianta e sulle principali avversità biotiche” (Grant no. CRP-24791) funded by Autonomous Region of Sardinia (L.R.7/2007 – Promotion of scientific research and technological innovation in Sardinia).

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

References

- Bettiga, L., Smith, R., Cahn, M., 2009. Evaluation of in-row cover cropping as a vineyard management tool. In: 16th International GiESCO Symposium, July 12-15, 55–57.
- Bukovinszky, T., Tréfás H., van Lenteren J.C., Vet L.E.M., Fremont, J., 2004. Plant competition in pest-suppressive intercropping systems complicates evaluation of herbivore responses. *Agric. Ecosyst. Environ.* 102, 185–196.
- Cocco, A., Lentini, A., Serra, G., 2014. Mating disruption of the vine mealybug, *Planococcus ficus*, in vineyards using reservoir pheromone dispensers. *J. Insect Sci.* 14, 144.
- Cocco, A., Marras, P.M., Muscas, E., Mura, A., Lentini, A., 2015. Variation of life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in response to grapevine nitrogen fertilization. *J Appl. Entomol.* 139, 519–528.
- Colugnati, G., Cattarossi, G., Crespan, G., 2004. Gestione del terreno in viticoltura. *Vigne Vini* 11, 53–83.
- Costello, M.J., Daane, K.M., 2003. Spider and leafhopper (*Erythroneura* spp.) response to vineyard ground cover. *Environ. Entomol.* 32, 1085–1098.
- Daane K.M., Costello M.J., 1998 Can cover crops reduce leafhoppers abundance in vineyard? *California Agric.* 52: 27–33.
- Daane, K.M., Sime, K.R., Fallon, K., Cooper, M.L., 2007. Impacts of Argentine ants on mealybugs and their natural enemies in California's coastal vineyards. *Ecol. Entomol.* 32, 583–596.
- Daane, K.M., Almeida, R.P.P., Bell, V.A., Walker, J.T.S., Botton, M., Fallahzadeh, M., Mani, M., Miano, J.L., Sforza, R., Walton, V.M., Zaviezo, T., 2012. Biology and management of mealybugs in vineyards, in: Bostanian N.J., Charles V., Isaacs R. (Eds.), *Arthropod management in vineyards: pests, approaches, and future directions*. Springer, Dordrecht, pp. 271–307.

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

- Di Stefano, R., Cravero, M.C., 1991. The grape phenolic determination. *Riv. Vitic. Enol.* 49(2), 37–45.
- European Union 2009. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Off. J. Eur. Commun. L* 309, 71–86.
- Ferrini, F., Mattii, G.B., Storchi, P., 1996. Effect of various ground covers on berry and must characteristics on ‘Sangiovese’ wine grape in the “Brunello di Montalcino” area. *Acta Hortic.* 427, 29–36.
- Gontier, L., Dufourcq, T., Gaviglio, C., 2011. Total grass cover in vineyards: an innovating and promising soil management alternative to reduce the use of herbicides. In: 17th International GiESCO Symposium, August 29–September 2, pp. 95–98.
- Guerra, B., Steenwerth, K., 2012. Influence of floor management technique on grapevine growth, disease pressure, and juice and wine composition: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 63, 149–164.
- Hogendorp, B.K., Cloyd, R.A., Swiader, J.M., 2006. Effect of nitrogen fertility on reproduction and development of citrus mealybug, *Planococcus citri* Risso (Homoptera: Pseudococcidae), feeding on two colors of coleus, *Solenostemon scutellarioides* L. *Codd. Environ. Entomol.* 35, 201–211.
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M., 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 175–201.
- Lopes, C.M., Monteiro, A., Machado, J.P., Fernandes, N., Araújo, A., 2008. Cover cropping in a sloping non-irrigated vineyard: II – effects on vegetative growth, yield, berry and wine quality of ‘Cabernet Sauvignon’ grapevines. *Ciênc. Téc. Vitiv.* 23, 37–43.
- Lundgren, J.G., Fergen, J.K., 2010. The effects of a winter cover crop on *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations and beneficial arthropod communities in no-till maize. *Environ. Entomol.* 39, 1816–1828.

- Maixner, M., 2007. Biology of *Hyalesthes obsoletus* and approaches to control this soilborne vector of Bois noir disease. IOBC/WPRS Bull. 30(7), 3–9.
- Maixner, M., Darimont, H., Mohr, H.D., 2001. Studies on the transmission of Bois noir to weeds and potential ground-cover plants by *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae). IOBC/WPRS Bull. 24(7), 249-251.
- Meagher, R.L., Meyer, J.R., 1990. Effect of ground cover management on certain abiotic and biotic interactions in peach orchard ecosystems. Crop Prot. 9, 65–72.
- Mansour, R., Grissa Lebdi, K., Rezgui, S., 2010. Assessment of the performance of some new insecticides for the control of the vine mealybug *Planococcus ficus* in a Tunisian vineyard. Entomol. Hell. 19, 21–33.
- Mansour, R., Suma, P., Mazzeo, G., La Pergola, A., Pappalardo, V., Grissa Lebdi, K., Russo, A., 2012. Interactions between the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera: Formicidae) and the main natural enemies of the vine and citrus mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). Biocon. Sci. Tech. 22, 527–537.
- Mercenaro, L., Nieddu, G., Pulina, P., Porqueddu, C., 2014. Sustainable management of an intercropped Mediterranean vineyard. Agric. Ecosyst. Environ. 192, 95–104.
- Mgocheki, N., Addison, P., 2010. Spatial distribution of ants (Hymenoptera: Formicidae), vine mealybugs and mealybug parasitoids in vineyards. J. Appl. Entomol. 134, 285–295.
- Monteiro, A., Lopes, C.M., 2007. Influence of cover crop on water use and performance of vineyard in Mediterranean Portugal. Agric. Ecosyst. Environ. 121, 336–342.
- Nicholls, C.I., Parrella, M.P., Altieri, M.A., 2000. Reducing the abundance of leafhoppers and thrips in a northern California organic vineyard through maintenance of full season floral diversity with summer cover crops. Agric. For. Entomol. 2, 107–113.

- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2006. Recueil international des methodes d'analyses des vins et des moutes, vol. 2, Paris.
- Powles, S.B., Preston, C., Bryan, I.B., Jutsum, A.R., 1997. Herbicide resistance: impact and management. *Adv. Agron.* 58, 57–93.
- Prokopy, R.J., 2003. Two decades of bottom-up, ecologically based pest management in a small commercial apple orchard in Massachusetts. *Agric. Ecosyst. Environ.* 94, 299–309.
- SAS Institute, 2008. SAS/ETS[®] 9.2 user's guide. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Serra, G., Lentini, A., Verdinelli, M., Delrio, G., 2006. Effects of cover crop management on grape pests in a Mediterranean environment. *IOBC/wprs Bull.* 29(11), 209–214.
- Simon, S., Bouvier, J.C., Debras, J.F., Sauphanor, B., 2010. Biodiversity and pest management in orchard systems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 139–152.
- Schmidt, N.P., O'Neal, M.E., Singer, J.W., 2007. Alfalfa living mulch advances biological control of soybean aphid. *Environ. Entomol.* 36, 416–424.
- Tesic, D., Keller, M., Hutton, R.J., 2007. Influence of vineyard floor management practices on grapevine vegetative growth, yield, and fruit composition. *Amer. J. Enol. Vitic.* 58, 1–11.
- Thurman, E.M., Goolsby, D.A., Aga, D.S., Pomes, M.L., Meyer, M.T., 1996. Occurrence of alachlor and its sulfonated metabolite in rivers and reservoirs of the Midwestern United States: the importance of sulfonation in the transport of chloroacetanilide herbicides. *Environ. Sci. Technol.* 30, 569–574.
- Valdés-Gómez, H., Fermaud, M., Roudet, J., Calonnc, A., Gary, C., 2008. Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth. *Crop Prot.* 27, 1174–1186.

- Varikou, K., Birouraki, A., Bagis, N., Kontodimas, D.C., 2010. Effect of temperature on the development and longevity of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103, 943–948.
- Veres, A., Petit, S., Conord, C., Lavigne, C., 2013. Does landscape composition affect pest abundance and their control by natural enemies? A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 166, 110–117.
- van Huyssteen, L., Weber, H.W., 1980. The effect of selected minimum and conventional tillage practices in vineyard cultivation on vine performance. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 1, 77–83.
- Walton, V.M., Pringle K.L., 2005. Developmental biology of vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Homoptera: Pseudococcidae), and its parasitoid *Coccidoxenoides perminutus* (Timberlake) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Afr. Entomol.* 13, 1–5.
- White, T.C.R., 1993. *The inadequate environment – nitrogen and the abundance of animals.* Springer, Berlin.

Table 1

Biological parameters (mean \pm SE) of *Planococcus ficus* on vines under different ground cover management systems.

Year	<i>P. ficus</i> parameter	Treatment ^a				Significance ^b
		Soil tillage (ST)	Natural covering (NC)	Perennial grass (PG)	Legume mixture (LM)	
2014	Development time (d)	33.82 \pm 0.16 c	35.57 \pm 0.20 a	34.95 \pm 0.23 ab	34.82 \pm 0.18 b	**
	Survival (%)	26.85 \pm 2.91 ab	25.64 \pm 5.82 b	28.87 \pm 1.95 a	26.37 \pm 2.44 ab	*
	Fecundity (no. eggs)	178.95 \pm 4.55 a	138.57 \pm 3.14 c	162.69 \pm 4.95 b	172.34 \pm 4.67 ab	**
	Fertility (%)	97.12 \pm 0.20 b	96.23 \pm 0.28 c	96.18 \pm 0.32 c	97.32 \pm 0.21 a	**
2015	Development time (d)	33.26 \pm 0.15 b	34.36 \pm 0.15 a	34.52 \pm 0.16 a	32.96 \pm 0.17 b	**
	Survival (%)	26.66 \pm 2.71 b	27.24 \pm 2.44 b	27.03 \pm 2.23 b	30.49 \pm 3.39 a	*
	Fecundity (no. eggs)	126.89 \pm 2.52 b	116.18 \pm 2.68 c	108.00 \pm 2.44 c	141.82 \pm 3.47 a	**
	Fertility (%)	91.81 \pm 0.69 a	90.18 \pm 0.71 b	90.47 \pm 0.71 b	92.39 \pm 0.58 a	**

^a Values within rows followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) by Fisher's Least Significant Difference test.

^b * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Table 2

SPAD values (mean \pm SE) on leaves of vines under different ground cover management systems.

Year	Treatment ^a				Significance ^b
	Soil tillage (ST)	Natural covering (NC)	Perennial grass (PG)	Legume mixture (LM)	
2014	45.71 \pm 0.82 a	37.13 \pm 0.80 d	40.86 \pm 1.08 c	43.71 \pm 0.83 b	**
2015	47.54 \pm 0.72 a	43.23 \pm 0.71 b	43.82 \pm 0.85 b	47.71 \pm 0.56 a	**

^a Values within rows followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) by Fisher's Least Significant Difference test.

^b * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Table 3Grapevine growth and yield parameters (mean \pm SE) under different soil management systems.

Year	Grapevine parameter	Treatment ^a				Significance ^b
		Soil tillage (ST)	Natural covering (NC)	Perennial grass (PG)	Legume mixture (LM)	
2014	Yield/vine (kg)	3.6 \pm 0.5 a	2.7 \pm 0.5 b	2.0 \pm 0.3 c	2.6 \pm 0.7 b	*
	Shoots/vine (no.)	9.3 \pm 1.2 b	9.1 \pm 0.6 b	9.3 \pm 0.9 b	10.6 \pm 0.9 a	*
	Clusters/vine (no.)	9.0 \pm 0.9 a	9.4 \pm 0.6 a	7.3 \pm 0.6 b	9.1 \pm 0.3 a	**
	Cluster weight (g)	365.0 \pm 24.8 a	328.0 \pm 56.4 ab	269.7 \pm 49.8 b	266.0 \pm 38.0 b	*
	Berry weight (g)	2.36 \pm 0.30 b	2.83 \pm 0.22 a	2.30 \pm 0.27 b	1.96 \pm 0.19 c	*
	Pruning weight/vine (kg)	0.80 \pm 0.14 a	0.62 \pm 0.07 b	0.52 \pm 0.09 c	0.68 \pm 0.11 b	**
	Ravaz index	4.4	4.3	3.8	3.8	
2015	Yield/vine (kg)	4.9 \pm 0.4 a	3.6 \pm 0.3 b	3.0 \pm 0.3 c	3.6 \pm 0.4 b	*
	Clusters/vine (no.)	14.0 \pm 0.8 a	13.7 \pm 0.7 a	10.2 \pm 0.8 b	13.8 \pm 0.6 a	**
	Cluster weight (g)	339.0 \pm 13.5 a	277.8 \pm 39.5 b	262.8 \pm 45.1 b	264.0 \pm 31.7 b	*
	Berry weight (g)	2.62 \pm 0.12 ab	2.82 \pm 0.09 a	2.62 \pm 0.12 ab	2.49 \pm 0.10 b	*

^a Values within rows followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) by Fisher's Least Significant Difference test.

^b * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Table 4

Grapevine berry composition parameters (mean \pm SE) at harvest under different soil management systems.

Year	Grapevine parameter	Treatment ^a				Significance ^b
		Soil tillage (ST)	Natural covering (NC)	Perennial grass (PG)	Legume mixture (LM)	
2014	Total soluble solids (°Brix)	21.5 \pm 0.6 ab	22.0 \pm 0.6 ab	22.7 \pm 0.7 a	20.7 \pm 0.6 b	*
	Titrateable acidity (g/L)	5.2 \pm 0.2	4.7 \pm 0.3	4.7 \pm 0.4	5.7 \pm 0.3	NS
	Total anthocyanins (mg/L)	595.2 \pm 63.3 a	459.8 \pm 29.2 b	578.0 \pm 48.1 a	546.0 \pm 25.5 a	*
	Total polyphenols (mg/L)	1678 \pm 54 a	1560 \pm 50 a	1590 \pm 39 a	1265 \pm 28 b	**
2015	Total soluble solids (°Brix)	18.9 \pm 0.4 b	19.6 \pm 0.2 b	20.8 \pm 0.2 a	19.6 \pm 0.3 b	*
	Titrateable acidity (g/L)	5.0 \pm 0.1	4.8 \pm 0.1	4.7 \pm 0.2	5.1 \pm 0.3	NS
	Total anthocyanins (mg/L)	500.8 \pm 51.4 b	378.5 \pm 34.1 c	634.3 \pm 33.1 a	471.7 \pm 12.5 b	*
	Total polyphenols (mg/L)	1246 \pm 64 a	1048 \pm 39 b	1319 \pm 59 a	858 \pm 34 c	*

^a Values within rows followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) by Fisher's Least Significant Difference test.

^b * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

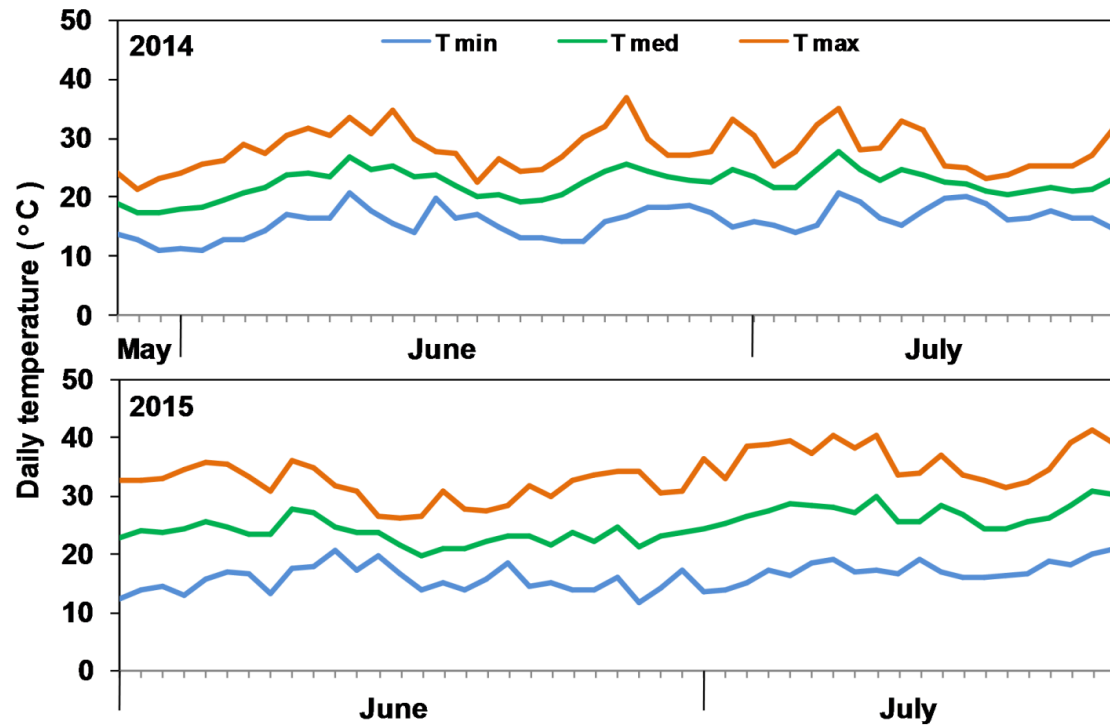


Fig. 1. Trends of daily maximum, mean and minimum temperatures during the surveys on *Planococcus ficus* mealybugs in 2014 and 2015.

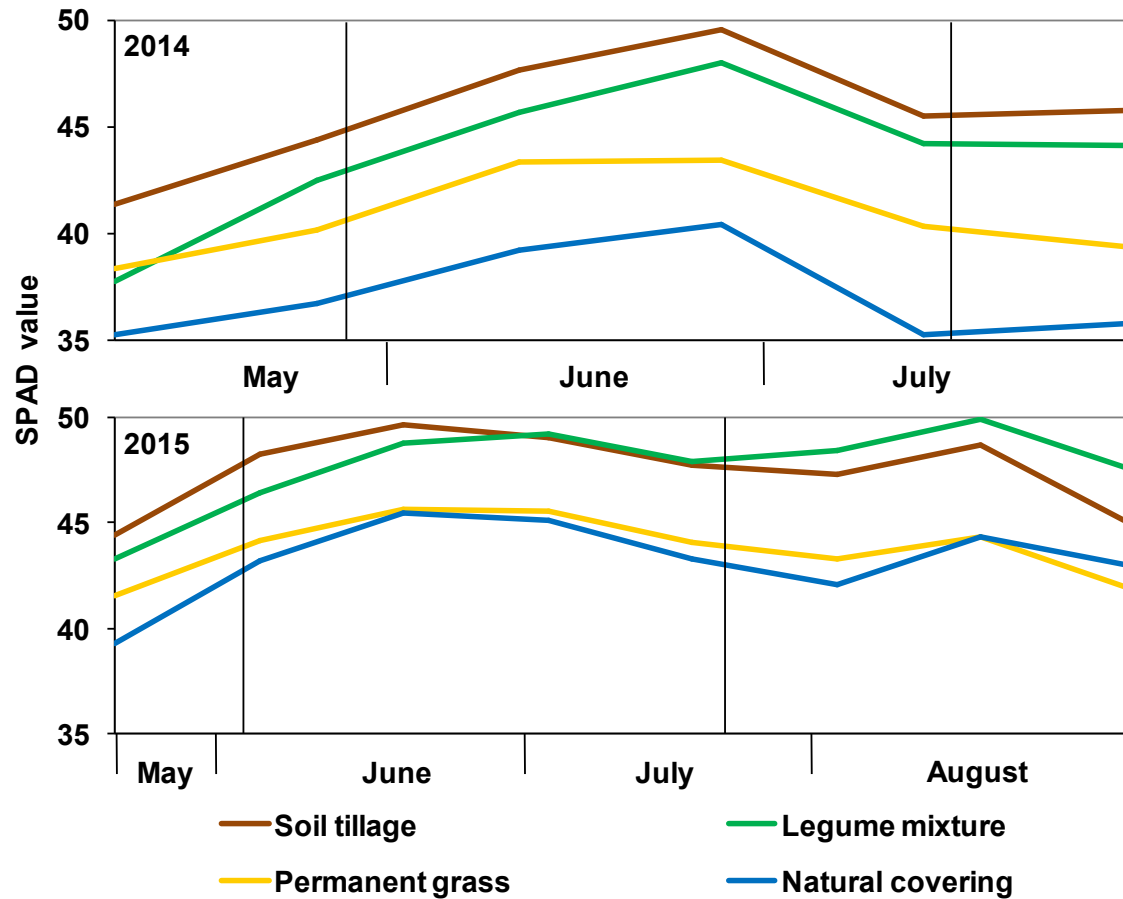


Fig. 2. Patterns of mean SPAD values on leaves of vines under different ground cover management systems. Vertical lines indicate the period of observation on *Planococcus ficus* mealybugs. The y-axis begins at SPAD value = 35.

Chapter III

*Effetti della confusione sessuale e del ritardo della fecondazione sulla biologia di
Planococcus ficus e sui parametri demografici delle sue popolazioni*

This paper has not reached yet the final phase of preparation and some analyses are underway

*Effetti della confusione sessuale e del ritardo della fecondazione sulla biologia di Planococcus ficus
e sui parametri demografici delle sue popolazioni*

I collected and analyzed most of the data and contributed to writing the manuscript

Riassunto

In questo lavoro si riportano i risultati di una ricerca condotta in laboratorio e in pieno campo tesa a valutare gli effetti del ritardo dell'accoppiamento sui parametri demografici di *Planococcus ficus*. A questo scopo, in laboratorio sono stati studiati i parametri riproduttivi di femmine accoppiate a età crescenti della loro vita adulta mentre in pieno campo è stato verificato il grado di azione della confusione sessuale sulla percentuale di accoppiamenti, sul ritardo della fecondazione e sulla fecondità delle femmine. I risultati ottenuti sono stati impiegati per calcolare i parametri demografici che sinteticamente mostrano le variazioni indotte da questa tecnica di lotta sul tasso di accrescimento delle popolazioni.

Nelle prove di laboratorio, il periodo preriproduttivo delle femmine adulte è risultato sostanzialmente simile nelle cocciniglie fecondate nei primi 7 giorni di vita adulta, mentre è diventato progressivamente più elevato nelle femmine più attempate. La fecondità, la fertilità e il rapporto fra i sessi non sembrano influenzati negativamente dall'età in cui la femmina si accoppia..

L'analisi dei parametri riproduttivi rilevati in campo ha confermato l'efficacia della confusione sessuale che ha determinato una riduzione della percentuale di femmine ovideponenti, un allungamento del periodo preriproduttivo e una riduzione della fecondità. Le variazioni dei parametri riproduttivi hanno condizionato la capacità di accrescimento delle popolazioni di *P. ficus* che nelle parcelle difese con la confusione sessuale hanno manifestato un maggiore tempo medio di generazione e un maggiore tempo di duplicazione della popolazione mentre hanno avuto un minore tasso intrinseco di crescita e un minore tasso finito di accrescimento.

Parole chiave: cocciniglia farinosa della vite, lotta biologica, feromone sessuale, tasso intrinseco di crescita, fecondità,

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Introduzione

La lotta agli insetti fitofagi con la tecnica della confusione sessuale, definita più propriamente in termini anglosassoni come Mating Disruption (MD), si basa sull'impiego di diffusori di feromone sessuale che mascherano la scia odorosa emessa dalle femmine per attrarre i maschi della propria specie. Non si ha ancora una piena conoscenza delle precise modalità con cui elevate concentrazioni di feromone sessuale agiscono nella capacità di ricerca dei maschi (Barclay e Judd, 1995; Cardè e Minks, 1995) ma, tra le diverse ipotesi, i meccanismi d'azione più accreditati fanno riferimento al fenomeno dell'assuefazione dovuta a uno stimolo sensoriale continuato, alla confusione creata da false tracce odorose e all'alterazione del rapporto fra i diversi componenti del miscuglio feromonico (Bartell, 1982; Cardè e Minks, 1995). Nelle specie anfigoniche si ha quindi una riduzione degli accoppiamenti e un conseguente crollo della densità di popolazione (Cardè e Minsk, 1995; Sanders *et al.*, 1997).

Un parametro generalmente impiegato per valutare l'efficacia della confusione sessuale è rappresentato dalla percentuale di accoppiamenti in parcelle trattate e in altre di controllo (Rice e Kirsch, 1990; McLaughlin *et al.*, 1994; Agnello *et al.*, 1996; Knight, 1996; Lawson *et al.*, 1996). Tuttavia, anche quando si ottengono efficaci riduzioni dell'infestazione, i risultati di queste ricerche sono estremamente variabili e riportano in alcuni casi una totale assenza di accoppiamenti nelle aree trattate e, in altri, evidenziano la stessa proporzione di femmine accoppiate rispetto alle parcelle controllo non protette. In tali studi il confronto viene generalmente effettuato in un particolare periodo dell'anno o stimando la percentuale di femmine accoppiate nell'arco di tutta una stagione. Questo approccio metodologico non consente, però, di valutare gli effetti della confusione sessuale su alcuni parametri demografici (periodo preriproduttivo, tempo medio di generazione, fecondità, fertilità, ecc.) indispensabili per lo studio della dinamica di popolazione.

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Su alcune specie di lepidotteri, quali *Ostrinia nubilalis* (Hübner), la confusione sessuale non impedisce gli accoppiamenti ma piuttosto li ritarda. Di conseguenza, nelle parcelle difese con questa tecnica, la percentuale di femmine fecondate è inizialmente più bassa ma nell'arco di una decina di giorni raggiunge gli stessi livelli di quella riscontrata nelle aree non trattate (Fadamiro *et al.*, 1999).

Gli studi demografici indicano che i tassi di crescita delle popolazioni degli insetti sono fortemente condizionati dalla durata del periodo preriproduttivo (Carey, 1993). Pertanto, qualsiasi fattore che ritarda l'inizio della riproduzione influenza in modo significativo anche la l'abbondanza di una popolazione. In numerose specie di lepidotteri, le ricerche sugli effetti del ritardo dell'accoppiamento hanno evidenziato che, al crescere dell'età in cui la femmina viene fecondata, si assiste ad un incremento della longevità e del periodo che intercorre tra l'accoppiamento e l'inizio dell'ovideposizione mentre si riduce la fecondità e la fertilità delle uova deposte (Jones e Aihara-Sasaki, 2001). È tuttavia importante evidenziare che il ritardo nell'accoppiamento influisce in modo differente sulle diverse specie e che non tutte le specie studiate manifestano contemporaneamente i quattro fenomeni succitati.

In viticoltura, la tecnica della confusione sessuale è efficacemente impiegata in Europa su una superficie di oltre 140.000 ettari contro *Lobesia botrana* (Den. e Schiff.) e *Eupoecilia ambiguella* (Hub.) (Kast, 2001; Ioriatti *et al.*, 2008, 2011). La recente sintesi del feromone sessuale della cocciniglia farinosa della vite *Planococcus ficus* (Signoret) (Hinkens *et al.*, 2001) ha aperto una nuova prospettiva per lo sviluppo di protocolli di monitoraggio (Millar *et al.*, 2002) e per programmi di difesa con la tecnica della confusione sessuale anche nei confronti di questa specie.

Planococcus ficus è un emittente pseudococcide presente nell'Europa meridionale, Africa, America centromeridionale e, dal 1994, anche in California (Blumberg *et al.*, 1995; Daane *et al.*, 2003). Gli attacchi della cocciniglia, con frequenza sempre crescente, determinano danni di rilevanza

economica alla coltivazione della vite (Melandri *et al.*, 2012). La lotta a *P. ficus* si basa generalmente su ripetuti trattamenti estivi con insetticidi organofosfati. Tuttavia l'efficacia dei trattamenti non è sempre soddisfacente, in quanto una parte della popolazione della cocciniglia rimane protetta dalle irrorazioni insetticide sotto la corteccia o, in presenza di terreni sabbiosi, anche sotto il colletto (Godfrey *et al.*, 2003). Un eccessivo impiego dei mezzi chimici ha inoltre un notevole impatto sui nemici naturali che mantengono i fitofagi della vite a bassi livelli di densità. Per queste ragioni è preferibile ricorrere a strategie di lotta integrata che prevedono l'uso di mezzi selettivi e a minor impatto ambientale (Prota *et al.*, 1989).

La tecnica della confusione sessuale contro *P. ficus* è stata impiegata con risultati incoraggianti su oltre 11.000 ettari di vigneto in California, in Argentina e in Sardegna dove formulati microincapsulati o erogatori di feromone a membrana sembrano ridurre l'infestazione della cocciniglia (Walton *et al.*, 2006; Cocco *et al.*, 2011, 2014; Miano *et al.*, 2011). La valutazione dell'efficacia della confusione sessuale attraverso la sola stima dell'infestazione potrebbe però essere imprecisa poiché la distribuzione fortemente aggregata delle cocciniglie rende difficile sia una stima affidabile della densità di popolazione sia la definizione di parcelle omogenee per i confronti fra trattamenti. Appare pertanto importante studiare gli effetti di questa tecnica di lotta sui parametri biologici e demografici che condizionano la capacità di crescita delle popolazioni.

La letteratura sulla cocciniglia farinosa della vite presenta poche ricerche sulla biologia riproduttiva e in alcuni casi riporta risultati contraddittori che attribuiscono alla specie tempi di generazione e fecondità molto divergenti (Walton e Pringle, 2005; Varikou *et al.*, 2010). In questo lavoro si riportano i risultati di una ricerca condotta in laboratorio e in pieno campo tesa a valutare gli effetti del ritardo dell'accoppiamento sui parametri demografici di *P. ficus*. A questo scopo, in laboratorio sono stati studiati i parametri riproduttivi di femmine accoppiate a età crescenti della loro vita adulta mentre in pieno campo è stato verificato il grado di azione della confusione sessuale sulla

percentuale di accoppiamenti, sul ritardo della fecondazione e sulla fecondità delle femmine. I risultati ottenuti sono stati impiegati per calcolare i parametri demografici che sinteticamente mostrano le variazioni indotte da questa tecnica di lotta sul tasso di accrescimento delle popolazioni.

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Materiali e metodi

Allevamento massale delle cocciniglie impiegate nella sperimentazione

Gli insetti impiegati nella ricerca provengono dall'insettario del Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia, costituito a partire da un nucleo di individui di *P. ficus* raccolti in diversi vigneti sardi e allevati per diverse generazioni impiegando come substrato alimentare germogli di tuberi di patata (*Solanum tuberosum* L.) di varietà "Spunta", all'interno di un locale climatizzato con temperature di 22-25°C e umidità relativa di circa il 55%. L'identificazione della specie è stata confermata da un'analisi molecolare RAPD-PCR (Demontis *et al.*, 2007), periodicamente effettuata per escludere potenziali contaminazioni dell'allevamento con la cocciniglia farinosa degli agrumi *Planococcus citri* (Risso), difficilmente distinguibile da *P. ficus* con i soli caratteri morfologici.

Effetti del ritardo dell'accoppiamento sulla biologia riproduttiva

Maschi e femmine sottoposti alle osservazioni sperimentali sono stati isolati da uno stock di uova coetanee. Per ottenere individui della stessa età, all'interno di un contenitore cilindrico di plastica (8 cm di altezza e 6 cm di diametro), sono state isolate femmine nella fase iniziale di ovideposizione, previa rimozione delle uova già deposte. Successivamente, ad intervalli di 24 ore, le uova prodotte da ciascuna femmina sono state raccolte e sistemate su patate germogliate, all'interno di un contenitore di maggiori dimensioni (13,5 x 13,5 x 6,5 cm) chiuso con un doppio strato di carta assorbente fissato con un tappo forato. I contenitori, contrassegnati con la data di raccolta delle uova, sono stati tenuti all'interno di una cella climatizzata con umidità relativa (RH) del 50%, fotoperiodo 12:12 (luce:buio) e temperatura di 25°C, considerata ottimale per lo sviluppo di questa

specie (Walton e Pringle, 2005; Varikou *et al.*, 2010). Dopo circa 20-25 giorni dalla raccolta delle uova, si è proceduto alla separazione delle neanidi maschili da quelle femminili.

Le neanidi femminili di terza età sono state poste singolarmente su un nuovo germoglio di patata all'interno di un contenitore chiuso quando raggiungevano una lunghezza di 1,2 mm, che mediamente corrisponde al venticinquesimo giorno degli individui allevati a 25°C. Controlli quotidiani con l'ausilio di uno stereomicroscopio hanno poi permesso di osservare e registrare il momento della muta da neanide di terza età a femmina adulta. Gli individui maschili allo stadio di prepupa sono stati invece sistemati singolarmente su strisce di carta assorbente all'interno di piccole provette di plastica trasparente e tenuti in cella climatizzata fino allo sfarfallamento degli adulti e al loro successivo impiego.

Per valutare gli effetti del ritardo dell'accoppiamento sulla riproduzione sono stati calcolati i seguenti parametri biologici: 1) periodo di preovideposizione, calcolato come numero di giorni intercorrenti tra l'accoppiamento e l'inizio dell'ovideposizione; 2) periodo preriproduttivo, intercorrente tra lo sfarfallamento della femmina e l'inizio dell'ovideposizione; 3) fecondità, calcolata come numero di uova prodotto da ciascuna femmina; 4) fertilità, calcolata come percentuale di uova vitali sul totale deposto; 5) sex ratio, calcolata come percentuale di uova femminili; 6) curva di deposizione, calcolata come andamento del numero medio di uova deposte giornalmente dalle femmine.

Le femmine vergini di *P. ficus*, in numero di 25 individui per tesi, sono state fatte accoppiare una sola volta rispettivamente a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 o 28 giorni dal loro sfarfallamento, ponendole singolarmente a contatto con 2 maschi di 3-4 giorni di vita nelle prime ore della mattina. Dal giorno dell'accoppiamento alla morte naturale di ciascuna femmina, osservazioni quotidiane hanno permesso di registrare la data d'inizio dell'ovideposizione e di raccogliere e contare le uova deposte giornalmente.

La fertilità, espressa come rapporto tra il numero di neanidi sgusciate e il totale delle uova deposte, è stata determinata su 10 femmine accoppiate a 1, 7, 14, 21 e 28 giorni dal loro sfarfallamento. A questo scopo, ogni due giorni, le uova deposte dalle singole femmine sono state raccolte con delicatezza con un pennello morbido e posizionate su un cartoncino all'interno di un piccolo contenitore di plastica (dimensioni: diametro 3,5 cm e altezza 4,5 cm) chiuso con uno strato di carta assorbente. In questo contenitore sono stati indicati la data di raccolta e il codice della femmina. Controlli successivi hanno permesso di determinare il numero di uova sterili e di neanidi neonate. La sex ratio delle uova prodotte da 10 femmine accoppiate a 1, 7 e 28 giorni dallo sfarfallamento è stata determinata col metodo descritto da Ross *et al.* (2010). Le uova destinate a questa analisi sono state raccolte quotidianamente e conservate nel liquido di Carnoy (4:3:1 cloroformio, etanolo, acido acetico glaciale), in provette tipo eppendorf alla temperatura di 4°C per 2-3 giorni. Il liquido di Carnoy è stato poi sostituito con etanolo al 90% e le uova sono state tenute sempre a 4°C fino al momento dell'analisi. Per determinare il sesso di ciascun embrione, le uova sono state sistemate ordinatamente in un vetrino porta-oggetto, fissate col DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo - SIGMA D 9564, diluizione 1:1000 in una soluzione salina tamponata con fosfato), coperte con un vetrino copri-oggetto e, infine, esaminate con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza (ingrandimento di 100X). La differenza tra le uova maschili e femminili può essere facilmente osservata perché nel nucleo dell'embrione maschile è ben visibile una zona chiara tendenzialmente circolare che si forma in seguito alla concentrazione del materiale cromosomico paterno (Ross *et al.*, 2010).

Effetti della confusione sessuale sui parametri demografici delle popolazioni della cocciniglia

La ricerca è stata condotta in un vigneto commerciale nel Nord Ovest della Sardegna (Santa Maria La Palma, Alghero) nel periodo 2013-15. Il vigneto occupa una superficie di 6,5 ha ed è costituito da numerose cultivar di uva rossa e bianca allevate a spalliera con un sesto di 2,5 m nell'interfila e

di 1-1,2 m lungo la fila. Le cv di uva bianca (Chardonnay, Vermentino) sono potate a Guyot mentre le cv di uva rossa (Cabernet, Cannonau, Monica e Carignano) sono allevate a cordone speronato. Il vigneto è dotato di un impianto di irrigazione a goccia e la gestione del suolo prevede l'inerbimento controllato nell'interfila e il diserbo chimico lungo la fila. Le temperature e l'umidità relativa dell'aria sono state registrate con una capannina meteorologica posizionata all'interno del vigneto.

Per valutare gli effetti della confusione sessuale sui parametri demografici delle popolazioni di *P. ficus* sono state messe a confronto parcelle difese con una dose normale di feromone (dose raccomandata dalle case produttrici) (**MDS** = Mating Disruption Single), parcelle difese con una dose doppia di feromone (**MDD** = Mating Disruption Double) e parcelle di controllo non difese con feromoni (**T** = Testimone). Il disegno sperimentale ha previsto blocchi randomizzati con tre replicazioni per tesi su parcelle di 0,5 ha (parcelle quadrate di circa 70 x 70 m). Nel 2013 sono stati impiegati erogatori CheckMate® (Suterra Inc., Bend, USA) mentre nel 2014-15 sono stati usati gli erogatori sperimentali Isonet® PF x111 (10) e Isonet® PF x111 (20) (CBC Europe, ShinEtsu Chemical Co., Ltd.). Gli erogatori ChekMate sono dotati di una membrana plastica, hanno un contenuto di 150 mg del feromone racemico lavandulyl senecioate e sono stati impiegati in numero di 625 per ettaro, in modo da garantire una carica di feromone pari a 93,8 g/ha, o alla dose doppia di 1250 erogatori per ettaro (187,6 g/ha). Isonet® PF x111 (10) sono invece erogatori a spaghetti in cui 90 mg di feromone sono contenuti in un capillare plastico lungo 10 cm e vengono impiegati in numero di 500 per ettaro (45 g/ha). Nelle parcelle difese con dose doppia sono stati invece impiegati gli Isonet® PF x111 (20) che contengono 180 mg di feromone in un capillare di 20 cm e con lo stesso numero di erogatori garantiscono una carica di 90 g/ha.

Gli erogatori sono stati uniformemente distribuiti nelle parcelle prima del volo dei maschi (8 maggio 2013, 14 aprile 2014 e 23 aprile 2015) posizionandoli all'altezza dei grappoli sul filo

portante della spalliera o alla base di un germoglio. Nei due filari periferici delle parcelle trattate sono stati impiegati un numero doppio di erogatori per evitare effetti di bordo.

Il vigneto è stato trattato chimicamente con chlorpyrifos (Dursban, Dow AgroSciences Italia) nella seconda decade di giugno, luglio e agosto del 2013. Nel 2014 è stato effettuato un primo intervento a metà giugno con spirotetramat (Movento, Bayer) e altri due trattamenti con chlorpyrifos all'inizio e alla fine di luglio. Nel 2015 ad un primo intervento con spirotetramat effettuato a metà giugno è seguito un trattamento con chlorpyrifos il 31 luglio. Gli insetticidi sono stati irrorati a medio volume (400-500 l/ha) alla dose indicata in etichetta (Dursban: 110 ml/hl; Movento: 150 ml/hl). I trattamenti sono stati inevitabili poiché il viticoltore non accettava il minimo rischio di perdite di prodotto legato alle infestazioni della tignoletta della vite e della cocciniglia farinosa. Tuttavia, visto che i trattamenti hanno interessato sia le parcelle di controllo sia quelle difese con la confusione sessuale, le differenze riscontrate nei parametri biologici della cocciniglia sono state attribuite all'applicazione degli erogatori di feromone.

L'efficacia della confusione sessuale è stata valutata comparando: 1) l'andamento del volo dei maschi; 2) la densità dell'infestazione; 3) i parametri demografici.

Il volo dei maschi è stato seguito attraverso le catture a trappole costituite da barattoli cilindrici di 6 cm di diametro e 8 cm di altezza, con due fori di entrata di 1,5 cm di diametro nel quarto superiore. Il barattolo è stato riempito per un terzo del suo volume con una soluzione di acqua e sapone. La trappola è stata innescata col feromone di sintesi contenuto in un erogatore in caucciù (Isagro Italia nel 2013; Biogard Intrachem Bio Italia nel 2014-15) appeso sotto il tappo del barattolo a livello dei fori di entrata. Le trappole sono state appese a partire da metà maggio nella pianta centrale di ciascuna parcella a un filo dell'armatura della spalliera all'altezza dei grappoli. I maschi catturati sono stati contati con cadenza settimanale esaminando il contenuto delle trappole in laboratorio con l'ausilio di un microscopio binoculare. L'acqua saponata è stata sostituita settimanalmente mentre

la sostituzione degli erogatori è stata effettuata mensilmente. Per valutare la persistenza dell'azione di confusione indotta dai feromoni è stata calcolata la percentuale di riduzione di maschi catturati nelle parcelle difese rispetto a quelle di controllo secondo la seguente formula:

$$\%red = [1-(M_{md}/M_c)] \times 100$$

dove M_{md} rappresenta il numero di maschi catturati nelle parcelle difese con la confusione e M_c i maschi delle parcelle di controllo.

L'infestazione sulle piante è stata stimata mensilmente attraverso un controllo visivo a tempo su 15-20 piante (3 minuti per pianta: 2 minuti su tronco e cordoni; 1 minuto sulla chioma) conteggiando il numero delle cocciniglie presenti su tronco, branche principali, base dei germogli, foglie e grappoli e operando una distinzione degli stadi di sviluppo presenti. Le osservazioni sono iniziate in giugno e sono proseguite a cadenza mensile.

I parametri demografici sono stati valutati a partire da dati biologici e riproduttivi ottenuti esponendo periodicamente in ciascuna parcella 20 femmine vergini di 7 giorni di età. Le femmine sono state ottenute dall'allevamento di laboratorio con le stesse modalità descritte per le prove sul ritardo degli accoppiamenti. Le femmine vergini sono state posizionate in numero di due su un germoglio di patata all'interno di barattoli cilindrici (6 cm di diametro e 8 cm di altezza) con quattro fori di 1,5 cm di diametro nel quarto superiore per permettere l'ingresso dei maschi. Sopra il tappo è stato posizionato un piatto di carta plastificato per proteggere le cocciniglie dall'insolazione diretta e dalla pioggia. I contenitori sono stati appesi in numero di 10 nella parte centrale di ciascuna parcella. Le femmine sono state osservate quotidianamente fino all'inizio della deposizione delle uova o fino alla loro morte. Le femmine ovideponenti sono state poste singolarmente in un contenitore di plastica (3,5 cm di diametro e 3,5 cm di altezza) e portate in laboratorio. Al termine

della deposizione e schiusura delle uova si è proceduto al conteggio delle neanidi e delle uova sterili non schiuse. Per ciascuna femmina è stato così possibile calcolare: i) periodo di preovideposizione espresso come numero di giorni intercorsi tra la data di inizio dell'esposizione in campo e quella di inizio dell'ovideposizione, ii) fecondità, espressa come numero totale di uova deposte da ciascuna femmina, iii) fertilità calcolata come proporzione di uova schiuse sul totale di uova deposte.

A partire dai parametri riproduttivi è stato possibile calcolare i seguenti parametri demografici: tasso intrinseco di crescita (r), tasso finito di crescita (λ), tasso netto di riproduzione (R_0), tempo medio di generazione (T) e tempo di duplicazione della popolazione (DT).

Tasso intrinseco di crescita (r). In condizioni di distribuzione stabile di età, la crescita della popolazione è espressa dall'equazione

$$dN/dt = r N$$

dove la costante r definisce il tasso intrinseco di crescita. In questo lavoro il tasso intrinseco di crescita è stato calcolato col metodo di Birch (1948) basato sui dati di fecondità specifica giornaliera e di sopravvivenza risolvendo iterativamente l'equazione

$$\sum_{x=0}^n e^{-r_m x} l_x m_x = 1$$

dove l_x è il tasso di sopravvivenza delle femmine al tempo x mentre m_x è il numero di progenie femminile prodotta al tempo x . Per il calcolo di l_x si è supposta una mortalità degli stadi preimmaginali pari a zero ed è stata considerata solo la mortalità delle femmine esposte in campo. Il valore di m_x è stato ottenuto moltiplicando il numero di uova fertili di ciascuna femmina per 0,6 (tasso di uova femminili ottenuto nelle prove di laboratorio) e distribuendo nel tempo il valore così ottenuto secondo la curva di deposizione disegnata nelle prove di laboratorio.

Tasso finito di accrescimento (λ). Indica il numero di volte che si moltiplica una popolazione nell'unità di tempo (misurato in unità di femmine/n. femmine/giorno) ed è dato dall'equazione

$$N_{t+1} = \lambda N_t$$

λ gioca un ruolo fondamentale nel determinare i comportamenti assunti dai modelli di crescita. Se conosciamo il valore del parametro, è facile calcolare l'abbondanza della popolazione dopo t generazioni a partire dalla sua quantità iniziale.

Tasso netto di riproduzione R_0 . è definito dall'equazione

$$R_0 = \sum l_x \times m_x,$$

e rappresenta il numero medio di figlie femmine che una madre genera durante la sua vita riproduttiva, in assenza di fenomeni di dipendenza da densità.

Tempo medio di una generazione. Può essere calcolato con l'equazione

$$T = \frac{\sum_{x=0}^{\omega} x l_x m_x}{\sum_{x=0}^{\omega} l_x m_x}$$

La velocità di rinnovamento delle generazioni può essere caratterizzata dalla durata media di una generazione o dall'intervallo medio tra generazioni successive: intervallo che, nel caso di una generazione femminile, corrisponde all'età media delle madri alla nascita delle loro figlie.

Tempo di duplicazione della popolazione. è dato dall'equazione:

$$DT = \log_e 2/r$$

ed è il tempo necessario alla popolazione affinché il numero degli individui iniziali raddoppi.

Analisi statistiche dei dati

I parametri biologici rilevati in laboratorio (tempi di sviluppo, periodo preriproduttivo, periodo di preovideposizione, periodo di ovideposizione, fecondità, fertilità e percentuale di progenie femminile) sono stati sottoposti all'analisi della varianza usando la procedura GLMM del pacchetto informatico SAS[®] (PROC GLMM; SAS Institute, 2008). Differenze significative tra le medie sono

state evidenziate tramite il test di Tukey. In modo simile sono stati analizzati i parametri demografici della popolazione (tasso netto di riproduzione R_0 , tempo medio di generazione T , tempo di duplicazione della popolazione DT , tasso intrinseco di crescita r , tasso finito di accrescimento λ). Le differenze statistiche nelle percentuali di femmine ovideponenti rilevate nelle diverse tesi sono state evidenziate tramite analisi della varianza seguita dal test di Tukey (PROC GLMM; SAS Institute, 2008), specificando in questo caso la distribuzione binomiale dei dati nella stringa di analisi. Infine, gli andamenti delle densità di popolazione di *P. ficus* nel corso delle stagioni sono stati confrontati tra le tesi attraverso l'analisi della varianza con misure ripetute (PROC MIXED; SAS Institute, 2008).

Risultati

Effetti del ritardo della fecondazione sulla biologia della cocciniglia

Alla temperatura di 25°C il tempo di sviluppo preimmaginale della cocciniglia è stato mediamente di 30,5 giorni (Tab. 1). Il periodo di preovideposizione delle femmine, calcolato come numero di giorni intercorsi fra l'accoppiamento e l'inizio della deposizione delle uova, ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le tesi. Si è infatti assistito a una sua progressiva riduzione passando da 9,2 giorni nelle femmine accoppiate nel primo giorno di vita a 5,0 in quelle accoppiate al 7° giorno. Le femmine fecondate a 14, 21 e 28 giorni dal loro sfarfallamento hanno avuto un periodo di preovideposizione ancora inferiore che è variato da 3,4 a 3,7 giorni (Tab. 1).

Il periodo preriproduttivo delle femmine adulte, calcolato come numero di giorni intercorsi tra lo sfarfallamento e l'inizio della deposizione delle uova, è sostanzialmente simile nelle cocciniglie fecondate nei primi 7 giorni di vita adulta, mentre diventa progressivamente più elevato man mano che il ritardo nell'accoppiamento si accresce. Le femmine accoppiate entro i primi tre giorni di vita depongono le uova a partire da circa il 10° giorno dallo sfarfallamento mentre quelle accoppiate a 5-7 giorni dallo sfarfallamento iniziano a ovideporre al 12° giorno. In sostanza, le femmine neosfarfallate hanno bisogno di una decina di giorni per maturare le uova anche se si accoppiano lo stesso giorno della loro emergenza. Anche le femmine vergini che hanno un'età superiore alla settimana non iniziano però a deporre subito dopo l'accoppiamento, ma a 3-4 giorni dallo stesso. Per tale motivo le femmine che sono state accoppiate a 14, 21 e 28 giorni hanno deposto le prime uova rispettivamente a 17,9, 24,8 e 32,1 giorni dalla loro emergenza (Tab. 1).

Il periodo di ovideposizione, calcolato come numero di giorni intercorsi fra l'inizio e la fine della deposizione delle uova, ha avuto una elevata variabilità anche all'interno delle stesse tesi e non ha mostrato differenze statisticamente significative. Le femmine accoppiate nella prima settimana

dallo sfarfallamento hanno deposto mediamente per 15-16 giorni mentre nelle femmine di maggiore età il periodo di ovideposizione è stato circa di 13 giorni (Tab. 1).

La durata totale della vita non ha mostrato differenze significative nelle femmine accoppiate nelle prime due settimane, con valori variabili tra 56,4 e 61,4 giorni, mentre è risultata statisticamente superiore nelle femmine accoppiate a 21 e 28 giorni, con valori rispettivamente di 68,6 e 76,1 giorni (Tab. 1).

La fecondità media non ha mostrato differenze significative fra le tesi, variando da un minimo di 267,4 ad un massimo di 355 uova per femmina (Fig. 1).

L'andamento delle ovideposizioni giornaliere è stato molto simile nelle femmine fecondate nella prima settimana di vita (Fig. 2). Le femmine accoppiate a 14, 21 e 28 giorni dallo sfarfallamento hanno deposto in un periodo di tempo leggermente inferiore e, pur avendo una fecondità simile, hanno manifestato dei picchi di ovideposizione giornaliera lievemente superiori (Fig. 2).

La fertilità media delle uova, calcolata come rapporto percentuale tra il numero di neanidi sgusciate sul totale di uova deposte, non è stata statisticamente differente nelle femmine accoppiate entro 21 giorni di vita, con valori del 86-92%, mentre nelle femmine accoppiate più tardivamente è stata del 94%, valore significativamente più elevato rispetto a quelli delle femmine accoppiate entro la prima settimana di vita (Fig. 3). Questo dato conferma che le femmine vergini attempate conservano intatta la loro capacità riproduttiva e sono in grado di deporre un numero di uova vitali uguale o superiore alle femmine giovani.

Il rapporto fra i sessi, stimato solo per la progenie di femmine accoppiate a 1, 7 e 28 giorni dal loro sfarfallamento, presenta una sensibile predominanza della componente femminile (57-63%) senza differenze statistiche tra le tesi (Fig. 4).

Effetti della confusione sessuale sui parametri demografici delle popolazioni della cocciniglia

Le temperature medie registrate nei mesi interessati dalla sperimentazione sono state simili nel 2013 e 2014 mentre sono risultate più elevate nel 2015 (Fig. 5). Le temperature medie di luglio e agosto sono risultate ottimali per lo sviluppo della cocciniglia variando da 23,8 e 26,8 °C.

I voli dei maschi, rilevati attraverso le catture a trappole innescate col feromone Isagro, nel 2013, hanno avuto inizio in maggio e hanno mostrato valori molto più elevati nelle parcelle di controllo rispetto a quelle difese con la confusione sessuale fino a metà settembre (Fig. 6). Complessivamente in tutto il periodo di esposizione delle trappole sono stati catturati 789,67 maschi per parcella nella tesi di controllo (T) e 285,33 e 214,67 maschi nelle parcelle difese rispettivamente con dose singola (MDS) e doppia (MDD) di feromone con una percentuale di riduzione del 63,9 e del 72,8%. La percentuale di riduzione mensile è variata da 0 al 100%. In particolare, fino al mese di luglio le percentuali di riduzione sono variate dall'80 al 100%, ad agosto e settembre tra il 43 e il 63% mentre a partire da ottobre non si è registrata nessuna riduzione.

Nel 2014 le trappole innescate con il feromone della Biogard hanno avuto un'efficacia di cattura decisamente inferiore rispetto a quelle impiegate l'anno precedente, intrappolando in tutta la stagione un numero di individui per parcella di 86,0, 25,7 e 18,3 rispettivamente nel controllo, nella dose singola e nella dose doppia (Fig. 7). Le percentuali di riduzione sono state del 70,2% nella dose singola e 78,7% nella dose doppia. La percentuale di riduzione calcolata mensilmente è variata dal 45,5% al 93% nella dose singola e dal 58,2 al 96,6% nella dose doppia senza un andamento ben definito durante la stagione.

Nel 2015 il numero di maschi catturato in tutta la stagione è stato di 138,3 per parcella nella tesi di controllo contro valori di 20,3 e 17,3 nelle tesi difese con la dose singola e doppia di feromone che hanno mostrato una percentuale di riduzione di maschi catturati rispettivamente dell'85,3 e dell'87,5% (Fig. 8). Le percentuali di riduzione mensile sono state sempre molto elevate se si

esclude il mese di agosto quando sono stati registrati valori del 61,5% nella dose singola e 66,7% nella dose doppia.

La densità di popolazione, espressa come numero medio di cocciniglie per pianta, nel mese di giugno del 2013 è variata tra 3,8 nella dose singola e 6,7 nella parcella di controllo. Nel mese di luglio, in corrispondenza del flusso di neanidi della seconda generazione le densità hanno subito un incremento nel testimone e nella dose singola mentre nelle parcelle difese con la dose maggiore hanno avuto un lieve calo. L'ultimo rilievo effettuato a metà settembre ha evidenziato una generale riduzione della densità con valori medi di 2,4 cocciniglie/pianta nel controllo e nessun individuo nelle parcelle difese con la confusione sessuale. L'analisi statistica non ha tuttavia evidenziato differenze significative sull'andamento della densità stagionale rilevata nelle tre tesi (Tab. 2).

Nel 2014 la densità di popolazione rilevata a fine maggio è stata più elevata nella parcella di controllo con 9,9 cocciniglie/pianta contro valori di 2,2 e 0,8 rispettivamente in MDS e MDD. Nella seconda generazione, rilevata ai primi di luglio, la densità nel controllo è stata molto simile a quella rilevata in MDD mentre in MDS si è mantenuta molto bassa. Nei rilievi successivi si è assistito ad una progressiva riduzione dell'infestazione che è comunque risultata più bassa nelle parcelle difese con la confusione sessuale. L'analisi delle misure ripetute ha infatti evidenziato differenze statisticamente significative tra il controllo e le tesi trattate (Tab. 3).

Nel 2015 la densità di popolazione è stata molto elevata nella tesi di controllo dove a fine giugno sono state contate 46,5 cocciniglie/pianta. L'infestazione è poi progressivamente diminuita per arrivare a valori di 2,2 cocciniglie ai primi di ottobre. Nelle parcelle difese con la confusione sessuale la densità di popolazione è risultata prossima allo zero durante tutta la stagione vegetativa della vite. L'analisi statistica ha confermato una significativa minore densità di popolazione nelle parcelle trattate (Tab. 4).

La percentuale di femmine ovideponenti, calcolata sulla base delle femmine vergini esposte in campo, è stata sempre maggiore nelle parcelle di controllo. Nel 2013 le femmine esposte ai primi di giugno hanno deposto per il 90% nelle parcelle di controllo, per 78,9% nelle parcelle con dose singola di feromone e per il 44,8% con la dose doppia. Le femmine esposte in campo a metà luglio e a fine settembre hanno avuto un comportamento simile deponendo per il 100% quando posizionate nelle parcelle di controllo e per circa il 75% nelle parcelle con i diffusori di feromone (Tab. 5). Nel 2014 nelle parcelle di controllo la percentuale di femmine ovideponenti è variata dal 92 al 100% nel periodo tra maggio e ottobre mentre è stata solo del 50,4% nelle femmine esposte a novembre quando il volo dei maschi è meno intenso. Nelle parcelle difese con la dose minore di feromone la percentuale di femmine ovideponenti è variata dal 49 al 78% nel periodo maggio - ottobre e si è annullata a novembre. Nelle parcelle difese con la dose maggiore di feromone la percentuale di femmine ovigere è stata nettamente inferiore con valori compresi tra il 17 e il 64% nel primo periodo e pari a 0% a novembre. In tutte le tesi, i maggiori tassi di femmine fecondate sono stati registrati nel mese di luglio quando è stato massimo anche il numero di maschi catturati (Tab. 6). Nel 2015 la percentuale di femmine ovideponenti è stata molto elevata nel controllo, con valori medi prossimi al 100% nel periodo primaverile - estivo, mentre nelle altre tesi si sono registrati valori compresi tra 31 e 59% con la dose di feromone inferiore e tra 16 e 42% con la dose maggiore. Le femmine esposte a fine settembre hanno manifestato i tassi di ovideposizione del 97% nel controllo, del 11,1% nella dose singola e dello 0% nella dose doppia (Tab. 7).

La frazione di femmine che ha ovideposto ha avuto un intervallo di tempo tra l'esposizione in campo e l'inizio della deposizione delle uova nettamente superiore nelle parcelle difese con la confusione sessuale. Nel 2013 le femmine delle parcelle di controllo hanno infatti avuto una durata del periodo di preovideposizione di 7,1, 3,9 e 8,9 giorni quando esposte in campo rispettivamente a giugno luglio e agosto. Negli stessi mesi tale parametro è stato significativamente superiore nelle

tesi difese con i feromoni con valori rispettivamente di 21,6, 9,1 e 12,0 giorni in MDS e di 25,6, 8,3 e 13,8 giorni in MDD (Tab. 8). Nel 2014 il ritardo maggiore nella deposizione delle uova è stato registrato nelle femmine esposte a maggio che hanno presentato un periodo di preovideposizione di 12,8, 25,9 e 36,7 giorni rispettivamente in T, MDS e MDD. Nei mesi successivi le differenze fra parcelle di controllo e difese sono rimaste statisticamente significative con valori che sono variati fra 3,6 e 5,2 giorni in T, tra 7,0 e 10,8 giorni in MDS e tra 7,6 e 12,2 giorni in MDD. Le femmine esposte nel mese di novembre nelle parcelle di controllo hanno iniziato a ovideporre in circa 18 giorni mentre quelle esposte nelle parcelle col feromone non hanno ovideposto (Tab. 9). Nel 2015 sono stati confermati i risultati dei precedenti anni. Infatti, nelle parcelle di controllo le femmine hanno avuto un periodo di preovideposizione di circa 9 giorni quando esposte a fine maggio e di 3-5 giorni nei mesi di giugno agosto. Nelle parcelle difese con la dose singola di feromone tale periodo è stato di 20 giorni nelle femmine esposte a fine maggio e di 8-11 giorni nel periodo successivo. Nelle parcelle difese con la dose doppia di feromone il ritardo è stato ancora maggiore con valori di 33,2 giorni nelle femmine esposte a fine maggio e circa due settimane nei mesi seguenti (Tab. 10). Il tasso netto riproduttivo rilevato nel 2013 è variato nei diversi mesi di esposizione ma è risultato costantemente superiore nelle parcelle di controllo rispetto a quelle difese col feromone con valori medi annuali di 133, 106 e 83 uova femminili per femmina rispettivamente in T, MDS e MDD (Tab. 11). I dati dei due anni successivi hanno sostanzialmente confermato una differenza statistica del tasso netto riproduttivo tra le diverse tesi. Infatti, il numero medio di uova femminili per femmina nel controllo, nella dose singola e nella dose doppia è stato rispettivamente di 175, 111 e 74 nel 2014 (Tab. 12) e di 125, 65 e 35 nel 2015 (Tab. 13). Il ritardo con cui si sono accoppiate le femmine nelle parcelle difese col feromone hanno determinato un conseguente allungamento del tempo necessario a completare il ciclo biologico. La media annuale dei tempi medi di generazione rilevati a partire dalle femmine esposte nei diversi

mesi nelle parcelle di controllo sono stati di 52,6, 52,9 e 51,0 giorni rispettivamente nel 2013, 2014 e 2015. Nelle parcelle difese con la confusione sessuale i tempi medi di generazione rilevati nei tre anni sono stati di 59,1, 58,4 e 59,8 giorni con la dose singola di feromone e di 63,0, 60,4 e 62,3 con la dose doppia (Tabb. 14, 15 e 16).

Anche il tempo di duplicazione della popolazione (DT) è stato influenzato dalla confusione sessuale: nel controllo il valore medio annuale è stato di circa 7 giorni in tutti i tre anni di sperimentazione mentre nella tesi difesa con la dose singola di feromone DT è stato di 8,5, 8,9 e 10,0 giorni rispettivamente nel 2013, 2014 e 2015. Con l'impiego della dose maggiore di feromone tali tempi si sono ulteriormente allungati per arrivare a 10,6, 12,3 e 12,4 giorni nei rispettivi tre anni di osservazioni (Tabb. 17,18 e 19).

I parametri demografici che meglio sintetizzano gli effetti che la fecondità, la mortalità e la velocità di sviluppo hanno sulla capacità di crescita di una popolazione sono rappresentati dal tasso intrinseco di crescita e dal tasso finito di accrescimento. Questi parametri confermano che il potenziale biotico della cocciniglia è fortemente condizionato dalla confusione sessuale. Il tasso intrinseco di crescita, calcolato come media annuale, nei rispettivi tre anni d'indagine è stato di 0,095, 0,100 e 0,096 nelle parcelle di controllo, di 0,082, 0,082 e 0,063 nella dose singola, di 0,071, 0,066 e 0,050 nella dose doppia (Tabb. 20, 21 e 22).

Il tasso finito di crescita ha avuto lo stesso andamento del tasso intrinseco di crescita confermando la riduzione del potenziale biotico indotto dalla confusione sessuale. Nei rispettivi tre anni di sperimentazione, i valori medi annuali di λ sono stati 1,099, 1,105 e 1,100 nel controllo, 1,086, 1,086 e 1,066 nella dose singola e 1,074, 1,068 e 1,051 nella dose doppia (Tabb. 23, 24 e 25). Poiché il tasso finito di crescita rappresenta il numero di volte con cui una popolazione aumenta in un giorno, è possibile fare una proiezione di quante volte la popolazione aumenta in un determinato intervallo di tempo e apprezzare meglio il risultato di una sua riduzione determinata dalla

confusione sessuale. Prendendo ad esempio i λ ottenuti nel 2014 e facendo una proiezione in un periodo di tre mesi si calcola agevolmente che la popolazione del controllo crescerebbe di circa 7231 volte, quella delle parcelle difese con la dose singola di feromone di 1544 volte mentre quella difesa con la dose doppia di 349 volte. Nelle due tesi difese con la confusione sessuale, in tre mesi, le popolazioni di cocciniglia avrebbero un'abbondanza ridotta rispettivamente del 78 e del 95% rispetto a quelle del controllo.

Discussione

Questo studio chiarisce alcuni aspetti della biologia riproduttiva di *P. ficus* ed evidenzia gli effetti del ritardo della fecondazione sul potenziale biotico della specie.

Il tempo di sviluppo totale degli stadi preimmaginali allevati su germogli di patata a 25°C è stato di 30,5 giorni, in accordo con i risultati ottenuti in Sudafrica da Walton e Pringle (2005) in cocciniglie allevate su piantine di vite, ma in notevole contrasto con i tempi di sviluppo, quasi doppi, riscontrati su cocciniglie allevate su foglie di vite recise (Varikou *et al.*, 2010). Gli autori di quest'ultimo lavoro imputano questa forte disparità all'utilizzo di parti diverse della pianta ospite come substrato di alimentazione, di diverse cultivar e a possibili differenze genetiche tra le popolazioni studiate (sudafricane in un caso e greche nell'altro). Vista la sostanziale somiglianza dei dati di questo lavoro con quelli sudafricani, non è azzardato ipotizzare che gli insetti floemomizi (che si alimentano cioè di linfa floematica) trovino notevole difficoltà nell'alimentarsi su organi vegetali recisi e gradiscano maggiormente le piante vive.

Il periodo preriproduttivo delle femmine fecondate entro la prima settimana dallo sfarfallamento è stato di circa 11 giorni a 25°C, in netto contrasto col lavoro di Walton e Pringle (2005) che, per le stesse temperature, riportano periodi preriproduttivi di circa 4 giorni. Le fecondità medie sono invece state dello stesso ordine di grandezza attestandosi intorno a 300 uova per femmina.

Il comportamento riproduttivo delle femmine di *P. ficus*, fecondate in età crescenti della loro vita adulta, è risultato decisamente diverso da quello delle altre specie di fitofagi sottoposte a questo tipo di sperimentazione. In alcuni lepidotteri è stato dimostrato come un ritardo nell'accoppiamento di soli 4-6 giorni determini un declino della fecondità e della fertilità delle uova (Vickers, 1997; Jones e Aihara-Sasaki, 2001; Walker e Allen, 2011). Al contrario, la cocciniglia della vite non sembra influenzata negativamente dall'età in cui la femmina si accoppia. Infatti, gli esemplari fecondati a 3-4 settimane dal loro sfarfallamento hanno deposto un numero di uova fertili tendenzialmente

maggior rispetto a quelle accoppiate entro la prima settimana. Un comportamento così diverso può essere spiegato dalla differente biologia dei due gruppi sistematici. I lepidotteri generalmente attraversano i periodi critici invernali in stato di diapausa e gli adulti, attivi solo in condizioni ambientali favorevoli, completano la fase riproduttiva molto rapidamente. La cocciniglia farinosa della vite, invece, non va in diapausa ma semplicemente rallenta il suo ciclo, superando l'inverno per lo più allo stadio di femmina. Questa specie ha avuto, quindi, una diversa evoluzione che le ha permesso di conservare un ottimo potenziale riproduttivo anche dopo diversi mesi di vita. Infatti le femmine svernanti sono in genere più grandi e hanno una maggior fecondità (Lentini A., dati non pubblicati). Poiché la soglia termica minima per l'alimentazione è superiore a quella riproduttiva, (Walton e Pringle, 2005) in condizioni di basse temperature o se si impedisce l'accoppiamento, le femmine possono comunque alimentarsi e aumentare le loro riserve energetiche e, nel periodo in cui le condizioni ambientali lo consentono, produrre un elevato numero di uova.

L'età di accoppiamento della femmina non ha influito sulla sex ratio della progenie, nella quale la componente femminile ha rappresentato oltre il 60%. Studi condotti sulla congenera cocciniglia degli agrumi, *P. citri*, hanno invece evidenziato come la percentuale di uova femminili si attesti intorno al 50% e che solo con un ritardo della fecondazione di circa un mese tale percentuale possa arrivare al 60% (Ross *et al.*, 2011).

Un ritardo della fecondazione contenuto entro la prima settimana di vita non ha determinato un ritardo proporzionale sul periodo preriproduttivo della femmina adulta che, alla temperatura adottata, è stato di circa 10-12 giorni. La femmina può accoppiarsi subito dopo la sua emergenza (Waterworth *et al.*, 2011) ma, per maturare le uova e iniziare la deposizione, ha bisogno di un sufficiente lasso di tempo. Le femmine adulte di età superiore ai 7 giorni non iniziano comunque a ovideporre subito dopo l'accoppiamento, ma hanno un periodo di preovideposizione di alcuni giorni. Questo dato differisce dal comportamento osservato da Ross e collaboratori (2001) nella

specie congenerica *P. citri*, che ha mostrato periodi di preovideposizione superiori nelle femmine più attempate.

La prova di lotta triennale riportata in questo lavoro ha permesso di valutare gli effetti della confusione sessuale sulla biologia riproduttiva e sui parametri demografici della cocciniglia farinosa della vite. Il volo dei maschi, rilevato alle trappole a feromone, non è stato del tutto abbattuto e complessivamente si è avuta una riduzione delle catture compresa tra il 64 e l'85% con la dose singola di feromone e tra il 73 e l'87% con la dose doppia. Tuttavia, almeno nell'ultimo biennio di sperimentazione, la percentuale di riduzione dei voli più elevata (95%) è stata rilevata nei mesi di ottobre e novembre prima dello svernamento. Poiché le cocciniglie svernano prevalentemente come femmine fecondate (Lentini *et al.*, 2008), un'efficace confusione sessuale nei mesi autunnali potrebbe portare allo svernamento di una maggiore percentuale di femmine vergini, con un conseguente ritardo nella crescita delle popolazioni nella successiva primavera. Infatti, le femmine fecondate iniziano a ovideporre a partire da aprile mentre quelle vergini devono aspettare il primo volo dei maschi che inizia a maggio.

L'abbattimento dei voli dei maschi non è tuttavia sempre accompagnato a una efficace controllo delle popolazioni (Rodriguez-Saona e Stelinski, 2009). Nella nostra prova la forte aggregazione delle popolazioni di cocciniglie non sempre ha permesso di evidenziare differenze significative di infestazione tra le tesi sebbene nelle parcelle di controllo la densità di cocciniglie per pianta è stata tendenzialmente sempre maggiore e si è mantenuta elevata negli anni. Le parcelle difese con la confusione sessuale hanno invece mostrato densità minori che, inoltre, si sono ridotte nel tempo confermando che questa tecnica incrementa la sua efficacia quando impiegata per più anni, come evidenziato da Louis e collaboratori (1997) per *Lobesia botrana*.

L'analisi dei parametri riproduttivi ha confermato l'efficacia della confusione sessuale che ha determinato una riduzione della percentuale di femmine ovideponenti, un allungamento del periodo

preriproduttivo e una riduzione della fecondità. Quest'ultimo dato è in contrasto con quanto osservato in laboratorio dove il tasso netto riproduttivo rimane elevato anche nelle femmine più attempate. La ridotta fecondità di campo potrebbe essere attribuita all'azione diretta del feromone sulle femmine, come dimostrato per *L. botrana* le cui femmine quando tenute aggregate aumentano l'emissione di feromone e, in tal modo, consumano le riserve energetiche necessarie per la produzione delle uova (Harari *et al.*, 2011). Le variazioni di parametri riproduttivi hanno notevoli ripercussioni sulla capacità di accrescimento delle popolazioni degli insetti. Le cocciniglie tenute nelle parcelle difese con la confusione sessuale hanno, infatti, manifestato un maggiore tempo medio di generazione e un maggiore tempo di duplicazione della popolazione mentre hanno avuto un minore tasso intrinseco di crescita e un minore tasso finito di accrescimento. Anche la dose di feromone impiegato ha sicuramente determinato un incremento di efficacia. Sebbene nei singoli anni non sempre è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa dei parametri rilevati, i tassi di crescita delle popolazioni sono stati comunque sempre inferiori nelle parcelle difese con la dose maggiore di feromone. I parametri demografici stimati durante i diversi mesi della sperimentazione in campo non hanno un valore assoluto ma sono sovrastimati. Infatti, essi non tengono conto delle mortalità preimmaginali e si basano su curve di deposizioni ottimali ottenute a 25°C in laboratorio, condizioni che in pieno campo si verificano solo nei mesi di luglio e di agosto. Tuttavia, questi parametri hanno un valore comparativo tra le tesi e sono un utile strumento per stimare la riduzione relativa dell'abbondanza di popolazione di tesi trattate rispetto a un controllo. L'esame comparato dei parametri demografici dei diversi gruppi di fitofagi indica che la tecnica della confusione sessuale ha una maggiore probabilità di successo contro i lepidotteri che, anche con un ritardo della fecondazione delle femmine di pochi giorni, subiscono un piccolo sfasamento del ciclo biologico ma una forte riduzione della fecondità con un conseguente crollo della capacità di accrescimento delle popolazioni (Vickers, 1997; Jones e Aihara-Sasaki, 2001; Walker e Allen,

2011). I risultati di questa ricerca dimostrano che anche le infestazioni di *P. ficus* possono essere contenute con la tecnica della confusione sessuale. Infatti, anche nel caso in cui non si verifichi il totale annullamento degli accoppiamenti e che la riduzione della fecondità non sia comparabile con quella indotta sui lepidotteri, il ritardo della fecondazione indotta dalla confusione sessuale è sufficiente a ridurre il numero di generazioni che l'insetto riesce potenzialmente a completare durante l'anno.

Le proiezioni ottenute in questo studio sono solo teoriche e si riferiscono a popolazioni artificialmente posizionate in campo e protette all'interno di contenitori plastici. In natura agiscono però numerosi fattori di contenimento delle popolazioni che potrebbero determinare maggiori mortalità nelle cocciniglie che, per il ritardo della fecondazione, allungano la durata del loro ciclo biologico. Si tratta cioè di stabilire se, qualora l'uso di insetticidi di sintesi a largo spettro d'azione venga sostituito dalla tecnica della confusione sessuale, i parassitoidi e i predatori, non più falciati dai trattamenti chimici, possano determinare una mortalità aggiuntiva che rende possibile una riduzione accettabile del livello d'infestazione delle cocciniglie.

Bibliografia

- Agnello A.M., Reissig W.H., Spangler S.M., Charlton R.E., Kain D.P., 1996 - Trap response and fruit damage by obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) in pheromone-treated apple orchards in New York. *Environ. Entomol.*, 25: 268-282.
- Barclay H.J., Judd G.J.R., 1995 - Models for mating disruption by means of pheromone for insect pest control. *Res. Popul. Ecol.*, 37: 239-247.
- Bartell R.J., 1982 - Mechanism of communication disruption by pheromone in the control of Lepidoptera: a review. *Physiol. Entomol.*, 7: 353-364.
- Blumberg D., Klein M., Mendel Z., 1995 - Response by encapsulation of four mealy- bug species (Homoptera: Pseudococcidae) to parasitization by *Anagyrus pseudococci*. *Phytoparasitica*, 23: 157-163.
- Cardé R.T., Minks A.K., 1995 - Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 559-585.
- Carey J.R., 1993 - Applied demography for biologist with special emphasis on insects. Oxford University Press, New York.
- Cocco A., Coinu M., Lentini A., Serra G., Delrio G., 2011 - Mating disruption field trials to control the vine mealybug *Planococcus ficus*. *IOBC/wprs Bull.*, 67: 215-221.
- Cocco A., Lentini A., Serra G., 2014 - Mating disruption of the vine mealybug, *Planococcus ficus*, in vineyards using reservoir pheromone dispensers. *J. Insect Sci.*, 14(1), 144. doi: 10.1093/jisesa/ieu006.
- Daane K.M., Malakar-Kuenen R.D., Guillén M., Bentley W.J., Martin L.A., Yokota G.Y., 2003 - Population dynamics of the vine mealybug and its natural enemies in the Coachella and San

- Joaquin Valleys. In: 2001-2002 Viticulture Research Report,. California Table Grape Commission Annual Report, 31: 15.
- Demontis M.A., Ortu S., Cocco A., Lentini A., Migheli Q., 2007 - Diagnostic markers for *Planococcus ficus* (Signoret) and *Planococcus citri* (Risso) by random amplification polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. J. Appl. Entomol., 131: 59-64.
- Fadamiro H.Y., Cossé A. A., Baker T.C., 1999 - Mating disruption by European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, by using two types of sex pheromone dispensers deployed in grassy aggregation sites in Iowa cornfields. J. Asia-Pac. Entomol., 2: 121-132.
- Godfrey K., Ball J., Gonzalez D., Reeves E., 2003 - Biology of the vine mealybug in vineyards in the Coachella Valley. California Southwest. Entomol., 28: 183-196.
- Harari AR, Zahavi T, Thiery D., 2011 - Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. Evolution, 65:1572–1582.
- Hinkens D.M., McElfresh J.S, Millar J.G., 2001 - Identification and synthesis of the sex pheromone of the vine mealybug, *Planococcus ficus*. Tetrahedron Lett., 42: 1619-1621.
- Ioriatti C., Lucchi A., Bagnoli B., 2008 - Grape area wide pest management in Italy. In: Koul O., Cuperus G.W., Elliott N (eds) Areawide pest management: theory and implementation. CABI International, Wallingford, pp 208–225.
- Ioriatti C., Anfora G., Tasin M., De Cristofaro A., Witzgall P., Lucchi A., 2011 - Chemical ecology and management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera; Tortricidae). J. Econ. Entomol., 104:1125–1137.
- Jones V.P., Aihara-Sasaki M., 2001 - Demographic analysis of delayed mating in mating disruption: a case study with *Cryptophlebia illepidata* (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol., 94: 785-792.

- Kast W. K., 2001 - Twelve years of practical experience using mating disruption against *Eupoecilia ambiguella* and *Lobesia botrana* in vineyards of the Wuerttemberg region, Germany. IOBC/wprs Bull., 24(2): 71-73.
- Knight A.L., 1996 - Why so many mated female codling moths in disrupted orchards? Proc. Wash. St. Hortic. Assoc., 92: 213-214.
- Lawson D.S., Reissig W.H., Agnello A.M., Nyrop J.P., Roelofs W.L., 1996 - Interference with the mate-finding communication system of the obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) using synthetic sex pheromones. Environ. Entomol., 25: 895-905.
- Lentini A., Serra G., Ortu S., Delrio G., 2008 - Seasonal abundance and distribution of *Planococcus ficus* on grape vine in Sardinia. IOBC/wprs Bull., 36: 267-272.
- Louis F., Schirra K.J., Feldhege M., 1997 - Mating disruption in vineyards: determination of population densities and effects on beneficials. IOBC/wprs Bull., 20(1): 95-99.
- Mclaughlin J.R., Mitchell E.R., Kirsch P., 1994 - Mating disruption of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage: reduction of mating and suppression of larval populations. J. Econ. Entomol., 87: 1198-1204.
- Melandri M., Dradi D., Reggiani A., Pradolesi G., Scannavini M., Paolini S., Franceschelli F., Cavazza F., Pasqualini E., 2012 - *Planococcus ficus*, la cocciniglia più diffusa nei vigneti italiani. L'Informatore fitopatologico, 10: 13-14.
- Miano J.L., Becerra V.C., Gonzalez M.F., 2011 - Mating disruption for *Planococcus ficus* S.: How to successfully initiate a novel sustainable control tool. Phytopathology, 101: S120.
- Millar J.G., Daane K.M., McElfresh J.S., Moreira J.A., Malakar-Kuenen R., Guillén M., Bentley W.J., 2002 - Development and optimization of methods for using sex pheromone for monitoring the mealybug *Planococcus ficus* (Homoptera: Pseudococcidae) in California vineyards. J. Econ. Entomol., 95: 706-714.

- Prota R., Delrio G., Luciano P., 1989 - Prospect of integrated control of the main pests in Sardinian viticulture. Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium "Plant protection problems and prospects of integrated control in viticulture", Lisboa-Vila Real, Portugal, 6-9 giugno 1988: 755-761.
- Rice R.E., Kirsch P., 1990 - Mating disruption of oriental fruit moth in the United States. In Ridgway R.L., Silverstein R.M., Inscoc M.N (eds), Behavior - modifying Chemicals for Insect Management, Marcel Dekker, New York, pp 193-211.
- Ross L., Langenhof M.B.W., Pen I., Beukeboom L.W., Stuart A.W., David M.S., 2010 - Sex allocation in a species with paternal genome elimination: the roles of crowding and female age in the mealybug *Planococcus citri*. *Evol. Ecol. Res.*, 12: 89-104.
- Ross L., Dealey E.J., Beukeboom L.W., Shuker D.M., 2011 - Temperature, age of mating and starvation determine the role of maternal effects on sex allocation in the mealybug *Planococcus citri*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 65: 909-919.
- Sanders C.J., Cardé R.T., Minks A.K., 1997 - Mechanisms of mating disruption in moths. *Insect Pheromone Research: New Directions*. New York: Inter Thomson Pub., 333-346.
- Stelinski L.L., Rodriguez-Saona C., Meyer W.L., 2009 - Recognition of foreign oviposition marking pheromone in a multi-trophic context. *Naturwissenschaften*, 96: 585-592.
- Varikou K., Birouraki A., Bagis N., Kontodimas D.C., 2010 - Effect of temperature on the development and longevity of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 103: 943-948.
- Vickers R.A., 1997 - Effect of delayed mating on oviposition pattern, fecundity and fertility in codling moths, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Aust. J. Entomol.*, 36:179-182.
- Walker P.W., Allen G.R., 2011 - Mating frequency and reproductive success in an income breeding moths: *Mnesampela privata*. *Entomol. Exp. Appl.*, 136: 290-300.

- Walton V.M., Pringle K.L., 2005 - Developmental biology of vine mealybug , *Planococcus ficus* (Signoret) (Homoptera: Pseudococcidae) and its parasitoid *Coccidoxenoides perminutus* (Timberlake) (Hymenoptera: Encyrtidae). Afr. Entomol., 13 : 143-147.
- Walton V.M., Daane K.M., Walter J., Bentley W.J., Millar J.G., Larsen T.E., Malakar-kuenen R., 2006 - Pheromone-based mating disruption of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in California vineyards. J. Econ. Entomol., 99: 1280-1290.
- Waterworth R.A., Wright I.M., Millar J.G., 2011 - Reproductive biology of three cosmopolitan mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni*, and *Planococcus ficus*. Ann. Entomol. Soc. Am, 104: 249-260.

Figure e tabelle

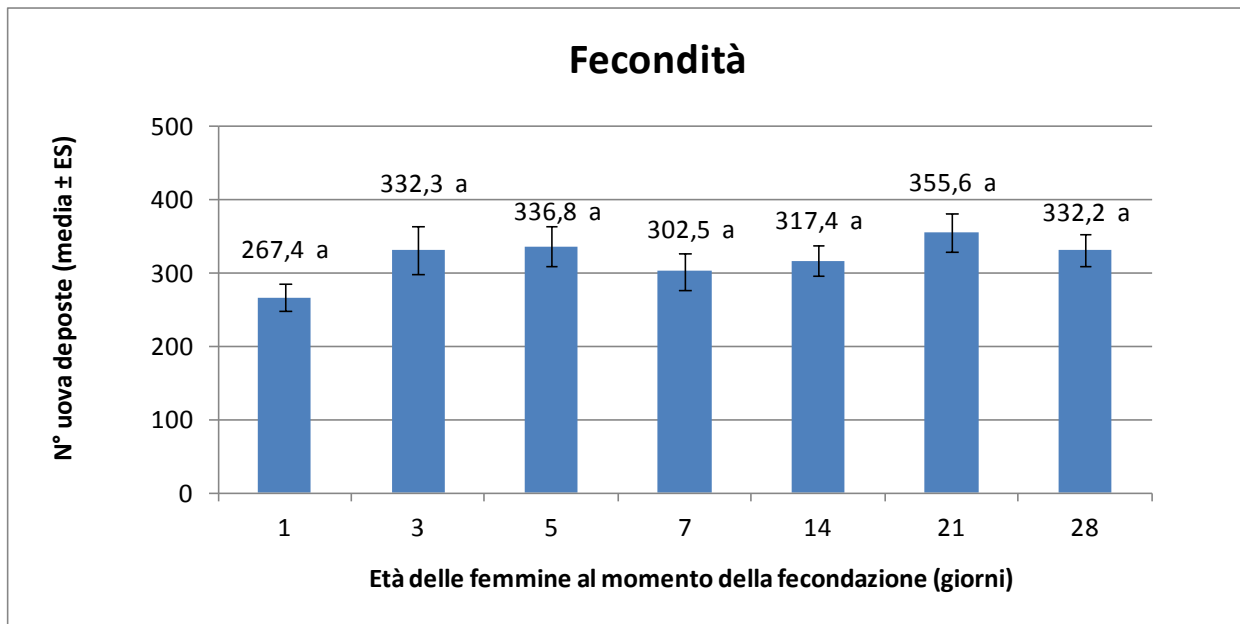


Figura 1. Fecondità media di femmine di *Planococcus ficus* fecondate a età crescenti. I valori seguiti da lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (analisi della varianza impiegando le femmine come repliche e separazione delle medie col test di Tukey: $F_{160,6} = 1,41$; $P = 0,212$).

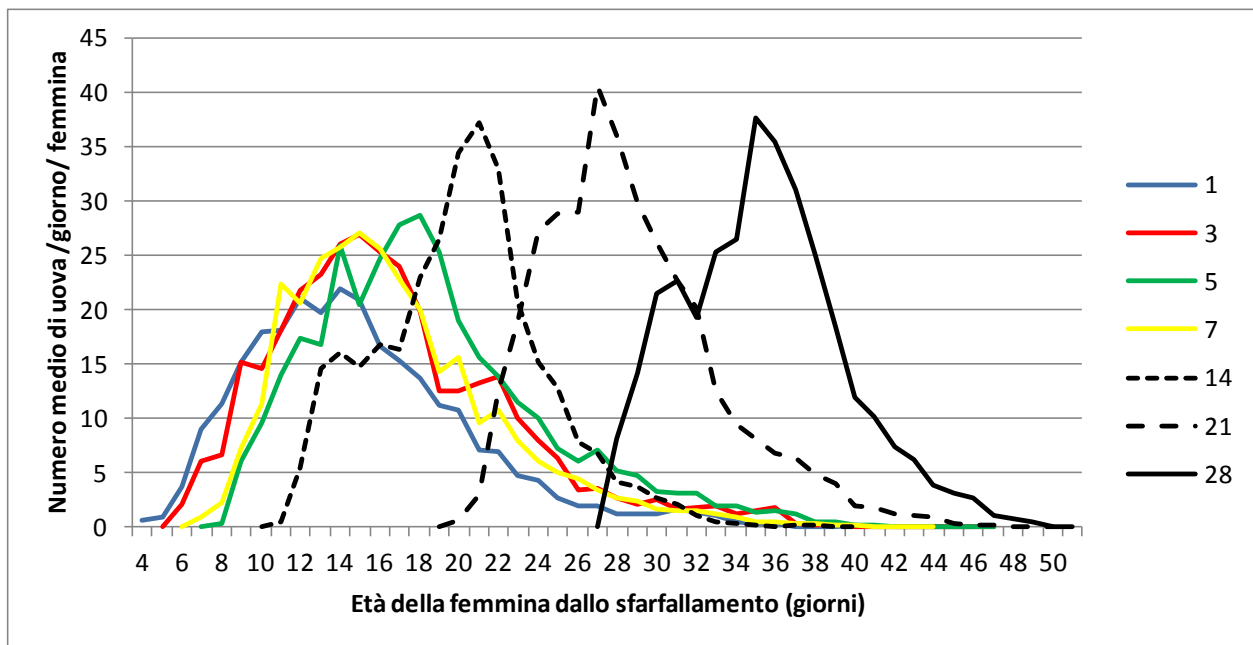


Figura 2. Curve di ovideposizione espresse come numero medio di uova deposte giornalmente da femmine accoppiate a età crescenti della loro vita adulta.

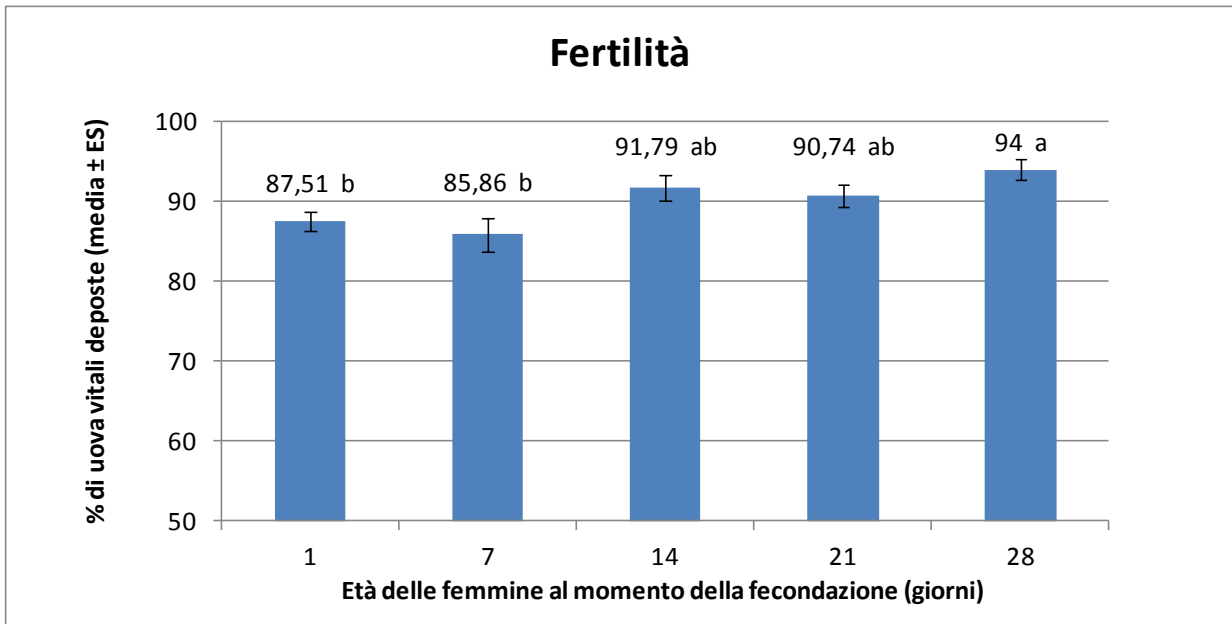


Figura 3. Fertilità media di femmine di *Planococcus ficus* fecondate a età crescenti. I valori seguiti da lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (analisi della varianza impiegando come repliche le femmine e separazione delle medie col test di Tukey: $F_{45,4} = 4,60$, $P < 0,01$).

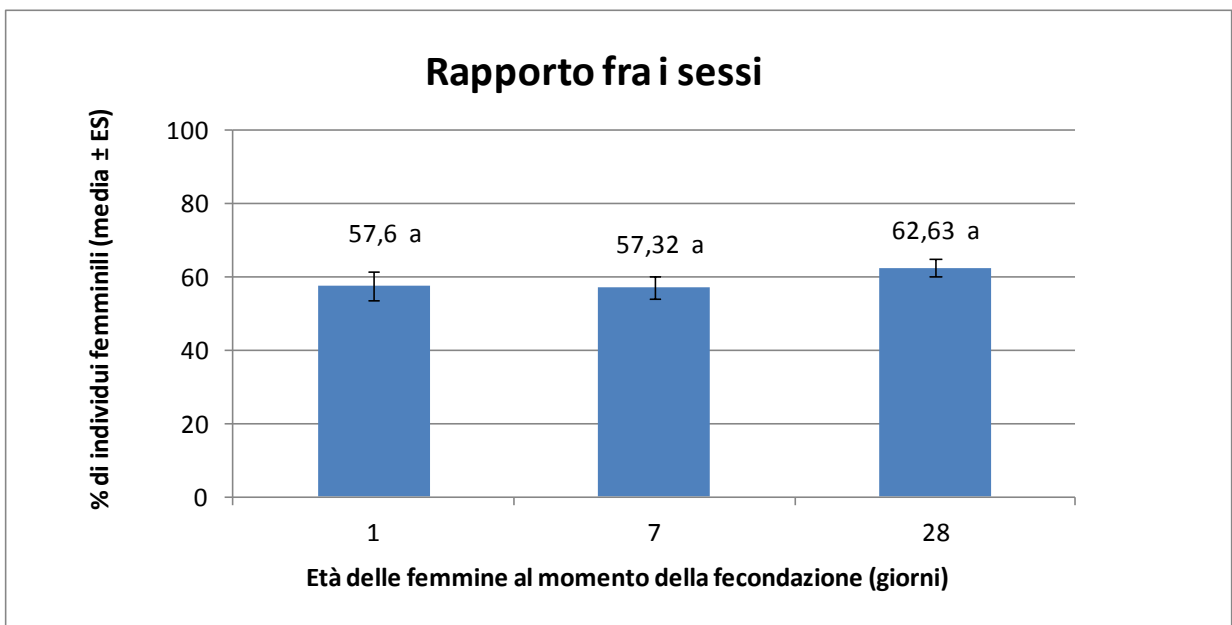


Figura 4. Rapporto fra i sessi, espresso come percentuale di uova femminili generate da femmine di *Planococcus ficus* fecondate a età crescenti. I valori seguiti da lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (analisi della varianza impiegando le femmine come repliche e separazione delle medie col test di Tukey: $F_{37,3} = 0,61$, $P = 0,6147$).

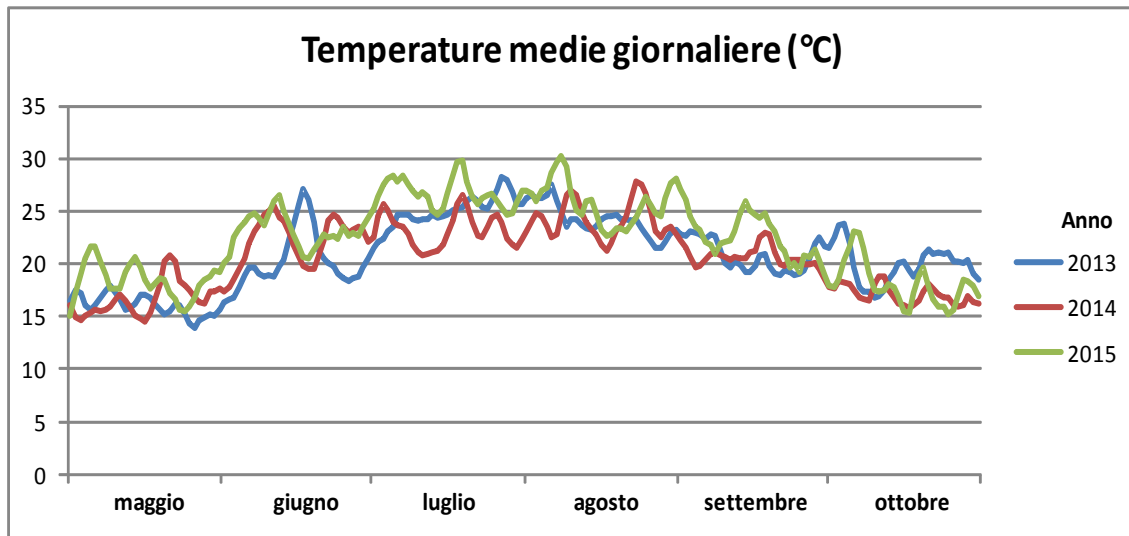


Figura 5. Andamento delle temperature medie rilevate da una capannina meteo posizionata nel vigneto sperimentale (Alghero 2013-2015).

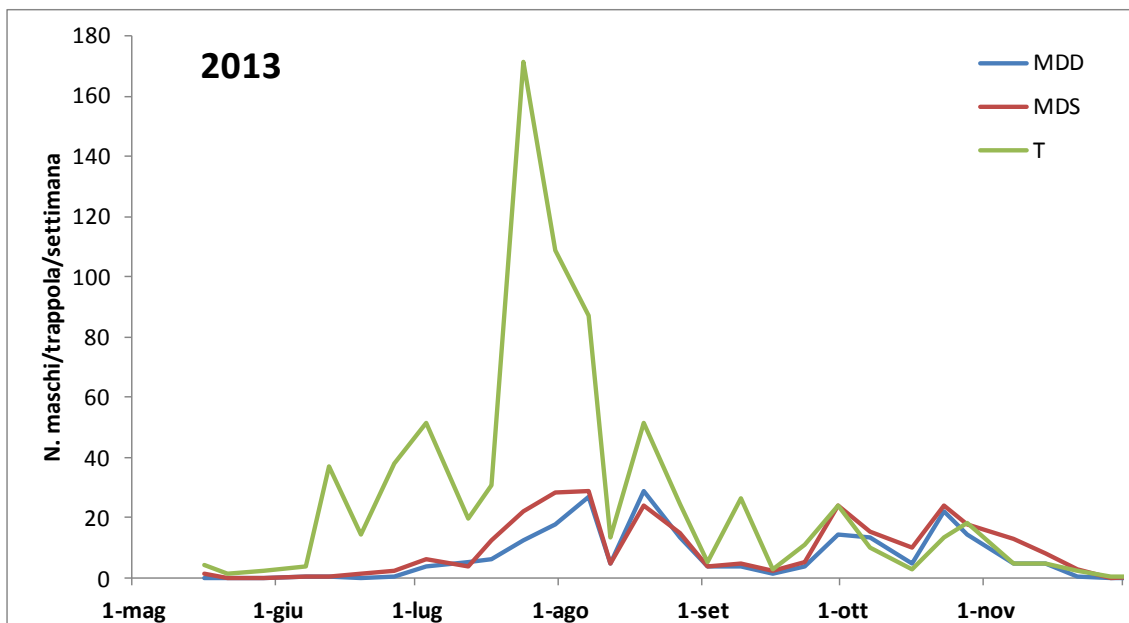


Figura 6. Andamento dei voli dei maschi di *Planococcus ficus* espressi come numero medio di individui catturati settimanalmente nelle trappole innescate col feromone sessuale (Alghero, 2013).

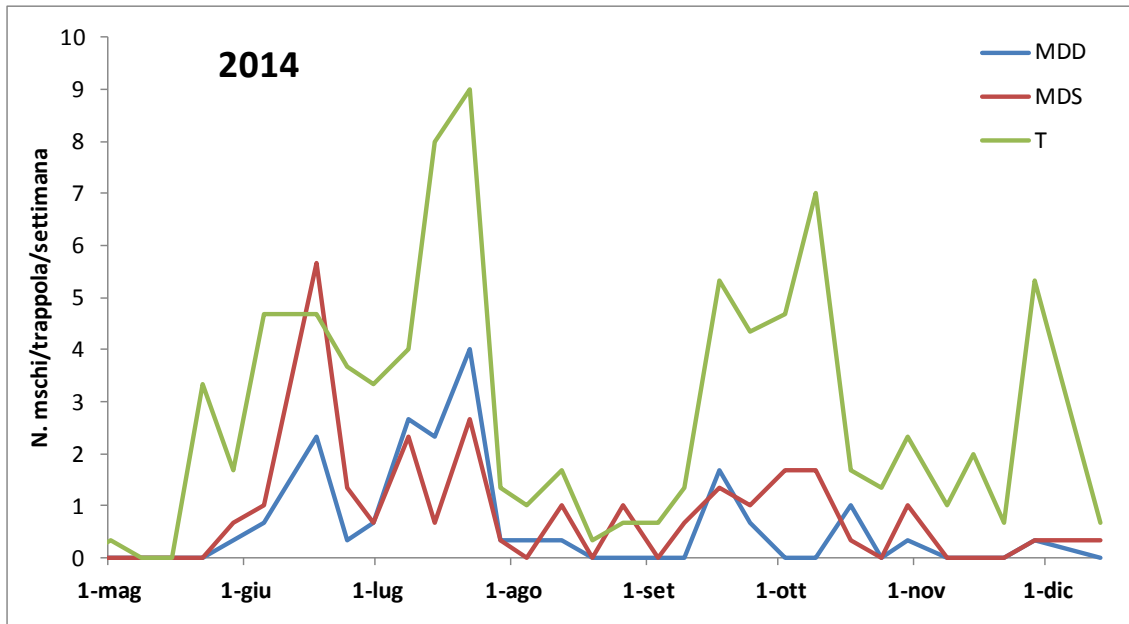


Figura 7. Andamento dei voli dei maschi di *Planococcus ficus* espressi come numero medio di individui catturati settimanalmente nelle trappole innescate col feromone sessuale (Alghero, 2014).

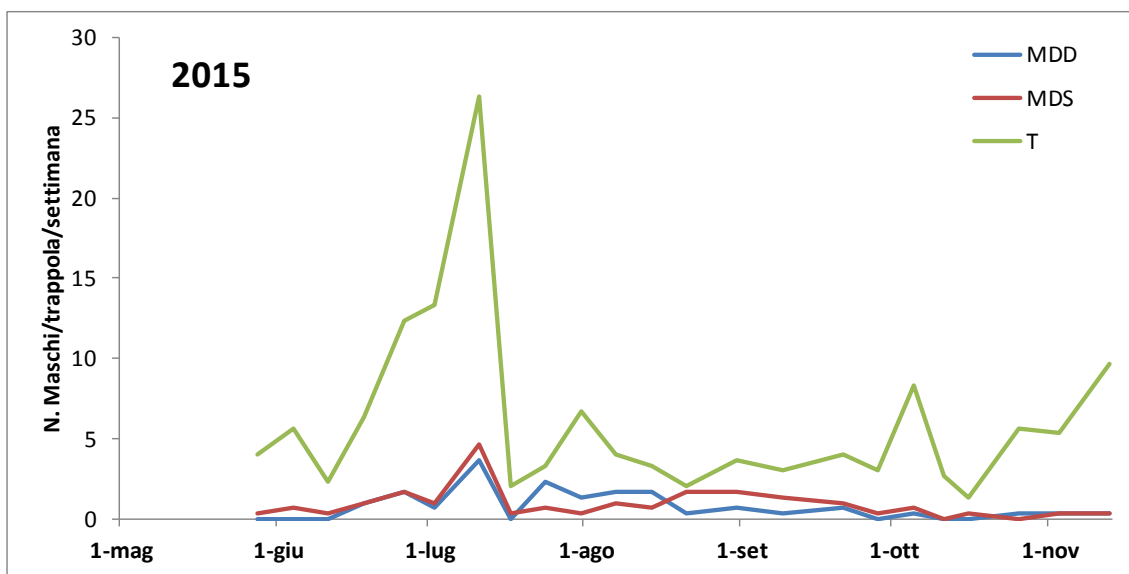


Figura 8. Andamento dei voli dei maschi di *Planococcus ficus* espressi come numero medio di individui catturati settimanalmente nelle trappole innescate col feromone sessuale (Alghero, 2015).

Tabella 1. Parametri biologici e riproduttivi di femmine di *Planococcus ficus* fecondate a età crescenti. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le femmine e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey.

Età della femmine (gg)	Sviluppo preimmaginale	Periodo di preovideposizione	Periodo preriproduttivo	Periodo di ovideposizione	Durata totale di vita
	media ± ES	media ± ES	media ± ES	media ± ES	media ± ES
1	29,66 ± 0,42	9,18 ± 0,39 a	10,14 ± 0,40 f	14,92 ± 1,21	56,96 ± 1,43 c
3	30,36 ± 0,44	7,06 ± 0,42 b	10,56 ± 0,42 ef	15,44 ± 1,82	56,42 ± 1,90 c
5	30,71 ± 0,35	6,27 ± 0,52 bc	11,78 ± 0,52 de	16,33 ± 1,40	60,27 ± 2,08 c
7	29,36 ± 0,41	5,04 ± 0,42 cd	12,34 ± 0,43 d	14,80 ± 1,24	57,42 ± 1,27 c
14	30,06 ± 0,30	3,52 ± 0,19 e	17,92 ± 0,20 c	13,20 ± 0,49	61,38 ± 0,77 c
21	29,46 ± 0,49	3,38 ± 0,11 e	24,82 ± 0,12 b	13,20 ± 0,70	68,60 ± 1,00 b
28	29,48 ± 0,50	3,66 ± 0,12 de	32,08 ± 0,11 a	13,04 ± 0,50	76,16 ± 0,77 a
	F _{160,6} = 1,48 P = 0,189	F _{160,6} = 41,95 P < 0,001	F _{160,6} = 614,78 P < 0,001	F _{160,6} = 1,42 P = 0,212	F _{160,6} = 29,83 P < 0,001

Tabella 2. Numero medio di individui di *Planococcus ficus* per pianta (± errore standard) in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD) (Alghero, 2013). I valori seguiti da lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (analisi della varianza con misure ripetute impiegando come repliche le parcelle e separazione delle medie col test di Tukey: F_{2,18} = 0,81, P = 0,461).

N° di cocciniglie per pianta (media ± ES)				
	19/06/2013	12/07/2013	12/09/2013	Media annuale
MDD	4,53 ± 1,18	3,11 ± 2,78	0,00 ± 0,00	2,55 ± 1,10 a
MDS	3,80 ± 1,87	17,61 ± 8,95	0,02 ± 0,02	7,14 ± 3,76 a
T	6,67 ± 3,33	24,27 ± 23,78	2,42 ± 1,79	11,12 ± 7,71 a

Tabella 3. Numero medio di individui di *Planococcus ficus* per pianta (\pm errore standard) in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD) (Alghero, 2014). I valori seguiti da lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (analisi della varianza con misure ripetute impiegando come repliche le parcelle e separazione delle medie col test di Tukey: $F_{2,27} = 5,23$, $P = 0,012$).

N° di cocciniglie per pianta (media \pm ES)					
	27/05/2014	01/07/2014	31/07/2014	03/09/2014	Media annuale
MDD	0,77 \pm 0,65	6,61 \pm 5,17	1,04 \pm 0,33	0,08 \pm 0,05	2,13 \pm 1,36 b
MDS	2,19 \pm 1,64	1,89 \pm 0,53	0,78 \pm 0,47	0,00 \pm 0,00	1,21 \pm 0,46 b
T	9,90 \pm 7,65	7,41 \pm 4,55	4,38 \pm 3,00	2,86 \pm 1,71	6,14 \pm 2,19 a

Tabella 4. Numero medio di individui di *Planococcus ficus* per pianta (\pm errore standard) in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD) (Alghero, 2015). I valori seguiti da lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (analisi della varianza con misure ripetute impiegando come repliche le parcelle e separazione delle medie col test di Tukey: $F_{2,27} = 5,37$, $P = 0,011$).

N° di cocciniglie per pianta (media \pm ES)					
	25/06/2015	31/07/2015	31/08/2015	12/10/2015	Media annuale
MDD	0,02 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	0,02 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,007 b
MDS	0,00 \pm 0,00	0,07 \pm 0,04	0,02 \pm 0,02	0,13 \pm 0,10	0,056 \pm 0,028 b
T	46,53 \pm 23,80	9,98 \pm 7,80	8,42 \pm 7,71	2,17 \pm 1,10	16,77 \pm 7,67 a

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Tabella 5. Percentuale di femmine ovideponenti di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2013).

Percentuale di femmine ovideponenti (media \pm ES)								
	24/06/2013	07/06/2013	18/07/2013	25/08/2013	23/09/2013	11/10/2013	31/10/2013	media
MDD	71,67 \pm 20,88 a	44,79 \pm 12,43 b	74,07 \pm 15,16 a	62,85 \pm 17,19 a	74,07 \pm 15,16 a	52,91 \pm 9,27 b	45,2 \pm 24,86 a	59,61 \pm 6,30 b
MDS	72,32 \pm 11,66 a	78,87 \pm 8,51 a	75,24 \pm 12,21 a	88,36 \pm 8,33 a	75,24 \pm 12,21 a	79,3 \pm 10,41 ab	36,84 \pm 4,59 a	73,59 \pm 4,66 b
T	96,67 \pm 11,67 a	90,31 \pm 2,07 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	92,13 \pm 3,96 a	96,33 \pm 1,15 a
	(F _{2,6} = 1,58 , P = 0,2816)	(F _{2,6} = 7,14 , P = 0,0259)	(F _{2,6} = 4,43 , P = 0,0657)	(F _{2,6} = 4,33 , P = 0,0684)	(F _{2,6} = 0,84 , P = 0,4758)	(F _{2,6} = 8,9 , P = 0,016)	(F _{2,6} = 3,41 , P = 0,1023)	(F _{2,60} = 16,61 , P < 0,0001)

Tabella 6. Percentuale di femmine ovideponenti di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2014).

Percentuale di femmine ovideponenti (media \pm ES)							
	12/05/2014	19/06/2014	18/7/2014	12/09/2014	13/10/2014	01/11/2014	media
MDD	17,76 \pm 14,34 a	64,30 \pm 11,53 a	37,63 \pm 11,02 a	49,62 \pm 10,75 b	26,62 \pm 10,43 b	0,00 \pm 0,0 b	32,65 \pm 6,99 c
MDS	66,48 \pm 29,75 a	77,90 \pm 11,53 a	58,3033 \pm 20,14 a	74,74 \pm 10,75 ab	49,14 \pm 10,43 b	0,00 \pm 0,0 b	54,43 \pm 8,35 b
T	92,46 \pm 4,14 a	100,00 \pm 11,53 a	89,0833 \pm 6,42 a	96,67 \pm 10,75 a	97,44 \pm 10,43 a	50,45 \pm 12,32 a	87,68 \pm 4,63 a
	(F _{2,6} = 3,67 , P = 0,0909)	(F _{2,6} = 3,13 , P = 0,1171)	(F _{2,6} = 3,82 , P = 0,085)	(F _{2,6} = 6,84, P = 0,0283)	(F _{2,6} = 15,00 , P = 0,0046)	(F _{2,6} = 15,00 , P = 0,0046)	(F _{2,51} = 16,41 , P < 0,001)

Tabella 7. Percentuale di femmine ovideponenti di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2015).

Percentuale di femmine ovideponenti (media \pm ES)								
	29/05/2015	18/06/2015	11/07/2015	31/07/2015	14/08/2015	28/08/2015	28/09/2015	media
MDD	41,1 \pm 4,8 b	42,9 \pm 7,1 b	30,6 \pm 22,7 b	28,5 \pm 9,7 a	31,9 \pm 10,8 b	16,7 \pm 16,7 b	0,00 \pm 0,00 b	27,38 \pm 4,99 b
MDS	35,6 \pm 19,7 b	54,2 \pm 23,2 ab	59,5 \pm 17,1 ab	37,0 \pm 22,5 a	59,3 \pm 19,6 b	31,0 \pm 15,6 b	11,11 \pm 11,11 b	41,09 \pm 6,76 b
T	100,0 \pm 0,0 a	100,0 \pm 0,0 a	100,0 \pm 0,0 a	88,9 \pm 6,4 a	100,0 \pm 0,0 a	94,4 \pm 5,6 a	96,67 \pm 3,33 a	97,14 \pm 1,40 a
	(F _{2,6} = 9,27 , P = 0,0146)	(F _{2,6} = 7,37 , P = 0,0242)	(F _{2,6} = 7,03 , P = 0,0267)	(F _{2,6} = 4,12, P = 0,0749)	(F _{2,6} = 12,3 , P = 0,0075)	(F _{2,6} = 7,58 , P = 0,0228)	(F _{2,6} = 35,15 , P = 0,0005)	(F _{2,60} = 26,67 , P < 0,0001)

Tabella 8. Durata del periodo di preovideposizione di *Planococcus ficus*, espressa come numero di giorni intercorsi tra il posizionamento in campo delle femmine vergini e l'inizio dell'ovideposizione in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le femmine e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2013).

Durata del periodo di preovideposizione (media \pm ES)								
	24/06/2013	07/06/2013	18/07/2013	25/08/2013	23/09/2013	11/10/2013	31/10/2013	media
MDD	15,77 \pm 1,66 a	25,58 \pm 2,03 a	8,32 \pm 1,03 a	17,85 \pm 2,27 a	13,81 \pm 1,56 a	13,17 \pm 0,98 a	14,75 \pm 3,52 a	15,61 \pm 0,64 a
MDS	16,9 \pm 1,60 a	21,56 \pm 1,72 b	9,12 \pm 0,91 a	10,63 \pm 1,36 b	12 \pm 1,39 ab	11,67 \pm 0,83 a	13,89 \pm 3,03 a	13,68 \pm 0,57 a
T	7,72 \pm 0,57 b	7,14 \pm 0,55 c	3,94 \pm 0,21 b	4,71 \pm 0,29 c	8,88 \pm 0,78 b	8,24 \pm 0,47 b	7,762 \pm 0,63 a	6,91 \pm 0,47 b
	(F _{2,137} = 17,27 , P < 0,0001)	(F _{2,113} = 68,64 , P < 0,0001)	(F _{2,133} = 24,61 , P < 0,0001)	(F _{2,125} = 53,58 , P < 0,0001)	(F _{2,59} = 5,52 , P = 0,0063)	(F _{2,48} = 14,68 , P < 0,0001)	(F _{2,35} = 5,95 , P = 0,0059)	(F _{2,668} = 74,98, P < 0,0001)

Tabella 9. Durata del periodo di preovideposizione di *Planococcus ficus* espressa come numero di giorni intercorsi tra il posizionamento in campo delle femmine vergini e l'inizio dell'ovideposizione in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le femmine e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2014).

Durata del periodo di preovideposizione (media \pm ES)							
	12/05/2014	19/06/2014	18/07/2014	12/09/2014	13/10/2014	01/11/2014	media (meno Novembre)
MDD	36,75 \pm 5,53 a	12,21 \pm 1,65 a	12,59 \pm 2,50 a	8,96 \pm 1,06 a	7,57 \pm 1,83 a	*	12,68 \pm 1,15 a
MDS	25,92 \pm 1,82 a	10,83 \pm 1,28 a	8,71 \pm 1,23 a	10,40 \pm 1,09 a	7,00 \pm 0,56 a	*	12,01 \pm 0,72 a
T	12,85 \pm 1,16 b	3,61 \pm 0,13 b	4,04 \pm 0,22 b	5,25 \pm 0,24 b	4,58 \pm 0,20 b	18,75 \pm 1,06	5,82 \pm 0,32 b
	(F _{2,71} = 39,5 , P < 0,0001)	(F _{2,126} = 50,02 , P < 0,0001)	(F _{2,99} = 18,74 , P < 0,0001)	(F _{2,96} = 14,69 , P < 0,0001)	(F _{2,87} = 9,69 , P = 0,0002)		(F _{2,491} = 36,58 , P < 0,0001)

* nessuna femmina ovideponente

Tabella 10. Durata del periodo di preovideposizione di *Planococcus ficus* espressa come numero di giorni intercorsi tra il posizionamento in campo delle femmine vergini e l'inizio dell'ovideposizione in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le femmine e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2015).

Durata del periodo di preovideposizione (media \pm ES)								
	29/05/2015	18/06/2015	11/07/2015	31/07/2015	14/08/2015	28/08/2015	28/09/2014	media
MDD	33,25 \pm 4,84 a	17,90 \pm 3,11 a	7,57 \pm 1,59 a	15,75 \pm 3,47 a	15,20 \pm 3,81 a	14,60 \pm 6,42 a	*	18,18 \pm 1,89 c
MDS	20,00 \pm 4,78 a	10,79 \pm 1,70 b	8,40 \pm 1,54 a	11,57 \pm 3,30 a	10,19 \pm 2,04 a	10,17 \pm 2,18 a	16,67 \pm 5,36	10,97 \pm 0,98 b
T	8,71 \pm 1,50 b	3,83 \pm 0,17 c	3,19 \pm 0,09 b	5,42 \pm 0,53 b	3,84 \pm 0,17 b	4,26 \pm 0,40 b	10,60 \pm 1,26	4,74 \pm 0,27 a
	(F _{2,28} = 17,89 , P < 0,0001)	(F _{2,44} = 37,19 , P < 0,0001)	(F _{2,40} = 8,77 , P = 0,0007)	(F _{2,38} = 10,6 , P = 0,0002)	(F _{2,48} = 10,61 , P = 0,0002)	(F _{2,27} = 8,35 , P = 0,0015)		(F _{2,241} = 59,71 , P < 0,0001)

* nessuna femmina ovideponente

Tabella 11. Tasso netto riproduttivo (R_0) di *Planococcus ficus*, espresso come numero medio di uova femminili fertili deposte da ciascuna femmina, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2013).

Tasso netto riproduttivo (media \pm ES)				
	07/06/2013	18/07/2013	23/09/2013	media
MDD	43,53 \pm 10,03 c	90,03 \pm 29,16 a	115,64 \pm 41,89 a	83,07 \pm 14,23 a
MDS	93,89 \pm 8,31 b	94,82 \pm 20,40 a	129,32 \pm 9,58 a	106,01 \pm 14,23 a
T	113,52 \pm 2,88 a	143,46 \pm 8,96 a	143,03 \pm 45,81 a	133,34 \pm 14,23 a
	($F_{2,6} = 21,98$, P = 0,0017)	($F_{2,6} = 1,95$, P = 0,2231)	($F_{2,6} = 0,14$, P = 0,8700)	($F_{2,24} = 3,13$, P = 0,0683)

Tabella 12. Tasso netto riproduttivo (R_0) di *Planococcus ficus*, espresso come numero medio di uova femminili fertili deposte da ciascuna femmina, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2014).

Tasso netto riproduttivo (media \pm ES)					
	12/05/2014	19/06/2014	12/09/2014	13/10/2014	media
MDD	19,09 \pm 16,87 b	88,76 \pm 16,44 b	109,91 \pm 38,11 a	78,03 \pm 54,24 a	73,95 \pm 13,36 b
MDS	72,39 \pm 30,09 b	126,06 \pm 16,83 ab	142,09 \pm 15,50 a	102,69 \pm 21,70 a	110,81 \pm 13,36 b
T	162,67 \pm 6,62 a	173,57 \pm 10,40 a	140,20 \pm 19,47 a	222,38 \pm 34,43 a	174,71 \pm 13,36 a
	($F_{2,6} = 12,81$, P = 0,0068)	($F_{2,6} = 8,19$, P = 0,0193)	($F_{2,6} = 0,47$, P = 0,645)	($F_{2,6} = 3,89$, P = 0,0826)	($F_{2,33} = 14,56$, P = 0,0001)

Tabella 13. Tasso netto riproduttivo (R_0) di *Planococcus ficus*, espresso come numero medio di uova femminili fertili deposte da ciascuna femmina, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2015).

Tasso netto riproduttivo (media \pm ES)							
	29/05/2015	18/06/2015	11/07/2015	31/07/2015	14/08/2015	28/08/2015	media
MDD	47,04 \pm 9,09 a	52,19 \pm 17,96 a	41,51 \pm 23,41 a	39,14 \pm 7,49 b	23,34 \pm 10,24 a	7,10 \pm 7,10 b	35,05 \pm 12,69 b
MDS	97,37 \pm 87,90 a	79,82 \pm 47,65 a	61,58 \pm 11,51 a	45,61 \pm 34,57 b	63,95 \pm 26,32 a	40,65 \pm 20,43 ab	64,83 \pm 12,69 b
T	113,42 \pm 7,78 a	132,04 \pm 16,09 a	112,44 \pm 18,43 a	144,12 \pm 27,66 a	146,26 \pm 41,84 a	100,21 \pm 24,66 a	124,75 \pm 12,69 a
	($F_{2,6} = 0,46$, P = 0,6534)	($F_{2,6} = 1,73$, P = 0,2551)	($F_{2,6} = 3,93$, P = 0,0811)	($F_{2,6} = 5,15$, P = 0,0499)	($F_{2,6} = 4,62$, P = 0,0611)	($F_{2,6} = 6,2$, P = 0,0347)	($F_{2,51} = 12,97$, P = 0,0001)

Tabella 14. Tempo medio di generazione (T) di *Planococcus ficus*, espresso come velocità di rinnovamento delle generazioni, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2013).

Tempo medio di generazione (media \pm ES)				
	07/06/2013	18/07/2013	23/09/2013	media
MDD	71,85 \pm 1,50 a	54,28 \pm 1,77 a	62,86 \pm 3,60 a	63,00 \pm 1,16 a
MDS	65,72 \pm 3,67 b	54,17 \pm 1,44 a	57,52 \pm 0,54 a	59,14 \pm 1,16 a
T	53,22 \pm 1,02 b	50,18 \pm 0,53 a	54,56 \pm 0,95 a	52,65 \pm 1,16 b
	(F _{2,6} = 16,12 , P = 0,0039)	(F _{2,6} = 2,99 , P = 0,1257)	(F _{2,6} = 3,75 , P = 0,0878)	(F _{2,24} = 20,26 , P < 0,0001)

Tabella 15. Tempo medio di generazione (T) di *Planococcus ficus*, espresso come velocità di rinnovamento delle generazioni, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2014).

Tempo medio di generazione (media \pm ES)					
	12/05/2014	19/06/2014	12/09/2014	13/10/2014	media
MDD	72,72 \pm 7,38	56,69 \pm 0,60 a	57,09 \pm 3,18 a	55,12 \pm 2,83 a	60,40 \pm 1,47 a
MDS	66,95 \pm 5,75	55,43 \pm 2,19 a	57,73 \pm 1,72 a	53,62 \pm 1,61 a	58,43 \pm 1,38 a
T	59,30 \pm 2,74	49,91 \pm 0,10 b	51,41 \pm 0,59 a	51,01 \pm 0,39 a	52,91 \pm 1,38 b
	*	(F _{2,6} = 7,53 , P = 0,0231)	(F _{2,6} = 2,7 , P = 0,1455)	(F _{2,6} = 1,21 , P = 0,3619)	(F _{2,32} = 7,59 , P = 0,029)

* analisi statistica non effettuata per la mancanza di femmine ovideponenti in alcune replicazioni

Tabella 16. Tempo medio di generazione (T) di *Planococcus ficus*, espresso come velocità di rinnovamento delle generazioni, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2015).

Tempo medio di generazione (media ± ES)							
	29/05/2015	18/06/2015	11/07/2015	31/07/2015	14/08/2015	28/08/2015	media
MDD	76,56 ± 8,34	63,57 ± 1,71 a	54,95 ± 2,40	58,31 ± 1,54	60,95 ± 4,26 a	59,22	62,26 ± 1,7 a
MDS	73,67 ± 12,68	56,61 ± 3,27 a	54,12 ± 0,97	55,66 ± 1,39	61,40 ± 3,66 a	57,40 ± 2,75	59,81 ± 1,59 a
T	53,99 ± 1,83	50,15 ± 0,26 a	49,62 ± 0,19	51,86 ± 1,45	49,99 ± 0,17 a	50,59 ± 0,98	51,03 ± 1,43 b
	*	(F _{2,6} = 4,5 , P = 0,064)	*	*	(F _{2,6} = 2,11 , P = 0,2018)	*	(F _{2,45} = 8,76 , P = 0,001)

* analisi statistica non effettuata per la mancanza di femmine ovideponenti in alcune replicazioni

Tabella 17. Tempo di duplicazione della popolazione (DT) di *Planococcus ficus*, espresso come tempo necessario (giorni) alla popolazione affinché il numero degli individui iniziali raddoppi, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2013).

Tempo di duplicazione della popolazione (media \pm ES)				
	07/06/2013	18/07/2013	23/09/2013	media
MDD	13,29 \pm 1,46 a	8,55 \pm 1,10 a	9,83 \pm 1,96 a	10,56 \pm 0,55 a
MDS	9,56 \pm 0,72 ab	8,12 \pm 0,51 a	7,95 \pm 0,08 a	8,54 \pm 0,55 b
T	7,63 \pm 0,10 b	6,86 \pm 0,15 a	7,64 \pm 0,54 a	7,37 \pm 0,55 b
	(F _{2,6} = 9,28 , P = 0,0146)	(F _{2,6} = 1,56 , P = 0,2851)	(F _{2,6} = 1,02 , P = 0,4142)	(F _{2,24} = 8,43 , P = 0,0026)

Tabella 18. Tempo di duplicazione della popolazione (DT) di *Planococcus ficus*, espresso come tempo necessario alla popolazione affinché il numero degli individui iniziali raddoppi, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2014).

Tempo di duplicazione della popolazione (media \pm ES)					
	12/05/2014	19/06/2014	12/09/2014	13/10/2014	media
MDD	21,40 \pm 8,39	8,55 \pm 0,39 a	8,49 \pm 0,94 a	10,94 \pm 2,80 a	12,35 \pm 0,94 a
MDS	12,22 \pm 1,78	7,59 \pm 0,26 b	7,75 \pm 0,34 a	8,02 \pm 0,66 a	8,90 \pm 0,89 b
T	7,82 \pm 0,30	6,57 \pm 0,08 c	7,10 \pm 0,20 a	6,43 \pm 0,25 a	6,9 \pm 0,89 b
	*	(F _{2,6} = 13,25 , P = 0,0063)	(F _{2,6} = 1,39 , P = 0,3191)	(F _{2,6} = 1,88 , P = 0,2326)	(F _{2,32} = 8,73 , P = 0,0015)

* analisi statistica non effettuata per la mancanza di femmine ovideponenti in alcune replicazioni

Tabella 19. Tempo di duplicazione della popolazione (DT) di *Planococcus ficus*, espresso come tempo necessario alla popolazione affinché il numero degli individui iniziali raddoppi, in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2015).

Tempo di duplicazione della popolazione (media \pm ES)							
	29/05/2015	18/06/2015	11/07/2015	31/07/2015	14/08/2015	28/08/2015	media
MDD	13,60 \pm 1,66	11,68 \pm 1,93 a	9,24 \pm 1,17	10,99 \pm 0,57	16,54 \pm 5,25 a	12,38	12,41 \pm 0,94 a
MDS	13,62 \pm 6,51	8,12 \pm 0,42 a	8,92 \pm 0,32	9,88 \pm 1,86	10,37 \pm 2,23 a	9,31 \pm 0,40	10,04 \pm 0,89 ab
T	7,71 \pm 0,30	7,00 \pm 0,22 a	7,20 \pm 0,28	7,18 \pm 0,53	7,05 \pm 0,59 a	7,65 \pm 0,47	7,23 \pm 0,79 b
	*	(F _{2,6} = 9,87 , P = 0,0127)	*	*	(F _{2,6} = 3,96 , P = 0,0799)	*	(F _{2,45} = 15,10 , P < 0,0001)

* analisi statistica non effettuata per la mancanza di femmine ovideponenti in alcune replicazioni

Tabella 20. Tasso intrinseco di crescita (r) di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2013).

Tasso intrinseco di crescita (media \pm ES)				
	07/06/2013	18/07/2013	23/09/2013	media
MDD	0,053 \pm 0,005 b	0,084 \pm 0,010 a	0,076 \pm 0,013 a	0,071 \pm 0,004 b
MDS	0,073 \pm 0,006 a	0,086 \pm 0,006 a	0,087 \pm 0,0008 a	0,082 \pm 0,004 ab
T	0,091 \pm 0,001 a	0,101 \pm 0,002 a	0,0912 \pm 0,007 a	0,095 \pm 0,004 a
	(F _{2,6} = 17,38 , P = 0,0032)	(F _{2,6} = 2,04 , P = 0,2113)	(F _{2,6} = 1,01 , P = 0,4195)	(F _{2,24} = 9,47 , P = 0,0015)

Tabella 21. Tasso intrinseco di crescita (r) di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2014).

Tasso intrinseco di crescita (media \pm ES)					
	12/05/2014	19/06/2014	12/09/2014	13/10/2014	media
MDD	0,026 \pm 0,015 b	0,081 \pm 0,004 c	0,084 \pm 0,009 a	0,072 \pm 0,017 a	0,066 \pm 0,004 c
MDS	0,059 \pm 0,008 ab	0,092 \pm 0,003 b	0,090 \pm 0,004 a	0,088 \pm 0,007 a	0,082 \pm 0,004 b
T	0,089 \pm 0,003 a	0,106 \pm 0,001 a	0,098 \pm 0,003 a	0,108 \pm 0,004 a	0,100 \pm 0,004 a
	(F _{2,6} = 9,57 , P = 0,0136)	(F _{2,6} = 18,08 , P = 0,0029)	(F _{2,6} = 1,32 , P = 0,3338)	(F _{2,6} = 2,81 , P = 0,138)	(F _{2,33} = 17,73 , P < 0,0001)

Tabella 22. Tasso intrinseco di crescita (r) di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2015).

Tasso intrinseco di crescita (media \pm ES)							
	29/05/2015	18/06/2015	11/07/2015	31/07/2015	14/08/2015	28/08/2015	media
MDD	0,053 \pm 0,007 a	0,062 \pm 0,009 b	0,051 \pm 0,026 a	0,063 \pm 0,003 a	0,050 \pm 0,013 a	0,019 \pm 0,019 a	0,050 \pm 0,006 b
MDS	0,044 \pm 0,029 a	0,086 \pm 0,004 a	0,078 \pm 0,003 a	0,048 \pm 0,025 a	0,072 \pm 0,013 a	0,050 \pm 0,025 a	0,063 \pm 0,006 b
T	0,090 \pm 0,003 a	0,099 \pm 0,003 a	0,097 \pm 0,004 a	0,098 \pm 0,007 a	0,100 \pm 0,008 a	0,091 \pm 0,005 a	0,096 \pm 0,006 a
	($F_{2,6} = 2,06$, $P = 0,2079$)	($F_{2,6} = 9,56$, $P = 0,0136$)	($F_{2,6} = 2,27$, $P = 0,1845$)	($F_{2,6} = 2,68$, $P = 0,1471$)	($F_{2,6} = 4,58$, $P = 0,0619$)	($F_{2,6} = 4,01$, $P = 0,0788$)	($F_{2,51} = 16,01$, $P < 0,0001$)

Tabella 23. Tasso finito di accrescimento (λ) di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese col numero consigliato di erogatori Chekmate (MDS) o con un numero doppio di erogatori (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2013).

Tasso finito di accrescimento (media \pm ES)				
	07/06/2013	18/07/2013	23/09/2013	media
MDD	1,055 \pm 0,006 b	1,087 \pm 0,011 a	1,079 \pm 0,014 a	1,074 \pm 0,0042 b
MDS	1,076 \pm 0,006 a	1,090 \pm 0,006 a	1,091 \pm 0,001 a	1,086 \pm 0,0042 ab
T	1,095 \pm 0,001 a	1,107 \pm 0,003 a	1,096 \pm 0,008 a	1,099 \pm 0,00412 a
	(F _{2,6} = 17,65 , P = 0,0031)	(F _{2,6} = 2,06 , P = 0,2083)	(F _{2,6} = 1,01 , P = 0,42)	(F _{2,24} = 9,48 , P = 0,0015)

Tabella 24. Tasso finito di accrescimento (λ) di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2014).

Tasso finito di accrescimento (media \pm ES)					
	12/05/2014	19/06/2014	12/09/2014	13/10/2014	media
MDD	1,026 \pm 0,016 b	1,085 \pm 0,004 c	1,087 \pm 0,010 a	1,075 \pm 0,018 a	1,068 \pm 0,004 c
MDS	1,061 \pm 0,009 ab	1,096 \pm 0,004 b	1,094 \pm 0,004 a	1,092 \pm 0,008 a	1,086 \pm 0,004 b
T	1,093 \pm 0,004 a	1,111 \pm 0,001 a	1,103 \pm 0,003 a	1,114 \pm 0,004 a	1,105 \pm 0,004 a
	(F _{2,6} = 9,91 , P = 0,0125)	(F _{2,6} = 18,31 , P = 0,0028)	(F _{2,6} = 1,32 , P = 0,3347)	(F _{2,6} = 2,85 , P = 0,135)	(F _{2,33} = 18,06 , P < 0,0001)

Tabella 25. Tasso finito di accrescimento (λ) di *Planococcus ficus* in parcelle di controllo (T), in parcelle difese con erogatori Isonet alla dose minore di feromone (MDS) o con la dose maggiore (MDD). I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza impiegando come repliche le tre parcelle e in caso di differenze significative le medie sono state separate col test di Tukey (Alghero, 2015).

Tasso finito di accrescimento (media \pm ES)							
	29/05/2015	18/06/2015	11/07/2015	31/07/2015	14/08/2015	28/08/2015	media
MDD	1,054 \pm 0,007 a	1,064 \pm 0,009 b	1,053 \pm 0,027 a	1,065 \pm 0,003 a	1,051 \pm 0,014 a	1,019 \pm 0,019 a	1,051 \pm 0,006 b
MDS	1,046 \pm 0,030 a	1,090 \pm 0,005 a	1,081 \pm 0,003 a	1,050 \pm 0,027 a	1,075 \pm 0,014 a	1,052 \pm 0,026 a	1,066 \pm 0,006 b
T	1,094 \pm 0,004 a	1,104 \pm 0,003 a	1,101 \pm 0,004 a	1,102 \pm 0,008 a	1,105 \pm 0,009 a	1,096 \pm 0,006 a	1,100 \pm 0,006 a
	(F _{2,6} = 2,08 , P = 0,2058)	(F _{2,6} = 9,77 , P = 0,013)	(F _{2,6} = 2,34 , P = 0,1769)	(F _{2,6} = 2,79 , P = 0,1391)	(F _{2,6} = 4,67 , P = 0,0598)	(F _{2,6} = 4,12 , P = 0,0748)	(F _{2,51} = 16,64 , P < 0,0001)

Chapter IV

*Laboratory evaluation of suitability of the vine mealybug,
Planococcus ficus, as host for Leptomastix dactylopii*

Submitted to **Biological Control** as:

Piera Maria Marras, Arturo Cocco, Enrico Muscas, Andrea Lentini

*Laboratory evaluation of suitability of the vine mealybug, Planococcus ficus, as host for
Leptomastix dactylopii*

I collected and analyzed most of the data and contributed to writing the manuscript

Abstract

The suitability of *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) as host for the parasitoid *Leptomastix dactylopii* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae) was investigated under laboratory conditions. The activity of *L. dactylopii* on *P. ficus* was evaluated in no-choice and two-choice tests and compared with its performance on the primary host, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Planococcus ficus* supported the complete development of *L. dactylopii*, which showed survival rates > 86%, and exhibited effective encapsulation rates < 5%. Parasitoids mass cultured on *P. ficus* showed a host preference for the same species than for *P. citri*, indicating that the parasitoid activity can be enhanced by rearing wasps on the same target species. In addition, *L. dactylopii* females previously experienced on vine mealybugs oviposited preferentially on *P. ficus* than those experienced on *P. citri* or naïve. Our findings point out the importance of the rearing host in increasing the parasitism performance of *L. dactylopii*.

Keywords: Oviposition experience; Host preference; Effective encapsulation; Encyrtidae; *Planococcus citri*; Pseudococcidae

Introduction

The vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), is a serious grapevine pest spread in the main grape-growing areas of California, Mexico, Argentina, the Mediterranean Basin, Middle East, and South Africa (Daane et al., 2012). Current control programs against the vine mealybug are based mainly on multiple in-season applications of insecticides (Daane et al., 2012), even though chemical treatments are not completely effective owing to the concealed habit of mealybugs, which live under the bark of trunks and cordons for most of the year (Lentini et al., 2008). Moreover, repeated applications of the same active compounds could lead to pesticide resistance (Nauen and Denholm, 2005; Zhu et al., 2000) or cause secondary pest outbreaks due to the suppression of natural enemies (Penman and Chapman, 1988). Therefore, conventional pest control with broad-spectrum pesticides should be replaced or combined with more sustainable and environmentally safer strategies, which include insecticides selective to mealybug parasitoids (Mansour et al., 2011), mating disruption (Cocco et al., 2014; Walton et al., 2006), and biological control (Daane et al., 2008).

Anagyrus pseudococci Girault (Hymenoptera: Encyrtidae) is the dominant parasitoid of the vine mealybug in most grape-growing regions of the world, and its activity is complemented by other encyrtid species such as *Leptomastix dactylopii* Howard, *Leptomastidea abnormis* (Girault), *Coccidoxenoides perminutus* Girault, and *Coccidoxenoides peregrinus* (Timberlake) (Daane et al., 2012). The parasitoid complex of *P. ficus* can significantly contribute to reducing the pest population density, with parasitism rates up to 90% near harvest time (Daane et al., 2006), yet is not able to effectively control high infestations of the pest. Enhancement of natural biological control of the vine mealybug through releases of mass-reared parasitoids has been proposed, but no successful applications have been reported (Daane et al., 2006, 2008). Among the parasitoids produced in

insectaries, *L. dactylopii* has been widely used in biological control programs against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae), in citrus groves, nurseries, and greenhouses (Doutt, 1952; Krishnamoorthy and Singh, 1987; Mani et al., 2011; Smith et al., 1988), and could be used to control *P. ficus* populations. This wasp is a koinobiont endoparasitoid of more than 20 mealybug species (Anga and Noyes, 1999) and has been introduced in Europe, United States and Australia. The parasitoid, native of a tropical area of South America, is highly susceptible to low winter temperatures and did not establish in most countries of the Mediterranean Basin (Franco et al., 2004). However, annual inoculative releases of *L. dactylopii* have been effectively used in southern Europe to control *P. citri* in citrus groves (Katsoyannos, 1996; Villalba et al., 2006).

The successful biological control of a pest by a parasitoid species depends on the ability of the beneficial insect to i) search in habitats where the host species is likely to occur (habitat selection); ii) locate the host species in its habitat (host finding); iii) examine the individual and recognize it as a host (host acceptance); iv) successfully develop and emerge from the host species (host suitability) (Vinson and Iwantsch, 1980). The suitability of mealybugs as hosts of parasitoid species is strongly influenced by their encapsulation ability, which is a defense mechanism developed by hosts against foreign organisms (Blumberg, 1997). The vine mealybug shows active encapsulation to eggs and larvae of *A. sp. nr. pseudococci* (Bugila et al., 2014; Suma et al., 2011), whereas no specific studies on the encapsulation rates of *L. dactylopii* have been conducted. The parasitoid behavior is determined by genetic factors as well as by learning processes, and a number of studies demonstrate that oviposition and feeding preference of parasitoids can be affected by immature and adult experience (Bjorksten and Hoffmann, 1995; Davis and Stamps, 2004; Turlings et al., 1993).

The present study is the first step to evaluate the use of *L. dactylopii* in inoculation biological control programs against *P. ficus*. For this purpose, the suitability of *P. ficus* as host for *L.*

dactylopii was investigated under laboratory conditions by comparing some fitness parameters (parasitism rate, preimaginal survival, development time, percentage of female offspring, longevity, and body size) of *L. dactylopii* developed on the vine mealybug with those of parasitoids reared on its primary host, *P. citri* (Blumberg and Van Driesche, 2001), and by evaluating the encapsulation ability of the two mealybug species. Furthermore, the host preference of the parasitoid and the influence of prior oviposition experience on host choice were examined.

Material and methods

Insect cultures

Reproductive adult females of the vine and the citrus mealybug were collected in northwestern Sardinia from a vineyard and a lemon grove, respectively. The two species were discriminated by molecular identification using RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction) with species-specific primers (Demontis et al., 2007). Colonies of *P. ficus* and *P. citri* were reared on sprouted potatoes (*Solanum tuberosum* L.) in separate environmental chambers at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-70% RH, and constant darkness.

Parasitoids were provided by Department of Sciences, University of Basilicata (Italy) where a *L. dactylopii* laboratory colony was established 15 years ago on *P. citri* and maintained on sprouted potatoes. In order to evaluate the influence of the rearing host on behavior and fitness of the parasitoid, two rearing lines of *L. dactylopii* were established one year before trials either on *P. ficus* or *P. citri* both feeding on sprouted potatoes. Parasitoid colonies were maintained in transparent rearing cages (30 × 30 × 30 cm) in separate environmental chambers at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-70% RH, and a 16:8 (L:D) photoperiod.

No-choice test for host species suitability

The suitability of *P. ficus* as host for *L. dactylopii* was evaluated in a no-choice test. The employed parasitoid adults emerged from mummified *P. ficus* and *P. citri*, which were collected with a brush (size 00) from the rearing cages 4-5 days before adult emergence and placed individually into transparent plastic vials (length = 5.5 cm, diameter = 1.2 cm). Mummies were checked daily and newly-emerged parasitoids were fed with honey. Each female (< 48 hours old) was coupled with a

male (48-72 hours old) for 24 hours and observed until mating occurred. This procedure ensured that females were mated but had no oviposition experience at the beginning of the experiment.

After mating, each *L. dactylopii* female was placed inside a plastic container (length = 7.0 cm, diameter = 6.0 cm) containing a sprouted potato with 20 third-instar nymphs and young adult females of either *P. ficus* or *P. citri*, which are the most suitable host stages for *L. dactylopii* (De Jong and Van Alphen, 1989). The plastic container was covered with chiffon to allow ventilation and prevent escape of parasitoid and mealybugs. After 24 hours, each *L. dactylopii* was moved in a new plastic container with 20 suitable stages of vine or citrus mealybugs for 24 more hours. A total of 20 female wasps from each rearing line were exposed to each host species separately under laboratory conditions of $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-70% RH, and a 16:8 (L:D) photoperiod. Since body size of emerging parasitoid females depends on the size of parasitized hosts (De Jong and Van Alphen, 1989; Yang and Sadof, 1997), the length of both mealybugs (a sample of 80 specimens per species) was determined under a dissecting microscope with an ocular micrometer before the experiment. The mean body length (\pm SE) of *P. ficus* individuals offered to *L. dactylopii* was 1.08 ± 0.02 mm (range 0.82-1.45 mm) and did not differ significantly from that of citrus mealybugs (1.10 ± 0.02 mm, range 0.80-1.45 mm) (ANOVA, $F_{1,159} = 0.70$; $P = 0.403$).

At the end of the trial, mealybugs were kept in the plastic containers for 10 days, after which mummies were collected, placed individually in plastic vials (length = 5.5 cm, diameter = 1.2 cm) and thereafter checked daily until adult emergence. Each non-mummified mealybug was collected and stored in 70% ethanol, then dissected in order to detect encapsulated parasitoid eggs or larvae. Male and female wasps emerged from mummies were fed with honey and checked daily until death to determine their longevity. After the experiment, the left hind tibiae of female parasitoids were removed and measured under a microscope (Leica M80 stereo microscope integrated with a Leica

DFC290 HD digital camera and software LAS) as an index of their body size (Chong and Oetting, 2007).

For each host-parasitoid combination, the following parameters were recorded: percentage of mealybugs parasitized by each female in 48 hours; survival rate of parasitoid offspring [(number of emerged parasitoids / total number of mummified hosts + mealybugs with encapsulated eggs and/or larvae) \times 100]; effective encapsulation, that is the percentage of hosts with encapsulated eggs and/or larvae [calculated as: (number of mealybugs with encapsulated eggs and/or larvae / total number of parasitized hosts) \times 100] (Blumberg and Van Driesche, 2001); percentage of females in the offspring; preimaginal development time (egg to adult) and longevity of female and male offspring; and body size of female offspring.

Two-choice test for host preference

In order to study the host preference of *L. dactylopii*, both mealybug species were exposed to female wasps in the same test arena. Furthermore, the potential influence of rearing line and prior oviposition experience of parasitoids in the host choice was also evaluated. The experimental design is depicted on Figure 1. Before implementing the test, mummies of *P. ficus* and *P. citri* were selected as in the no-choice experiment. Upon emergence, 60 *L. dactylopii* females (< 48 hours old) collected from each rearing line were individually exposed to a male (48-72 hours old) for 24 hours to ensure mating. Each group of 60 *L. dactylopii* females was randomly divided in three groups of 20 parasitoids and experienced for 24 hours as follows: individual exposure to third-instar nymphs and young adult females of *P. citri* (females experienced on *P. citri*) or *P. ficus* (females experienced on *P. ficus*), or kept without hosts (naïve females). In order to gain oviposition experience, wasps were individually released in an experimental arena containing five suitable stages of either vine or citrus mealybugs for 24 hours. Arenas consisted in a grapevine leaf disc

lying on a water-soaked cotton pad in a Petri dish (diameter = 5.5 cm) with the abaxial surface facing up. The dish was sealed with a lid which had an opening (2 cm in diameter) covered with fine mesh to reduce RH inside the arena. Mealybugs were allowed to settle and feed for up to 12 hours before the release of *L. dactylopii* females. Therefore, before the experiment, parasitoids had oviposition experience with one of the two hosts or were naïve (inexperienced).

After the oviposition experience period, each *L. dactylopii* female was moved in a two-choice test arena containing five suitable stages of each mealybug species. Arenas were set up as described above, except that *P. citri* and *P. ficus* individuals were simultaneously present and marked with blue or pink fluorescent powder, to make easier the visual discrimination of the two species. Since the fluorescent powder could affect the host preference of *L. dactylopii* females, *P. citri* individuals were marked in blue in 50% of arenas and in pink in the other half of Petri dishes and *P. ficus* mealybugs the other way around. The body size of citrus and vine mealybugs was measured before the experiment in a sample of 94 out of 120 arenas, inasmuch host selection in several mealybug parasitoids is affected by host size (De Jong and Van Alphen, 1989; Islam and Copland, 1997; Karamaouna and Copland, 2000). The mean (\pm SE) length of vine mealybugs was 1.30 ± 0.01 mm (range 0.82-1.82 mm), whereas *P. citri* individuals were 1.28 ± 0.01 mm (range 0.82-1.82 mm) in length, with no significant difference between host species (ANOVA, $F_{1,939} = 2.99$; $P = 0.080$).

The foraging behavior of female wasps was observed by a stereomicroscope for 30 minutes after their release in the arenas. The four possible events considered were: encounter (contact with a mealybug), examination (antennation of the host prior to probe), probing (turnaround and oviposition attempt), and oviposition (Chong and Oetting, 2007). During microscope observations, the number of each event was recorded, as well as host feeding events (female feeding on mealybug fluids exuding from oviposition wounds). Host preference occurs when the relative frequency of host species parasitized differs from the relative frequency of host species available (Hopper and

King, 1984). To verify whether *L. dactylopii* females had a preference for the vine mealybug, the foraging behavior was expressed as a proportion of a single event (encounter, examination, probing, or oviposition) occurred on *P. ficus* by the total number of that event on *P. ficus* and *P. citri*, as follows: no. of events on *P. ficus* / (no. of events on *P. ficus* + no. of events on *P. citri*). Therefore, values > 0.5 indicate a preference for *P. ficus*, whereas values < 0.5 express a *P. citri* preference. After 30-minute observations, *L. dactylopii* females were removed, whereas mealybugs were stored in 70% ethanol for 24-72 hours and dissected under a stereoscope to verify the presence of *L. dactylopii* eggs and confirm the number of oviposition events. The trial was carried out under the same laboratory conditions of the no-choice test.

Statistical Analysis

A two-level factorial design was performed in both experiments using females as replicates. The independent factors in the no-choice trial were the host in the mass-rearing line and the host offered to the parasitoid. In the two-choice experiment, the explanatory variables were the host in the rearing line and the experience prior oviposition. In the no-choice test, proportional data (parasitism, survival and encapsulation rates, and proportion of females) were analyzed with a multiple logistic regression model (PROC LOGISTIC, SAS Institute, 2008). Differences in the hind tibial length of parasitoid offspring were evaluated through two-way ANOVA (PROC GLIMMIX, SAS Institute, 2008). The preimaginal development time (egg to adult) and longevity of female and male offspring were compared by survival analysis (PROC LIFEREG, SAS Institute, 2008).

In the two-choice test, the influence of independent factors on the proportion of encounter, examination, probing and oviposition of *L. dactylopii* on *P. ficus* was assessed using a multiple logistic regression analysis (PROC LOGISTIC, SAS Institute, 2008) Multiple comparisons were performed with a Bonferroni correction that set the significance level at $P < 0.017$ (Izzo et al.,

2014). The number of host feeding events was analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test for multiple comparisons (PROC GLIMMIX, SAS Institute, 2008). Interactions among factors were evaluated in both no-choice and two-choice tests. However, as interactions among factors were never significant, statistical values of interactions are not presented in the text.

Results

No-choice test for host suitability

Leptomastix dactylopii females from the citrus mealybug rearing line parasitized a percentage of *P. ficus* and *P. citri* individuals significantly higher than that parasitized by wasps reared on the vine mealybug ($\chi^2_{21} = 4.476$, $P = 0.034$), whereas no significant differences were observed in the rate of parasitized mealybugs with respect to the host offered ($\chi^2_{21} = 1.150$, $P = 0.284$) (Fig. 2a). The survival rates of the parasitoid preimaginal stages were not influenced by host species in the mass culture ($\chi^2_{21} = 0.510$, $P = 0.471$) nor by the mealybug species present in the no-choice arenas ($\chi^2_{21} = 0.875$, $P = 0.349$) (Fig. 2b). The effective encapsulation was very low in all the host-parasitoid combinations, ranging from 3.2 ± 0.6 to 4.3 ± 0.9 %, and was not significantly affected by the investigated factors (rearing line: $\chi^2_{21} = 0.018$, $P = 0.893$; host offered: $\chi^2_{21} = 0.182$, $P = 0.669$) (Fig. 2c). The percentage of female in the offspring was not significantly affected neither by the rearing line ($\chi^2_{21} = 3.127$, $P = 0.090$) nor by the mealybug species exposed to parasitoids ($\chi^2_{21} = 2.416$, $P = 0.120$) (Fig. 2d), indicating the same size range for both host species offered to female parasitoids. In fact, sex allocation of *L. dactylopii* is highly affected by host size, and mostly males emerge from third-instar *P. citri* nymphs, whereas predominantly females develop from young citrus mealybug females (De Jong and Van Alphen, 1989).

The investigated factors did not affect the development time of females (rearing line: $\chi^2_{21} = 1.363$, $P = 0.243$; host offered: $\chi^2_{21} = 1.436$, $P = 0.194$) (Fig. 3a). Similarly, no significant differences were observed in the egg-to-adult development of males with regard to the mass-rearing mealybug species ($\chi^2_{21} = 0.717$, $P = 0.397$) or the host offered ($\chi^2_{21} = 1.623$, $P = 0.127$) (Fig. 3b). Longevity of parasitoid offspring did not significantly vary by rearing line (females: $\chi^2_{21} = 1.125$, $P = 0.167$;

males: $\chi^2_{21} = 0.077$, $P = 0.782$) or host offered to female wasps (females: $\chi^2_{21} = 0.704$, $P = 0.401$; males: $\chi^2_{21} = 0.009$, $P = 0.925$) (Fig. 3c and 3d).

The mean left hind tibial length of female offspring was not significantly affected by the rearing line ($F_{1,611} = 3.49$, $P = 0.062$), when in fact female offspring emerged from citrus mealybugs were significantly bigger than those developed on vine mealybugs ($F_{1,611} = 6.35$, $P = 0.012$) (Fig. 4).

Two-choice test for host preference

Parasitoids mass-reared on *P. ficus* showed a strong host preference for vine mealybugs, examining, probing and ovipositing significantly more frequently on vine mealybugs than on citrus mealybugs (examination: $\chi^2_1 = 4.775$, $P = 0.029$; probing: $\chi^2_1 = 5.124$, $P = 0.024$; oviposition: $\chi^2_1 = 7.17$, $P = 0.007$) inside the choice arenas (Fig. 5b, 5c and 5d). Conversely, the proportion of encounters on the two host species did not differ significantly with respect to the rearing line (encounter: $\chi^2_1 = 2.226$, $P = 0.136$) (Fig. 5a). The oviposition experience of *L. dactylopii* females before the two-choice test did not significantly affect the proportion of *P. ficus* encountered ($\chi^2_2 = 5.208$, $P = 0.058$) (Fig. 5a), whereas parasitoid wasps experienced on *P. ficus* examined, probed and laid eggs preferentially on the same species (examination: $\chi^2_2 = 6.306$, $P = 0.036$; probing: $\chi^2_2 = 8.524$, $P = 0.014$; oviposition: $\chi^2_2 = 11.605$, $P = 0.003$) (Fig. 5b, 5c and 5d).

During the two-choice test, *L. dactylopii* females were observed feeding on or killing the host with the ovipositor prior feeding on its haemolymph. The mean number (\pm SE) of host-feeding events ranged from 0.07 ± 0.02 (females reared on *P. ficus*) to 0.09 ± 0.03 (females reared on *P. citri*) and was not significantly influenced by the rearing line ($F_{1,237} = 0.55$, $P = 0.460$) (data not shown). Similarly, the host species exposed to parasitoids in the prior oviposition experience did not affect the host-feeding behavior of wasps ($F_{2,237} = 0.69$, $P = 0.501$). A total number of 19 host-feeding events were observed with a mean (\pm SE) duration of 5.4 ± 2.8 min (range 0.32-10.36 min).

Discussion

In our study, *P. ficus* showed to be a suitable host for *L. dactylopii*, supporting the complete development of the parasitoid preimaginal stages. However, *L. dactylopii* females developed on *P. ficus* parasitized a lower number of mealybugs and produced smaller female offspring than wasps reared on *P. citri*. Parasitoids developed on vine mealybugs showed a similar preimaginal survival rate (86.9%) than larvae developed on *P. citri* (91.2%). The observed parasitoid survivorship was higher than that found in other studies on *L. dactylopii* reared on citrus mealybugs of the preferred size (range 62.7-87.5%) (De Jong and Van Alphen, 1989) or on *A. sp. nr. pseudococci* reared on *P. ficus* and *P. citri* (67% and 66%, respectively) (Bugila et al., 2015). Differences might be due to the quality of host mealybugs, possibly reduced by the food substrate and thereby influencing the fitness of the parasitoid. This hypothesis is consistent with studies on the citrus mealybug which showed higher body weight and fecundity and lower development time depending on the rearing host plant, thereby modifying longevity, body weight and development time of its parasitoid *A. pseudococci* (Copland et al., 1993). Susceptibility of mealybugs to a parasitoid species is mostly related to their ability in encapsulating parasitoid eggs (Blumberg, 1997). In our trials, vine and citrus mealybugs showed very low values of effective encapsulation (range 3.2-4.3%), indicating that these species are both suitable hosts as they did not develop strong immune defense mechanisms against *L. dactylopii*. In accordance with our findings, other studies point out that the citrus mealybug is unable to encapsulate *L. dactylopii* eggs or larvae (Blumberg and Van Driesche, 2001; Chong and Oetting, 2007), whereas complete encapsulation of *L. dactylopii* eggs has been observed on *Pseudococcus viburni* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) (Blumberg and Van Driesche, 2001). It is noteworthy to mention that *P. citri* and *P. ficus* also exhibit a high ability in encapsulating eggs and larvae of *A. sp. nr. pseudococci*, the most common and effective parasitoid

in the Mediterranean basin, with percentages of effective encapsulation of 60 and 31% in citrus and vine mealybugs, respectively (Suma et al., 2011).

Leptomastix dactylopii developed on *P. ficus* showed preimaginal development time and adult longevity of offspring comparable with those observed on its preferred host *P. citri*, confirming the host suitability of the vine mealybug for *L. dactylopii*. The observed developmental time and adult longevity were of 16.1-17.2 and 8.5-10.8 days, respectively, in accordance with observations by Chong and Oetting (2007) on *L. dactylopii* reared on *P. citri* at 25°C.

The two-choice test highlights the potential efficacy of *L. dactylopii* against *P. ficus*, showing that the host preference of *L. dactylopii* is affected by the mealybug species used in the mass culture, as female parasitoids reared on *P. ficus* examined, probed and oviposited significantly more often on vine mealybugs than wasps reared on *P. citri*. This suggests that the parasitoid activity of *L. dactylopii* against *P. ficus* might be enhanced when wasps are mass cultured on the same target pest species. The rearing line influenced the oviposition behavior of *L. dactylopii*, similarly to other parasitoid species that actively search the natal host species following the odor plume (Thorpe and Jones, 1937). Parasitoid host preference has genetic basis and has been studied in some parasitoids such as *Nasonia vitripennis* (Walker) and *Nasonia giraulti* Darling (Hymenoptera: Pteromalidae) (Desjardins et al., 2010). Nonetheless, also the learning process can impact the host preference, conferring to parasitoids the ability to adapt to the trophic environment (Davis and Stamps, 2004; Jaenike, 1990). Learning of olfactory cues produced by host species and/or host plants has been demonstrated during emergence or in the early adult stage in many parasitoid species (Barron, 2001; Fujiwara et al., 2000; Turlings et al., 1993), whereas the preimaginal learning has been conclusively proved in few cases (Gandolfi et al., 2003). Olfactory stimuli released by larvae in the adult-emerging habitats can be acquired by adults at early stages and condition their behavior (the so-called chemical legacy) (Corbet, 1985).

In the two-choice test, host preference of *L. dactylopii* was influenced by prior oviposition experience of wasps. Female parasitoids, allowed to gain experience on *P. ficus*, probed and oviposited significantly more often on *P. ficus* than those experienced on *P. citri* or naïve. All the tested females encountered mealybugs without significant difference between the two species, indicating that host searching of parasitoids inside the choice arena seems not to be altered by kairomones produced by mealybugs, and host choice for oviposition was made after antennal examination. Similarly to our findings, adult learning through oviposition experience affects host preference of *Trichogramma* nr. *ivelae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Pachycrepoideus vindemiae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae) (Bjorksten and Hoffmann, 1995; Morris and Fellowes, 2002).

Host feeding is a common behavior in synovigenic parasitoids and can significantly reduce the pest population density when hosts killed by feeding are more than those parasitized. However, host-feeding activity of *L. dactylopii* during the two-choice test was limited, even though it was observed on both mealybug species. Similarly, De Jong and Van Alphen (1989) observed few host feeding events on *P. citri*, whereas no such behavior was detected by Chong and Oetting (2007) in *L. dactylopii* on six mealybug species including *P. citri*.

Results of our laboratory tests show that the vine mealybug is a suitable host of *L. dactylopii* and, in certain conditions, *P. ficus* is preferred to the citrus mealybug. However, a generalization to field conditions would need further research. In fact, the effectiveness of *L. dactylopii* to control *P. ficus* populations in open field could be affected by several factors, seeing that the vineyard agro-ecosystem could hamper habitat selection and host finding activity of the parasitoid. For example, architecture and size of host plants could reduce the parasitoid activity, as plant height and leaf number hamper the foraging activity of *L. dactylopii* (Cloyd and Sadof, 2000). Similarly, loose bark

and crevices of grapevines could serve as refuges to mealybugs, thereby reducing the foraging activity of the parasitoid, as observed on *A. pseudococci* (Daane et al., 2006).

Further research in open-field experiments is required to evaluating inoculative releases of *L. dactylopii* as biological control tools to control *P. ficus* in vineyards. In these trials, the mealybug species used in the mass rearing production should be taken into account, as the most common host used in insectaries is *P. citri*, whereas *L. dactylopii* reared on *P. ficus* showed the best parasitoid performance.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Donatella Battaglia (University of Basilicata, Italy) for kindly providing *L. dactylopii* individuals for the parasitoid stock colony, and Michele Coinu, Achille Loi, Alessandra Mura, Tiziana Nuvoli, Dismas Zappino, and Sonia Zidda for technical assistance.

References

- Anga, J.M., Noyes, J.S., 1999. A revision of the African and Malagasy species of the genus *Leptomastix* (Hymenoptera, Encyrtidae), parasitoids of mealybugs (Homoptera, Pseudococcidae). Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Entomol.) 68, 93–128.
- Barron, A.B., 2001. The life and death of Hopkins' host-selection principle. J. Insect Behav. 14, 725–737.
- Bjorksten, T.A., Hoffmann, A.A., 1995. Effects of pre-adult and adult experience on host acceptance in choice and non-choice tests in two strains of *Trichogramma*. Entomol. Exp. Appl. 76, 49–58.
- Blumberg, D., 1997. Parasitoid encapsulation as a defence mechanism in the Coccoidea (Homoptera) and its importance in biological control. Biol. Control 8, 225–236.
- Blumberg, D., Van Driesche, R.G., 2001. Encapsulation rates of three encyrtid parasitoids by three mealybug species (Homoptera: Pseudococcidae) found commonly as pests in commercial greenhouses. Biol. Control 22, 191–199.
- Bugila, A.A.A., Franco, J.C., da Silva, E.B., Branco, M., 2014. Defense response of native and alien mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) against the solitary parasitoid *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae). J. Insect Behav. 27, 439–453.
- Bugila, A.A.A., Franco, J.C., da Silva, E.B., Branco, M., 2015. Suitability of five mealybug species (Hemiptera, Pseudococcidae) as hosts for the solitary parasitoid *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae). Biocontrol Sci. Tech. 25, 108–120.
- Chong, J.H., Oetting, R.D., 2007. Specificity of *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope* and *Leptomastix dactylopii* for six mealybug species. BioControl 52, 289–308.

- Cloyd, R.A., Sadof, C.S., 2000. Effects of plant architecture on the attack rate of *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *Environ. Entomol.* 29, 535–541.
- Cocco, A., Lentini, A., Serra, G., 2014. Mating disruption of the vine mealybug, *Planococcus ficus*, in vineyards using reservoir pheromone dispensers. *J. Insect Sci.* 14(1), 144. doi:10.1093/jisesa/ieu006
- Copland, M.J.W., Perera, H.A.S., Heidari, M., 1993. Influence of host plant on the biocontrol of glasshouse mealybug. *IOBC/wprs Bull.* 16, 44–47.
- Corbet, S.A., 1985. Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. *Ecol. Entomol.* 10, 143–154.
- Daane, K.M., Bentley, W.J., Walton, V.M., Malakar-Kuenen, R.D., Millar, J.G., Ingels, C.A., Weber, E.A., Gispert, C., 2006. New controls investigated for vine mealybug. *California Agric.* 60(1), 31–38.
- Daane, K.M., Cooper, M.L., Triapitsyn, S.V., Walton, V.M., Yokota, G.Y., Haviland, D.R., Bentley, W.J., Godfrey, K.E., Wunderlich, L.R., 2008. Vineyard managers and researchers seek sustainable solutions for mealybugs, a changing pest complex. *California Agric.* 62(4), 167–176.
- Daane, K.M., Almeida, R.P.P., Bell, V.A., Walker, J.T.S., Botton, M., Fallahzadeh, M., Mani, M., Miano, J.L., Sforza, R., Walton, V.M., Zaviezo, T., 2012. Biology and management of mealybugs in vineyards, in: Bostanian, N.J., Charles, V., Isaacs, R. (Eds.), *Arthropod management in vineyards: pests, approaches, and future directions*. Springer, New York, pp 271–307.
- Davis, J.M., Stamps, J.A., 2004. The effect of natal experience on habitat preferences. *Trends Ecol. Evol.* 19, 411–416.

- De Jong, P.W., Van Alphen, J.J.M., 1989. Host size selection and sex allocation in *Leptomastix dactylopii*, a parasitoid of *Planococcus citri*. *Entomol. Exp. Appl.* 50, 161–169.
- Demontis, M.A., Ortu, S., Cocco, A., Lentini, A., Migheli, Q., 2007. Diagnostic markers for *Planococcus ficus* (Signoret) and *Planococcus citri* (Risso) by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. *J. Appl. Entomol.* 131, 59–64.
- Desjardins, C.A., Perfectti, F., Bartos, J.D., Enders, L.S., Werren, J.H., 2010. The genetic basis of interspecies host preference differences in the model parasitoid *Nasonia*. *Heredity* 104, 270–277.
- Doutt, R.L., 1952. Biological control of *Planococcus citri* on commercial greenhouse *Stephanotis*. *J. Econ. Entomol.* 45, 343–344.
- Franco, J.C., Suma, P., da Silva, E.B., Blumberg, D., Mendel, Z., 2004. Management strategies of mealybug pests of citrus in Mediterranean countries. *Phytoparasitica* 32, 507–522.
- Fujiwara, C., Takabayashi, J., Yano, S., 2000. Oviposition experience on a host-infested plant affects flight and antennal searching behaviour of *Cotesia kariyai* toward the host-plant complex. *Entomol. Exp. Appl.* 97, 251–256.
- Gandolfi, M., Mattiacci, L., Dorn, S., 2003. Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proc. R. Soc. London B* 270, 2623–2629.
- Hopper, K.R., King, E.G., 1984. Preference of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) for instars and species of *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 13, 1145–1150.
- Islam, K.S., Copland, M.J.W., 1997. Host preference and progeny sex ratio in a solitary koinobiont mealybug endoparasitoid, *Anagyrus pseudococci* (Girault), in response to its host stage. *Biocontrol Sci. Technol.* 7, 449–456.
- Izzo, V.M., Mercer, N., Armstrong, J., Chen, Y.H., 2014. Variation in host usage among geographic populations of *Leptinotarsa decemlineata*, the Colorado potato beetle. *J. Pest Sci.* 87, 597–608.

- Jaenike, J., 1990. Host specialization in phytophagous insects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 243–273.
- Karamaouna, F., Copland, M.J.W., 2000. Host suitability, quality and host size preference of *Leptomastix epona* and *Pseudaphycus flavidulus*, two endoparasitoids of the mealybug *Pseudococcus viburni*, and host size effect on parasitoid sex ratio and clutch size. *Entomol. Exp. Appl.* 96, 149–158.
- Katsoyannos, P., 1996. Integrated insect pest management for citrus in northern Mediterranean countries. Benaki Phytopathological Institute Kifissia, Greece.
- Krishnamoorthy, A., Singh, S., 1987. Biological control of citrus mealybug, *Planococcus citri* with an introduced parasite, *Leptomastix dactylopii* in India. *BioControl* 32, 143–148.
- Lentini, A., Serra, G., Ortu, S., Delrio, G., 2008. Seasonal abundance and distribution of *Planococcus ficus* on grape vine in Sardinia. *IOBC/wprs Bull.* 36, 267–272.
- Mani, M., Krishnamoorthy, A., Shivaraju, C., 2011. Biological suppression of major mealybug species on horticultural crops in India. *J. Hort. Sci.* 6, 85–100.
- Mansour, R., Suma, P., Mazzeo, G., Grissa Lebdi, K., Russo, A., 2011. Evaluating side effects of newer insecticides on the vine mealybug parasitoid *Anagyrus* sp. near *pseudococci*, with implications for integrated pest management in vineyards. *Phytoparasitica* 39, 369–376.
- Morris, R.J., Fellowes, M.D.E., 2002. Learning and natal host influence host preference, handling time and sex allocation behaviour in a pupal parasitoid. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51, 386–393.
- Nauen, R., Denholm, I., 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58, 200–215.
- Penman, D.R., Chapman, R.B., 1988. Pesticide-induced mite outbreaks: pyrethroids and spider mites. *Exp. Appl. Acarol.* 4, 265–276.
- SAS Institute, 2008. SAS/ETS® 9.2 User's Guide. SAS Institute Inc.

- Smith, D., Papacek, D.F., Murray, D.A.H., 1988. The use of *Leptomastix dactylopii* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae) to control *Planococcus citri* (Risso) Hemiptera: Pseudococcidae) in Queensland citrus orchards. Queensland J. Agric. Anim. Sci. 45, 157–164.
- Suma, P., Mansour, R., Russo, A., La Torre, I., Bugila, A.A.A., Franco, J.C., 2011. Encapsulation rates of the parasitoid *Anagyrus* sp. nr. *pseudococci*, by three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). Phytoparasitica 40, 1–16.
- Thorpe, W.H., Jones, F.G.W., 1937. Olfactory conditioning in a parasitic insect and its relation to the problem of host selection. Proc. R. Soc. London B 124, 56–81.
- Turlings, T.C.J., Wäckers, F.L., Vet, L.E.M., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H., 1993. Learning of host finding cues by hymenopterous parasitoids, in: Papaj, D.R., Lewis, A.C. (Eds.), Insect learning: ecological and evolutionary perspectives. Chapman & Hall, New York, pp 51–78.
- Villalba, M., Vila, N., Marzal, C., Mari, F.G., 2006. Influencia en el control biológico del cotonet *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) de la liberación inoculativa de enemigos naturales y la eliminación de hormigas, en parcelas de cítricos. Bol. Sanid. Veg. Plagas 32, 203–213.
- Vinson, S.B., Iwantsch, G.F., 1980. Host suitability for insect parasitoids. Annu. Rev. Entomol. 25, 397–419.
- Walton, V.M., Daane, K.M., Bentley, W.J., Millar, J.G., Larsen, T.E., Malakar-Kuenen, R., 2006. Pheromone-based mating disruption of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in California vineyards. J. Econ. Entomol. 99, 1280–1290.
- Yang, J., Sadof, C., 1997. Variation in the life history of the citrus mealybug parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae) on three varieties of *Coleus blumei*. Environ. Entomol. 26, 978–982.

Zhu, K.Y., Gao, J.R., Starkey, S.R., 2000. Organophosphate resistance mediated by alterations of acetylcholinesterase in a resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 68, 138–147.

Enrico Muscas

Influence of sustainable control methods on selected life-history parameters of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae)
Tesi di Dottorato in Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo
Università degli Studi di Sassari

Tables and figures

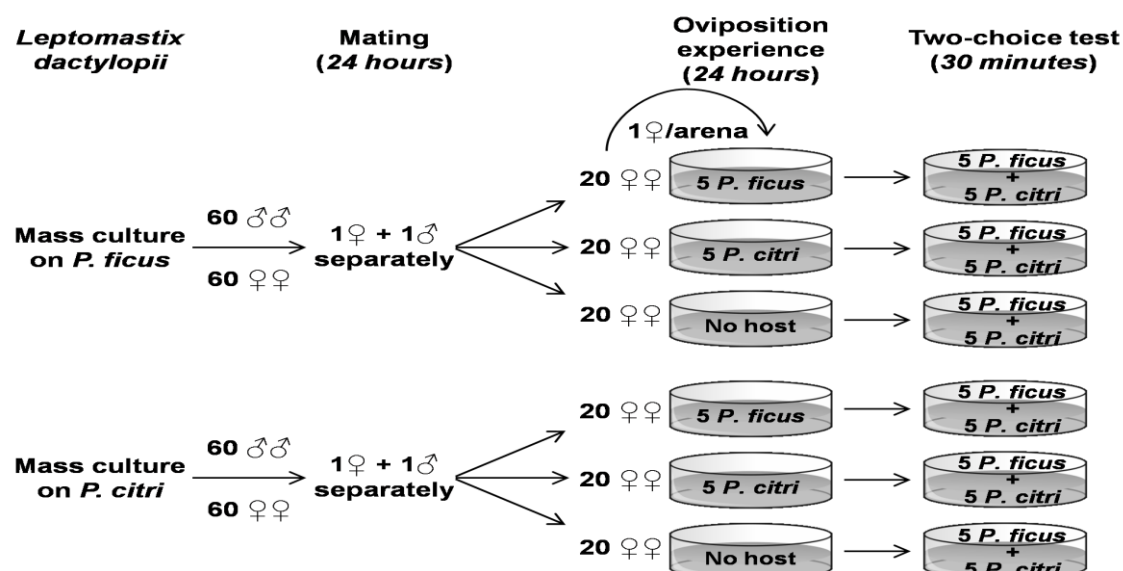


Fig. 1. Schematic diagram of the two-choice test for host preference. The sequence of events is shown: isolation of *Leptomastix dactylopii* males and females from mass cultures; mating for 24 hours; oviposition experience for 24 hours (exposure of single wasps to suitable instars of *Planococcus citri* or *Planococcus ficus*, or to no host); release of female wasps in the two-choice arena containing five suitable hosts of each mealybug species for 30 minutes.

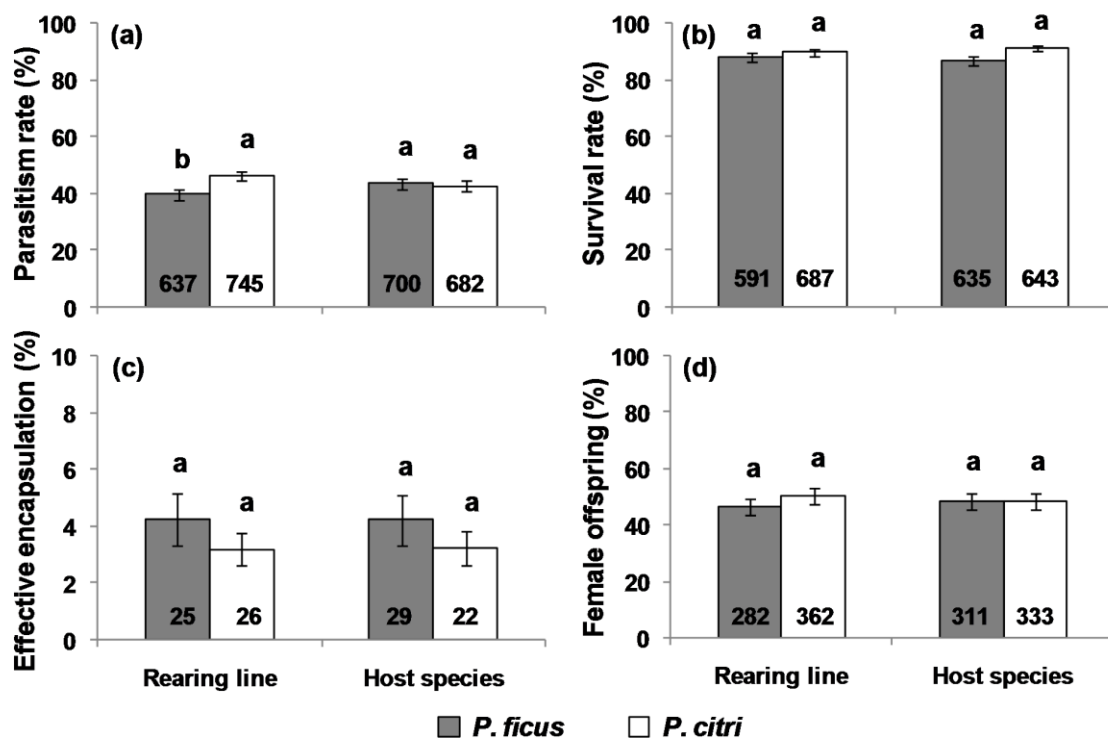


Fig. 2. Mean (\pm SE) percentage of *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* parasitized by *Leptomastix dactylopii* in 48 hours (a); survival rate of parasitoid offspring (b); percentage of mealybugs with encapsulated eggs and/or larvae (effective encapsulation) (c); and percentage of females in the offspring (d) observed during the no-choice test. Numbers inside each bar indicate the total number of specimens. Bars with different letters within each factor are significantly different by logistic regression analysis ($P < 0.05$). Note different scale on y-axis.

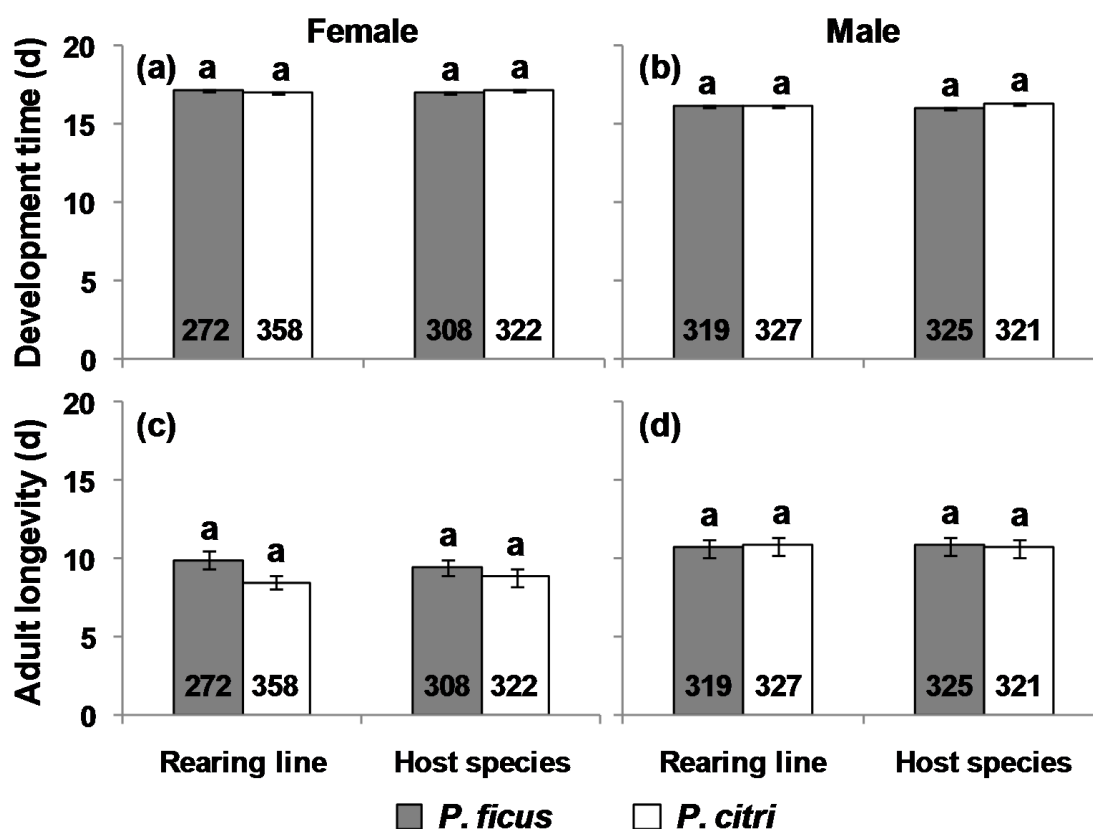


Fig. 3. Mean (\pm SE) developmental time from egg to adult (a and b) and adult longevity (c and d) of *Leptomastix dactylopii* female and male offspring emerged from *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* parasitized in 48 hours during the no-choice test. Numbers inside each bar indicate the number of male or female offspring. Bars with different letters within each factor are significantly different by survival analysis ($P < 0.05$).

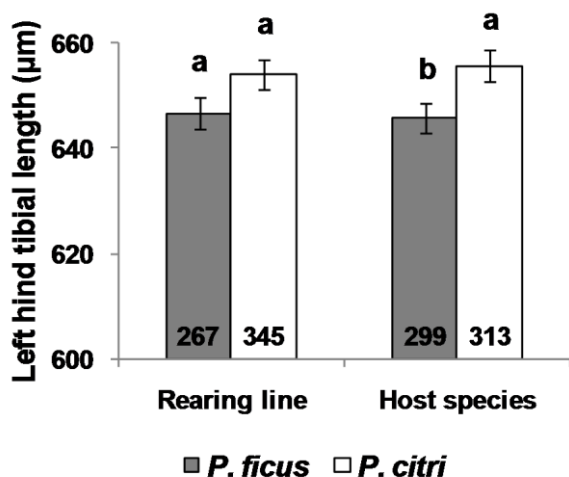


Fig. 4. Mean (\pm SE) left hind tibial length of *Leptomastix dactylopii* female offspring emerged from *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* during the no-choice test. Numbers inside each bar indicate the total number of specimens. Bars with different letters within each factor are significantly different by ANOVA ($P < 0.05$). Note that y-axis starts at 600 μm .

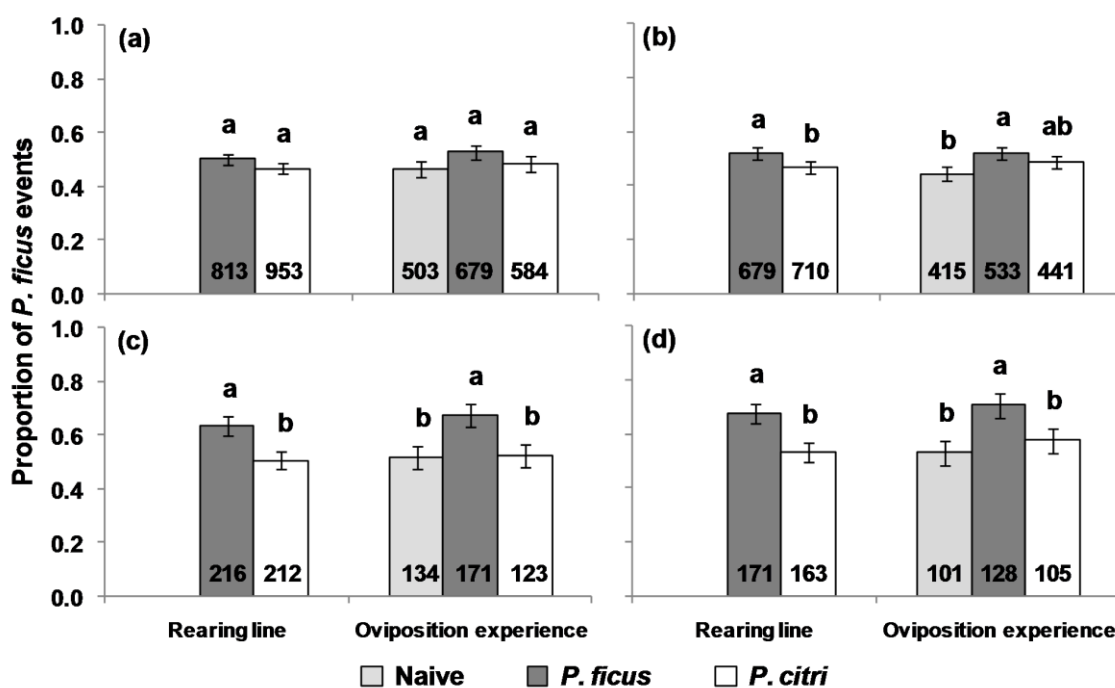


Fig. 5. Mean (\pm SE) proportion of *Planococcus ficus* encountered (a), examined (b), probed (c) and oviposited (d) [no. events *P. ficus* / (no. events *P. ficus* + no. events *P. citri*)] by *Leptomastix dactylopii* in the two-choice test over a 30-minute observation period. Numbers inside each bar indicate the total number of *P. ficus* events. Bars with different letters within each factor are significantly different by logistic regression analysis using a Bonferroni correction for multiple comparisons (adjusted $P < 0.017$).

Acknowledgements

It is a pleasure to thank all those people that have contributed to the work described in this thesis.

First and foremost I want to thank my supervisor, Andrea Lentini who gave me the opportunity to complete the PhD contributing to make my experience productive and stimulating.

I owe my deepest gratitude to Arturo Cocco, who has given interesting feedback and valuable suggestions and contributions. Moreover, he helped me during the analysis of data and drafting of the manuscript.

I thank Luca Mercenaro and Piera Marras for providing their contribution during these years.

I sincerely thank Alessandra Mura and Tiziana Nuvoli, who helped me during the trials and made the field work less tiresome and more pleasant.

A special thank goes to Roberto Mannu: I really appreciate all the help he gave me in this beautiful experience.

I want to express my gratitude to Maurizio Olivieri for the precious assistance in the data collection in the last months.

Finally, I would like to thank all the entomology staff, professors, technicians and fellows, for the support during the course of my graduate work and I am grateful for time spent with roommates and friends.