

Ruolo dei parassitoidi e delle necrosi delle galle nel controllo biologico di *Dryocosmus kuriphilus* in Toscana

Roberto Danti¹, Tullio Turchetti¹, Fabrizio Pennacchio²

¹ CNR-IPSP, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Sesto Fiorentino (FI)

² CREA Centro di Ricerca per la Protezione delle Piante e Certificazione, Firenze

Introduzione

La valutazione delle misure di controllo biologico contro i parassiti di nuova introduzione richiede un campionamento adeguato e una corretta valutazione degli effetti del trattamento. Una migliore comprensione delle dinamiche tra il cinipide *Dryocosmus kuriphilus* e i suoi fattori limitanti è cruciale per lo sviluppo di efficaci strategie di monitoraggio e per la corretta valutazione dei potenziali rischi fitosanitari e per l'ottimizzazione delle misure di controllo biologico.

Questo studio è stato indirizzato a valutare il ruolo dei principali nemici naturali, i parassitoidi e le necrosi delle galle, nel controllo del cinipide. A tal fine, su campioni di galle raccolti in tre castagneti situati in provincia di Firenze (Montesenario e Marradi) nel 2013, sono state svolte indagini sui seguenti aspetti: i) studio delle dinamiche di parassitizzazione nello spazio e nel tempo di *Torymus sinensis* e parassitoidi nativi; ii) valutazione del tasso di sopravvivenza della vespa cinese nelle galle sane e necrotiche; iii) ruolo della comunità fungina associata a galle necrotiche e sane.

Materiali e metodi

Rilievi sui parassitoidi

In ognuno dei tre impianti e dagli alberi campionati sono state raccolte galle da ognuna delle tre seguenti altezze: 0 - 2 m, 2 - 4 m, sopra i 4 m. Nel castagneto A (Montesenario), ove *T. sinensis* non era presente, sono stati campionati 10 alberi e ottenute 450 galle (15 per ogni altezza) settimanalmente raccolte dal 20 giugno al 10 agosto. Nei castagneti B e C (Marradi) ove *T. sinensis* era stato rilasciato, sono stati individuati tre gruppi di 10 piante situati a distanze progressive dal margine degli impianti e separati da una distanza di 100 m l'uno dall'altro. Le galle sono state raccolte a metà giugno e a metà luglio, per un totale di 1350 galle per ogni campionamento.

In seguito, due terzi delle galle (300) di ogni cam-

pione sono state utilizzate per la valutazione delle emergenze e le rimanenti 150 sono state sezionate in laboratorio per determinare: a) il numero delle celle per galla, b) il numero di esemplari per ciascuno stadio di sviluppo dei parassitoidi (uova, larve, pupe e adulti), c) il numero di cinipidi adulti morti o parassitizzati, d) il numero di celle vuote per le emergenze del cinipide, e) il numero di celle vuote per le emergenze dei parassitoidi, f) l'eventuale presenza di iperparassitoidi.

Rilievi sulle galle con necrosi

Sopravvivenza del cinipide in galle necrotiche e sane

In ciascuno dei tre castagneti a metà di giugno e a metà luglio sono state raccolte 10 galle con necrosi da rametti scelti nelle piante in precedenza selezionate. Inoltre dopo il primo campionamento e prima di procedere al secondo, per evitare confusioni con le nuove necrosi in via di sviluppo, si è badato a rimuovere le galle necrotiche ancora presenti. Un campione di 100 galle sane costituiva il controllo. Un'ulteriore campionamento di 5 galle secche per albero è stato effettuato in Novembre. In seguito le galle raccolte sono state sezionate in laboratorio con particolare attenzione nel rilevare la mortalità o la sopravvivenza del cinipide, durante i differenti stadi di sviluppo.

Isolamento ed identificazione dei funghi in galle necrotiche e sane

Ulteriori 10 galle (5 necrotiche e 5 sane) sono state raccolte a metà giugno e a metà luglio dagli stessi alberi campione nei tre castagneti, più 5 galle secche in novembre. Previa sterilizzazione superficiale con ipoclorito di sodio (soluzione al 2%), dai campioni di galle sono stati eseguiti isolamenti fungini in capsule Petri contenenti PDA addizionato con metionina e biotina (100 mg/l e 1mg/l rispettivamente). Le piastre sono state incubate al buio a 26° C. Dopo una settimana le colonie emergenti sono state trapiantate in purezza.

Gli isolati fungini sono stati suddivisi in morfotipi

in base alle loro caratteristiche morfologiche e colturali. L'identificazione di *Fusarium* sp, *Gnomoniopsis castaneae* e *Colletotrichum* sp. è stata confermata da amplificazione (con PCR) e sequenziamento del gene ITS.

I dati ottenuti sono stati statisticamente elaborati con l'analisi della varianza (ANOVA one-way) e con il test χ^2 per verificare le differenze tra i tassi di parassitizzazione ottenuti alle diverse date di campionamento, alle diverse altezze sulla chioma e la posizione delle piante nei castagneti. I tassi di sopravvivenza del cinipide nelle galle necrotiche e sane sono stati comparati con il t-test.

Risultati

Numero di celle per galla

La dissezione delle galle in laboratorio non ha evidenziato differenze significative nel numero di celle per galla fra le tre altezze della chioma considerate, in tutti e tre i castagneti. Mentre il numero medio di celle per galla è risultato significativamente diverso fra i tre Impianti selezionati (A 3,10; B 5,78; C 5,46; $p < 0.01$).

Attività dei parassitoidi nativi e introdotti

Nel castagneto A, il tasso di parassitizzazione dei parassitoidi nativi ha raggiunto il 20% nel mese di giugno nelle parti più alte delle chiome, mentre tra metà luglio e metà agosto è arrivato a superare il 40% nelle parti medie e basse (fig. 1). Prelievi di galle effettuati fino al 2014 hanno confermato l'assenza del *T. sinensis* in questo impianto.

Negli altri due castagneti B e C il tasso di parassitizzazione ha raggiunto valori compresi tra il 25 e il 42% a giugno e ha superato il 60% a metà luglio, nella parte media e bassa delle chiome. Fluttuazioni significative nel tasso di parassitizzazione sono state rilevate nel tempo, tra le date di campionamento e fra le varie altezze della chioma. Una progressiva diminuzione del tasso di parassitizzazione totale e di *T. sinensis* è stata osservata allontanandosi dal margine dell'impianto e procedendo verso il centro (B: $p < 0,05$ e C: $p < 0,01$) (fig. 1). Non sono invece state osservate differenze significative nell'attività dei parassitoidi locali fra i tre gruppi di alberi. Il tasso di parassitizzazione rilevato con la dissezione delle galle ha mostrato un andamento simile a quello rilevato con il tasso di emergenza, sia per parassitoidi nativi che per *T. sinensis*. Casi di iperparassitismo sono stati accertati durante il sezionamento delle galle anche se con incidenza molto bassa, in effetti: nel castagneto A si sono verificati 15 casi su 434 parassitoidi; nel castagneto B 3 casi su 281 parassitoidi; nel castagneto C, 1 caso su 522.

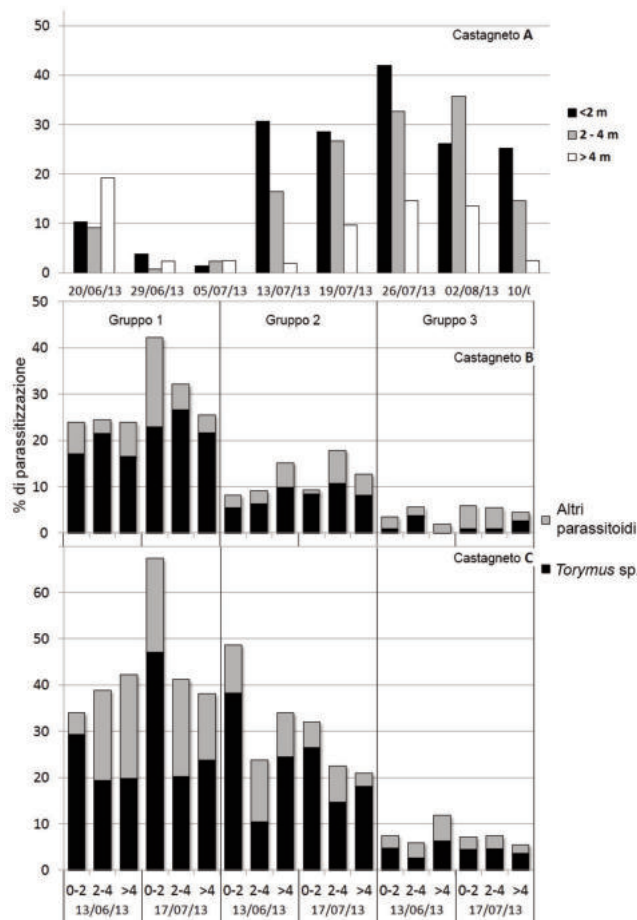


Fig. 1 - Tassi di parassitizzazione nei castagneti A, B e C (espressi come rapporto tra il numero di celle con parassitoidi e il numero totale di celle) a differenti date di campionamento, altezze sulla chioma e a distanze diverse rispetto al margine del castagneto (B e C), ottenuti dalla dissezione delle celle contenute nelle galle raccolte nell'estate del 2013.

Effetto delle necrosi nelle galle sulla sopravvivenza del cinipide

A metà giugno, il tasso di sopravvivenza del cinipide (Sr) nelle galle necrotiche (da 19,2% a 33,8%) è risultato significativamente più basso ($p < 0.01$) rispetto a quello delle galle sane (da 72,2% a 91,1%) (tab. 1) in tutti e tre i castagneti. Mentre a metà luglio la differenza di Sr tra galle sane e necrotiche non è risultata significativa. Sr è risultato significativamente diverso nei tre castagneti anche tra galle necrotiche raccolte a giugno e a luglio ($p < 0.01$). Tra giugno e luglio una lieve diminuzione nella sopravvivenza di *D. kuriphilus* è stata riscontrata in galle sane, anche se non sono risultate differenze significative (tab. 1).

Per quanto concerne la sopravvivenza dei vari stadi del cinipide nelle galle necrotiche e sane i valori più bassi sono risultati per le larve presenti in galle con necrosi precoci (raccolte a metà giugno) (37,5 % delle celle con larve di cinipide ancora viventi; $p <$

Tab. 1 - Percentuali di sopravvivenza di *D. kuriphilus* in galle necrotiche e sane.

Castagneti	Mesi di raccolta			
	Giugno		Luglio	
	Sane	Necrotiche	Sane	Necrotiche
A	91,1a	33,8b	73,7a	68,2a
B	86,1a	20,9b	81,4a	82,1a
C	72,2a	19,2b	65,0a	63,0a

0;001) (tab. 2). Modeste seppur significative differenze sono state rilevate per la sopravvivenza di pre-pupe e di adulti del cinipide in galle sane, galle con necrosi precoci e con necrosi tardive (raccolte a metà luglio) (tab. 2).

Comunità fungina in galle sane e necrotiche

Gli isolamenti, eseguiti su galle necrotiche e sane prelevate durante i campionamenti, hanno permesso di ottenere 576 isolati, identificati in base alle caratteristiche morfologiche. *Gnomoniopsis castaneae* è il fungo ottenuto con maggior frequenza (in media 30,6%), con percentuali d'isolamento significativamente maggiori sulle galle sane e rispetto alle galle necrotiche in tutti e tre i castagneti osservati (tab. 3).

Fusarium sp. poco diffuso nelle galle sane, è stato invece isolato con maggior frequenza da galle necrotiche e da quelle ormai disseccate (tab. 3). Esemplari morti di cinipide sono apparsi avvolti da micelio fungino, identificato in base alle sequenze ITS come *Fusarium avenaceum*. Mentre da galle sane non sono stati isolati *Botrytis* sp., *Botryosphaeria* sp., *Trichoderma* sp. e *Cryphonectria parasitica*, quest'ultimo presente su qualche galla ormai disseccata (tab. 3). *Colletotrichum fioriniae*, specie afferente al complesso *C. acutatum* è stato ottenuto da galle prelevate negli impianti B e C.

Conclusioni

In questo studio, la valutazione del numero medio di celle o larve per galla si è dimostrata molto utile per stimare il tasso di parassitizzazione da parte del cinipide e le percentuali di parassitizzazione delle galle da parte di *T. sinensis* o dei parassitoidi nativi. Questo parametro non era influenzato dall'altezza della chioma, ma era significativamente diverso tra i siti campionati.

La stima dell'effetto del controllo biologico basato sulla parassitizzazione dovrebbe considerare che il

Tab. 2 - Tassi di sopravvivenza (in percentuali) dei vari stadi di sviluppo del *D. kuriphilus* in galle sane (SG), galle con necrosi precoci (metà giugno) (PNG) e galle con necrosi tardive (metà luglio) (TNG).

Stadi di sviluppo	Totale celle osservate			Celle con CGW vivente			Significatività (Chi quadro) d.f. 2
	SG	PNG	TNG	SG	PNG	TNG	
larve	8083	943	989	92.1	37.5	97	$\chi^2 = 2383.9$; $p < 0.001$
prepupe	7121	263	956	99.7	92	100	$\chi^2 = 304.7$; $p < 0.001$
pupe	6338	191	955	99.4	86.9	99.7	$\chi^2 = 346.2$; $p < 0.001$
adulti	4074	5	874	98.6	100	96.8	$\chi^2 = 13.4$; $p < 0.01$

Tab. 3 - Isolati fungini ottenuti da galle sane, necrotiche e secche. SG = galle sane; NG galle necrotiche; DG = galle secche.

Colture sviluppate	Castagneto A			Castagneto B			Castagneto C			Media	St. dev.
	SG	NG	DG	SG	NG	DG	SG	NG	DG		
<i>Alternaria</i> sp	5	6	6	3	5	10	9	4	8	6.33	2.87
<i>Aspergillus</i> sp	0	7	5	4	7	9	2	5	5	5	2.6
<i>Botrytis</i> sp.	0	4	1	0	3	3	0	5	5	2.33	2.12
<i>Botryosphaeria</i> sp.	0	1	2	0	1	3	0	1	1	1	1
<i>Colletotrichum</i> sp	0	0	0	0	0	4	6	2	4	1.78	2.33
<i>Cryphonectria parasitica</i>	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0.89	1.36
<i>Epicoccum</i>	4	4	2	0	3	2	0	1	4	2.33	1.66
<i>Fusarium</i> sp.	1	10	12	4	10	16	0	8	13	8.22	5.49
<i>Gnomoniopsis castaneae</i>	41	13	15	45	14	18	42	32	22	30.67	11.81
<i>Rhizopus</i> sp.	0	2	1	1	2	2	1	3	2	1.56	0.88
<i>Trichoderma</i> sp.	0	2	1	0	4	7	0	7	5	2.89	2.13
Undetermined	10	3	4	3	1	3	6	2	4	4.11	2.76

numero di celle per galla e quindi il tasso di celle parassitizzate può variare per l'influenza delle caratteristiche del sito. Le variazioni delle condizioni climatiche possono influire sull'andamento demografico della popolazione del cinipide e dei parassitoidi, specialmente durante il periodo di volo (Bernardo *et al.*, 2013; Ugolini *et al.*, 2014). Pertanto, è necessario stimare il tasso di parassitizzazione del cinipide con rilievi accurati, regolari e frequenti poiché i valori, possono variare notevolmente tra i diversi periodi di campionamento, anche ravvicinati nel tempo, ma anche tra altezze della chioma e tra le posizioni delle piante all'interno del castagneto (fig. 1).

Il ruolo non trascurabile dei parassitoidi nativi nel controllo del cinipide nel castagneto A è abbastanza evidente. A differenza di altri studi precedenti, l'indagine ha evidenziato un'efficace attività dei parassitoidi nativi nel castagneto di Montesenario e negli altri due impianti di Marradi, in concomitanza con il *T. sinensis* introdotto in questi due siti. Quando si valuta l'attività dei parassitoidi nativi, è consigliabile eseguire campionamenti a metà giugno e alla fine di luglio a diverse altezze della chioma, poiché molte specie hanno un breve ciclo biologico e sono in grado di produrre due generazioni da maggio fino alla fine dello sviluppo del cinipide. Al contrario, per valutare il ruolo svolto da *T. sinensis* come agente di controllo biologico della vespa cinese, un singolo campionamento può essere effettuato in settembre-ottobre considerando il suo ciclo biologico annuale. Comunque è consigliabile programmare monitoraggi periodici nella prospettiva di eventuali fluttuazioni dell'equilibrio tra il parassita e i parassitoidi, considerando la non trascurabile influenza delle condizioni ambientali.

In questo studio le necrosi delle galle possono svolgere un'azione efficace contro *D. kuriphilus* nella sua fase larvale, a causa della necessità delle larve di soddisfare le loro attività trofiche. Inoltre le necrosi possono prevenire l'emergenza degli adulti a causa dell'indurimento dei tessuti o della loro putrefazione umida, come citato da Vannini *et al.* (2014). La frequente presenza di *Fusarium* sp. nelle galle necrotiche si associa a quella di *G. castanea*, che è risultata pre-

dominante anche su quelle sane asintomatiche. Ulteriori indagini dovrebbero chiarire il ruolo svolto nel contenimento del cinipide da questo fungo, risultato anche agente di marciume dei frutti.

La colonizzazione da parte *Fusarium* sp. di adulti di *D. kuriphilus* all'interno delle galle era già stata riportata da Addario e Turchetti (2011), così come la morte del cinipide (larve, pupe e adulti) nelle galle per cause indeterminate (Cooper e Rieske, 2007). Pertanto, poiché non è stato dimostrato un chiaro effetto causale, è possibile che questi funghi ubiquitari possano aver colonizzato il cinipide dopo la sua morte.

I risultati conseguiti sottolineano la complessità delle interazioni tra i vari fattori coinvolti nel controllo biologico di *D. kuriphilus* e la necessità di ulteriori indagini su: adeguate metodologie di campionamento e rilevamento, interazioni tra *T. sinensis* e parassitoidi locali oltre all'interazione tra *G. castanea* e cinipide, in relazione all'ampia variabilità dei fattori ambientali. Alla luce di quanto sopra, l'impiego del *T. sinensis* introdotto e l'attività dei parassitoidi nativi appaiono gli strumenti più promettenti ed efficaci per il controllo biologico del *D. kuriphilus*.

Bibliografia

- ADDARIO E., TURCHETTI T., 2011. *Parasitic fungi on Dryocosmus kuriphilus in Castanea sativa necrotic galls*. Bull. Insectol. 64, 269-273.
- BERNARDO U., IODICE L., SASSO R., TUTORE V.A., CASCONI P., GUERRIERI E., 2013. *Biology and monitoring of Dryocosmus kuriphilus on Castanea sativa in Southern Italy*. Agric. For. Entomol. 15, 65-76.
- COOPER W., RIESKE L., 2007. *Community associates of an exotic gallmaker, Dryocosmus kuriphilus (Hymenoptera: Cynipidae), in eastern North America*. Ann. Entomol. Soc. Am. 100, 236-244.
- UGOLINI F., MASSETTI L., PEDRAZZOLI F., TOGNETTI R., VECCHIONE A., ZULINI L., MARESI G., 2014. *Ecophysiological responses and vulnerability to other pathologies in European chestnut coppices, heavily infested by the Asian chestnut gall wasp*. Forest Ecol. Manag. 314, 38-49.
- VANNINI A., VETTRAINO A., MARTIGNONI D., MORALES-RODRIGUEZ C., CONTARINI M., CACCIA R., PAPARATTI B., SPERANZA S., 2017. *Does Gnomoniopsis castanea contribute to the natural biological control of chestnut gall wasp?* Fungal Biol. 121, 44-52.