



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI  
RISORSE NATURALI E AMBIENTE – DAFNAE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE LM-69- SCIENZE E  
TECNOLOGIE AGRARIE

**IPERPARASSITIZZAZIONE DI  
*NEODRYINUS TYPHLOCYBAE*  
(HYMENOPTERA, DRYINIDAE) AD  
OLTRE TRENT'ANNI DALLA SUA  
PRIMA INTRODUZIONE IN EUROPA.**

**Relatore**  
Prof. Luca Mazzon

**Correlatore**  
Dott.ssa Isabel Martinez-Sañudo

**Laureando**  
Marco Falasco  
2057152

Anno accademico 2022/2023





## INDICE

Riassunto.....	7
Abstract.....	9
1. Introduzione.....	11
1.1. <i>Metcalfa pruinosa</i> .....	11
1.1.1. Morfologia .....	11
1.1.2. Ciclo biologico .....	13
1.1.3. Danni .....	13
1.1.4. Controllo .....	14
1.2. <i>Neodryinus typhlocybae</i> (Ashmead) .....	15
1.2.1. Morfologia .....	15
1.2.2. Ciclo vitale .....	16
1.2.3. Introduzione di <i>N. typhlocybae</i> .....	18
1.2.4. Nemici Naturali .....	19
1.2.4.1. Ichneumonidae .....	21
1.2.4.2. Pteromalidae .....	21
1.2.4.3. Eulophidae .....	22
1.2.4.4. Encyrtidae .....	23
1.3. Identificazione .....	24
1.3.1. DNA barcoding .....	25
2. Scopo della tesi .....	27
3. Materiali e metodi .....	29
3.1. Esecuzione del campionamento .....	29
3.2. Materiale di partenza .....	31
3.3. Monitoraggi .....	33

3.4. Identificazione .....	33
3.4.1. Fotografie .....	34
3.4.2. Analisi molecolari .....	34
4. Risultati e discussione.....	37
4.1. Dati di campo.....	37
4.1.1. Dati generali.....	37
4.1.2. Iperparassitizzazione totale .....	38
4.1.3 Sfarfallamento di <i>N. typhlocybae</i> totale.....	42
4.1.4 Predazione .....	44
4.1.5. Specie di iperparassitoidi sfarfallato.....	45
4.1.5.1 <i>Pachyneuron muscarum</i> L. (Fam. Pteromalidae).....	47
4.1.5.2. <i>Cheiloneurus</i> sp. (Fam. Encyrtidae).....	48
4.1.5.3. Ichneumonidae .....	51
4.1.2.3 Altro .....	51
4.2. Analisi genetiche.....	52
4.2.1 Fam. Ichneumonidae.....	55
4.2.2. Fam. Pteromalidae .....	59
4.2.3 Fam. Eulophidae .....	60
4.2.4 Fam. Heloridae .....	60
4.2.5. Fam. Encyrtidae .....	61
5. Conclusioni.....	66
6. Bibliografia.....	69
7. Appendice .....	74



## Riassunto

Recentemente, in diverse regioni italiane, si è assistito ad una recrudescenza delle infestazioni di da parte dell'omottero neartico *Metcalfa pruinosa*. Si ipotizza che alla base ci sia una diminuzione del controllo esercitato dal suo parassitoide specifico *Neodryinus typhlocybae* importato dagli USA negli anni '80 in seguito a programmi di lotta biologica al flatide. Le cause possono essere ricercate dall'aumentata pressione esercitata dagli iperparassitoidi autoctoni sull'antagonista neartico.

Con il presente lavoro, a partire dal luglio 2022, sono stati analizzati oltre 3400 bozzoli di *N. typhlocybae* raccolti in natura in otto diversi siti nella provincia di Padova e Venezia.

Sono stati valutati la dinamica di sfarfallamento e l'influenza dei principali nemici naturali del driinide; inoltre è stato possibile identificare, anche attraverso analisi genetiche, i principali iperparassitoidi. La specie maggiormente rappresentata è stata *Pachyneuron muscarum* (L.) (Fam. Pteromalidae).

Il lavoro svolto ha evidenziato l'elevata incidenza dell'iperparassitizzazione. Mediamente il 36% dei bozzoli sono risultati iperparassitizzati, il 15% dei bozzoli è attribuibile a *N. typhlocybae*, mentre il restante 49% sono risultati rispettivamente predati (21%), morti o non sfarfallati (28%).



## Abstract

In recent years, in various regions of Italy, there has been an increase in attacks by *Metcalfa pruinosa*. This increase may be associated with a decrease in control exerted by its specific parasitoid, *Neodryinus typhlocybae*. It is hypothesized that the causes can be attributed to the presence exerted by indigenous hyperparasitoids on the Nearctic antagonist.

The collection began in July 2022, analyzing over 3400 cocoons of *N. typhlocybae* in eight different sites in the provinces of Padua and Venice.

The emergence dynamics and the influence of the main natural enemies of *Neodryinus* were evaluated. Additionally, it was possible to identify the main hyperparasitoids, including through genetic tests, with *Pachyneuron muscarum* (L.) being the most represented.

The study carried out has highlighted, as initially hypothesized, the significant influence of indigenous hyperparasitoids in reducing the populations of *N. typhlocybae*.

On average, 36% of the cocoons were found to be hyperparasitized, 15% of the cocoons can be attributed to *N. typhlocybae*, while the remaining 49% were respectively preyed upon (21%), dead, or failed to hatch (28%).



# 1. Introduzione

## 1.1 *Metcalfa pruinosa*

*M. pruinosa* è un omottero della famiglia dei flatidi originario del Nord America, la cui prima descrizione si deve a Say nel 1830. Attualmente *M. pruinosa* è diffusa in diversi stati del Nord e del Centro America, in Asia è presente solo in Corea, mentre in Europa si è ormai diffusa in diversi stati meridionali e centrali, la Polonia nel 2022 risulta l'ultimo stato ad aver segnalato la sua presenza (EPPO 2023).

La sua introduzione accidentale in Europa, probabilmente attraverso l'importazione di legname infestato da uova, è avvenuta alla fine del secolo scorso. La prima segnalazione risale al 1979 a Treviso, in Italia (Zangheri & Donadini, 1980).

Essendo una specie altamente polifaga e non essendoci nemici naturali autoctoni efficienti, il suo areale europeo risulta in espansione (Mazzon & Martini, 2001). L'optimum di temperatura per il suo ciclo biologico è compreso tra i 22°C e i 28°C. La globalizzazione e cambiamenti climatici, con il conseguente innalzamento delle temperature, stanno aumentando l'areale di distribuzione. (Byeon et al, 2018)

Alcuni modelli previsionali evidenziano la possibilità nell'Europa meridionale di oltrepassare il valore soglia superiore di temperatura pari a 31°C, che porterebbe alla non sopravvivenza di *M. pruinosa* in estate, nonostante ciò la sua invasione continuerebbe nell'Europa settentrionale (Byeon et al, 2018).

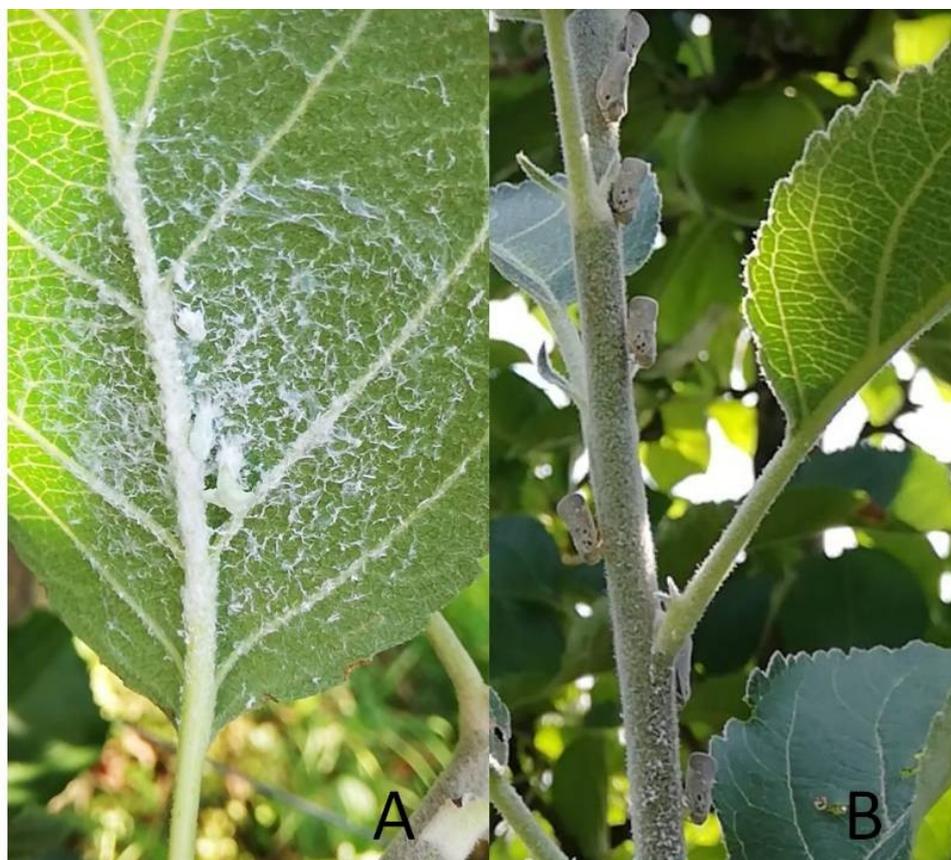
### 1.1.1. Morfologia

Le sue uova dall'aspetto allungato, di color bianco-giallastro traslucido, leggermente appuntite in entrambi i poli e di sezione ellittica, sono lunghe circa 1 millimetro.

Gli stadi giovanili sono rappresentati da neanidi e da ninfe, di lunghezza che varia da 1 a 6 millimetri ricoperti da secrezioni cerose e da esuvie che conferiscono loro una colorazione biancastra. Sia gli stadi giovanili che gli adulti presentano un apparato boccale pungente-succhiante in grado di suggerire la linfa dalla pianta ospite e presentano abitudini tipicamente gregarie, se infastidite possono effettuare dei balzi grazie alla presenza di zampe saltatorie.

Sulla vegetazione si possono rinvenire le esuvie dell'ultima muta, che avviene tra il quinto stadio giovanile e l'adulto; queste restano saldamente ancorate alla foglia poiché tale processo inizia con il fissaggio della quinta età con gli stiletto boccali nel tessuto parenchimatico fogliare (Lucchi & Santini, 1993).

Gli adulti, di media, sono lunghi 6-8 millimetri e non presentano dimorfismo sessuale. Si presentano biancastri appena sfarfallati, colorazione che mantengono per circa 24-48 ore, dopo di che la livrea vira in maniera definitiva al grigio-brunastro con riflessi azzurro-bruni, le ali disposte in posizione verticale a riposo ricoprono completamente il torace e l'addome (Lucchi & Santini, 1993) (*Figura 1*).



**Figura 1.** Infestazione di *M. pruinosa* su melo: A) stadi giovanili B) adulti.

### 1.1.2. Ciclo biologico

*M.pruinosa* è una specie monovoltina che sverna nella corteccia di differenti specie arboree e arbustive come uovo. La schiusa delle uova è scalare, in particolare nelle regioni settentrionali della penisola italiana, inizia in primavera verso i primi di maggio e continua per tutto il mese di giugno, periodo nel quale compaiono i primi individui adulti (Girolami & Mazzon, 2001).

Le neanidi appena nate si muovono rapidamente sulla pagina inferiore delle foglie dove iniziano subito a nutrirsi, gli stadi pre-immaginali sono cinque; tre da neanide, in cui sono generalmente poco mobili, e due da ninfa che, al contrario, tendono a spostarsi sui germogli (Cenderello K. 2006).

Tra la fine di giugno e i primi di luglio, a seconda delle latitudini e dell'andamento climatico, compaiono i primi adulti che sono presenti sino all'arrivo dei primi freddi (Mazzon & Martini, 2001).

La maturità sessuale viene raggiunta dopo circa un mese dallo sfarfallamento e gli accoppiamenti avvengono di notte; in seguito, le femmine depongono mediamente sino a 60 uova all'anno e occasionalmente possono raggiungere picchi di circa un centinaio (Santini e Lucchi, 1994; Rossi, 1995).

Dalla schiusa delle uova servono circa 40 -50 giorni per raggiungere lo stadio adulto. Uno dei fattori in grado di influenzare tale durata sembra sia la specie vegetale sulla quale si nutrono gli stadi giovanili; tale ciclo risulta molto fugace su specie appartenenti al genere *Tilia*, *Acer*, *Cornus*, *Malus*, *Robinia*, *Platanus*, *Ulmus*, *Ligustrum*, *Morus*, *Ficus*, *Urtica*, *Helianthus*, *Syringa*, mentre appare molto allungato su *Robus*, *Celtis*, *Corylus* (Girolami e Conte, 1999).

### 1.1.3. Danni

Essendo una specie altamente polifaga può utilizzare come pianta ospite oltre 330 specie differenti, la si può ritrovare in aree urbane, in parchi e giardini e in ambienti agrari su coltivazioni, incolti e siepi (Duso & Pavan, 1987; Girolami & Mazzon, 1999; Bagnoli & Lucchi, 2000).

Molte sono le specie di interesse economico colpite da *M. pruinosa* quali ad esempio: olivo, vite, actinidia, agrumi, noce, pomacee, susino, albicocco, kaki, rosa, girasole; se disturbati, o a seguito di temporali, i giovani possono cadere a terra e risalire lungo i fusti, motivo per il quale spesso le infestazioni sono presenti maggiormente sulla vegetazione più bassa. Gli adulti sono presenti su moltissime angiosperme, le gimnosperme al contrario, con l'esclusione del tasso, non risultano di interesse per l'insetto (Girolami & Conte, 1999).

E' stato riscontrato che i vigneti situati vicino a boschi e siepi risultano maggiormente colonizzati rispetto a vigneti in monocoltura (Duso et al, 2010).

I danni da *M. pruinosa* sono principalmente legati: alla sottrazione di linfa, che nel caso di forti infestazioni può provocare un intristimento della vegetazione, ma soprattutto alla forte emissione di melata, sulla quale possono svilupparsi fumaggini che sono in grado di ridurre la fotosintesi e, nei casi più gravi, possono portare ad una filloptosi anticipata. Oltre a ciò, non meno importanti, risultano i danni estetici sulla vegetazione ornamentale e sui prodotti ortofrutticoli nonché lo sgradevole imbrattamento di arredi e veicoli in ambito urbano (Girolami & Mazzon, 1999).

Inoltre, è stata dimostrata la capacità del flatide di trasmettere *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* agente patogeno responsabile del cancro batterico della pianta del kiwi (Donati et al, 2017).

#### **1.1.4. Controllo**

I danni provocati dal fitofago nei nostri territori, hanno reso da subito necessario lo sviluppo di strategie efficaci di controllo. Tuttavia, l'alta mobilità degli stadi adulti, l'elevata polifagia, la presenza degli stadi giovanili principalmente sulle pagine inferiori delle foglie (spesso vicino al terreno) nonché la loro capacità di produrre cere, hanno reso la lotta chimica di questo flatide molto difficile (Girolami & Conte, 1999; Girolami & Mazzon, 1999).

In ambito urbano l'utilizzo di prodotti fitosanitari non risulta di facile applicazione per questioni di sicurezza per l'uomo, oltre alle ripercussioni che tali sostanze possono provocare su altri artropodi non target e su insetti pronubi; quest'ultimi infatti possono

nutrirsi della melata prodotta da *M. pruinosa* risultando un alimento spesso ricercato in ambienti più o meno antropizzati (Morocutti E, 2019).

Nel nostro areale vi sono numerose specie autoctone che si nutrono del fitomizo americano; tra gli insetti troviamo le famiglie: Antocoridae, Miridae, Nabidae, Pentatomidae, Chrysopidae, Vespidae, Coccinellidae e Formicidae, ma vi sono anche numerosi uccelli, lucertole e pipistrelli. Nonostante questa grande variabilità, tutti questi predatori non sono in grado di mantenere sotto controllo le popolazioni del flatide (Girolami & Mazzon, 2001).

In America *M. Pruinosa* non risulta una specie altamente nociva in quanto essa è mantenuta sotto controllo grazie all'intervento di diversi entomofagi, in particolare da alcuni imenotteri driinidi quali *Thaumatomyia danieli* e il più famoso *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead) (Girolami & Mazzon, 1999; Olmi, 1996).

## **1.2. *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead)**

*N. typhlocybae* (Ashmead) è un Imenottero appartenente alla divisione Aculeata superfamiglia Chrysidoidea. All'interno di tale superfamiglia vi è la famiglia Dryinidae che contiene circa 1401 specie e 34 generi tra cui *N. typhlocybae*. (Olmi, 1999).

In tutte le femmine dei driinidi le zampe anteriori sono raptatorie provviste di chele, utilizzate durante la loro attività sia predatoria sia parassitoidale, tale caratteristica comune in questa famiglia di imenotteri è stata per la prima volta descritta nel Settecento da Linneo (Linnaeus, 1767).

*N. typhlocybae* è di origine Americana, presente dal Canada al Messico passando per gli Stati Uniti Orientali (Olmi, 1999).

### **1.2.1. Morfologia**

Gli adulti di *N. typhlocybae* sono entrambi neri ma sono caratterizzati da un elevato dimorfismo sessuale.

Le femmine misurano circa 5-6 mm, il doppio del maschio con una morfologia completamente differente; impiegano le loro chele per nutrirsi di neanidi di I e II età del flatide ma esse vengono anche utilizzate per bloccare gli stadi giovani di III, IV e V età

per svolgere l'attività di parassitizzazione deponendo un' uovo all'inserzione degli abbozzi alari (Mazzon & Girolami, 2002).

La femmina è nera con antenne clavate composte da dieci articoli e possono essere anche gialle, nel capo vi sono tre ocelli che creano una forma triangolare al contrario del maschio in cui sono disposti linearmente (Olmi, 1999).

Il maschio misura 2-3 mm, anch'esso nero, con mandibole gialle e antenne filiformi con dieci articoli, caratteristica comune alla maggior parte dei maschi di driinide (Olmi, 1999).

Le mandibole sono utilizzate da entrambi i sessi per incidere i bozzoli al momento dello sfarfallamento.

La differenza tra i due sessi non è solo morfologica ma anche la loro dieta è differente; infatti, il maschio è solo glicifago nutrendosi di melata e sostanze zuccherine mentre la femmina è sia glicifaga che zoofaga (Girolami & Mazzon, 1999).

### **1.2.2. Ciclo vitale**

L'accoppiamento avviene generalmente nelle zone più esterne della vegetazione sulla pagina superiore delle foglie, esso avviene subito dopo lo sfarfallamento, quando la femmina viene raggiunta da un piccolo gruppo di maschi (Mazzon & Girolami, 2002).

La femmina è in grado di deporre uova sin dalle prime ore dello sfarfallamento anche in assenza di accoppiamento in quanto è in grado di produrre maschi, con solo 20 cromosomi, attraverso partenogenesi arrettonica (Girolami & Camporese, 1994).

Il dimorfismo tra i sessi di *N. typhlocybae* non si limita solo alla morfologia e alla dieta ma anche alla longevità che risulta nettamente differente; il maschio dopo pochi giorni dallo sfarfallamento va incontro a morte mentre la femmina può raggiungere anche le tre settimane di vita e durante questo lasso di tempo è in grado di predare sino a cinquanta flatidi e altrettanti risultano parassitizzati (Girolami & Mazzon, 2001).

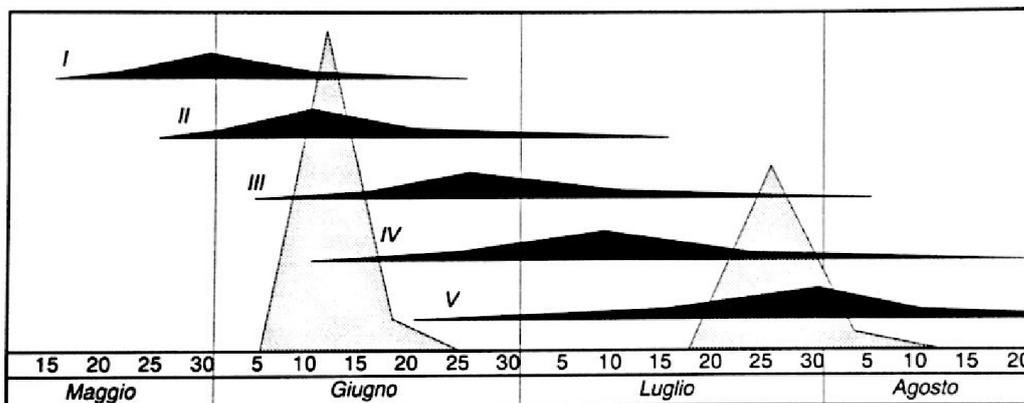
A seconda dello stadio giovanile parassitizzato emergono esemplari esclusivamente maschili in ospiti di III stadio mentre la prole femminile sfarfalla solo dagli stadi di IV e V età (Favaro, et al ., 2018).

Dall'uovo fuoriesce una larva che inizia a nutrirsi dell'emolinfa della vittima; che inizialmente non influisce sulla vitalità del fitofago ma una volta raggiunta la maturità

essa lo porterà a morte. Gli stadi giovanili di *M. pruinosa* parassitizzati presentano una cisti gialla a lato al di sotto degli abbozzi alari, costituita da esuvie larvali del parassita (Olmi, 1999).

*N. typhlocybae* può essere monovoltino o bivoltino e sverna come larva matura all'interno di bozzoli sericei, presenti principalmente nelle pagine inferiori delle foglie. Gli sfarfallamenti avvengono a giugno più o meno in concomitanza con la presenza degli stadi di IV età del fitofago. Le larve della prima generazione possono andare incontro a due destini differenti: o entrare in diapausa oppure impuparsi per poi sfarfallare in piena estate dando origine alla seconda generazione (Figura 2)(Mazzon & Martini, 2001; Girolami & Mazzon, 2001).

Le larve mature impupate che stanno per evolversi in adulto sono morfologicamente differenti da quelle svernate risultando più allungate, occupando interamente il bozzolo, inoltre presentano due macchie scure sul dorso delle stesse (Girolami & Mazzon, 2001). L'entità del bivoltinismo risulta molto variabile e risulta pari in media a circa il 30-40% con punte che possono raggiungere anche il 85-90%, inoltre si è riscontrato un tasso di bivoltinismo maggiore nei maschi rispetto alle femmine (Malausa, 2000; Girolami & Mazzon, 2001).



**Figura 2.** Epoche di sfarfallamento di *N. typhlocybae* in base alla presenza degli stadi giovanili di *M. pruinosa* (Girolami & Mazzon, 2001).

### 1.2.3. Introduzione di *N. typhlocybae*

L'introduzione di *N. typhlocybae* per contrastare le pullulazioni dell'insetto alieno *M. pruinosa* in Europa, attraverso diversi rilasci massali, ha portato ottimi risultati, ma furono necessari diversi studi e sperimentazioni per raggiungere tale obiettivo e ad oggi è considerato uno degli esempi di lotta biologica di maggior successo (Zapponi et al, 2021).

La prima introduzione di *N. typhlocybae* in Italia avvenne nel 1987 grazie al professor Girolami ma, a causa della scarsa conoscenza dell'insetto, si verificarono sfarfallamenti anticipati; fu quindi necessario tornare negli Stati Uniti nel Giugno 1989 per prelevare altri individui e l'anno seguente avvennero i primi rilasci in Italia, i cui esemplari partirono tutti dalla Facoltà di Agraria di Padova. Negli anni successivi il driinide si diffuse spontaneamente nel resto della provincia di Padova; nel 1990 e nel 1991 vennero effettuate altre raccolte e successivi rilasci avvennero nel 1991 e 1992 nello stesso sito. Attualmente le popolazioni presenti in Italia e in Europa derivano dagli esemplari prelevati in Connecticut, Ohio e Massachusetts tra il 1989 e il 1991 (Girolami & Mazzon, 1999; Girolami & Camporese, 1994).

Il successo dell'introduzione di *N. typhlocybae* è legato alla presenza di stadi giovanili del flatide, risultando uno dei fattori principali. Bisogna comunque considerare altri fattori come il luogo del rilascio, selezionando siti il più distanti possibile da trattamenti chimici preferendo quindi boschi o siepi. L'utilizzo di prodotti fitosanitari e stress idrici, a cui le colture possono incorrere, risultano fattori limitanti (Villani & Zandigiaco, 1999; Frilli et al, 2001).

L'istituto di Entomologia dell'università di Padova, quello di Udine e la collaborazione di Bioplanet di Cesena furono di essenziale importanza per la diffusione dell'imenottero in molte regioni italiane e anche in alcuni stati europei (Girolami & Mazzon, 1999).

L'espansione del driinide dai siti di rilascio nel primo anno non superò i 20-30 metri, già nel secondo anno si evidenziarono distanze superiori ai 2 km e al settimo anno si raggiunsero i 4 km (Frilli et al, 2001).

Il parassitoide rimane localizzato sino a quando vi sono popolazioni elevate del flatide ma una volta che tali popolazioni diminuiscono esso si sposta attivamente alla ricerca di nuove colonie (Girolami & Mazzon, 1999).

Per diversi anni a Padova le popolazioni di *M. pruinosa* risultarono contenute e poco frequenti proprio come accade nel suo areale d'origine. Affermare che *N. typhlocybae* sia il fattore principale di controllo risulta difficile, in quanto la percentuale di predazione da parte di specie autoctone risulta di difficile valutazione, nonostante ciò è certo che il parassitoide svolga un ruolo determinante. (Girolami, 1999).

#### 1.2.4. Nemici naturali

Il periodo più critico per la sopravvivenza di *N. typhlocybae* risulta il periodo invernale-primaverile poiché cadendo le foglie a terra risultano soggette al calpestio, soprattutto in ambito urbano, inoltre spesso gli addetti alla manutenzione del verde asportano e distruggono tali residui vegetali riducendo di conseguenza la numerosità dei bozzoli svernanti. In questa fase il driinide risulta molto suscettibile anche per l'azione congiunta esercitata da predatori genici e iperparassitoidi (Mazzon & Martini, 2001).

Tra i principali predatori troviamo micro mammiferi, uccelli insettivori e insetti; di quest'ultimi le famiglie di maggiore importanza sono sfecidi e crabronidi, che si nutrono di *M. pruinosa* ma anche dei bozzoli parassitizzati, inoltre non bisogna dimenticare il rapporto mutualistico che si può instaurare tra il flattide e le formiche che, interessate dall'elevata produzione di melata, proteggono gli stadi giovanili (Mazzon, 2001).

L'iperparassitizzazione avviene ad opera di altri artropodi; l'ordine degli Hymenoptera è tra i principali attori, all'interno del quale la famiglia Encyrtidea risulta tra quelle di maggiore rilevanza, poiché è in grado di parassitizzare le cisti di *N. typhlocybae* quando sono ancora sul flattide, per poi proseguire il loro ciclo come parassiti endofagi (Mazzon, 2001).

La presenza di iperparassitoidi possono compromettere i programmi di lotta biologica, questo ad esempio l'impiego di driinidi per il controllo delle cicaline della canna da zucchero nelle Hawaii (Olmi, 1999).

*Cheiloneurus swezeyi* (Ashmead) fu il primo Encyrtidae ad essere studiato e sfarfallato proprio da *N. typhlocybae* (Olmi, 1999).

Nel 1991 quando vennero portati in Italia bozzoli del Driinide dal Connecticut per proseguire con il programma di lotta biologica per il controllo di *M. pruinosa*, essi

risultarono per il 60% iperparassitizzati, principalmente ad opera di *C. swezeyi*. L'introduzione nella penisola dell'Encyrtide è stata evitata attraverso un'attenta analisi allo stereomicroscopio e attraverso il rilascio dei soli individui adulti di *N. typhlocybae* (Girolami & Camporese, 1994).

In Europa sono conosciuti come parassitoidi del Driinide: Encyrtidae come *C. boldyrevi* (Trjap. e Agek), Ichneumonidae come *Gelis areator* (Panzer) e tra gli Pteromalidae *Callitula bicolor* (Spinola) e *Pachyneuron muscarum* (L.) (Olmi, 1999; Viggiani et al., 2002). Oltre a queste specie vanno riportate anche le famiglie Eulophidae e Braconidae (Tabella 1) (Morocutti, 2019).

**Tabella 1.** Tabella iperparassitoidi *N. typhlocybae* (Morocutti, 2019).

Fam.	specie		segnalato da
Encyrtidae	<i>Cheiloneurus swezeyi</i>	USA	Girolami & Camporese, 1994; Olmi 1999
	<i>Cheiloneurus boldyrevi</i>	EU	Viggiani et al., 2002
	<i>Cheiloneurus</i> sp.	EU	Morocutti, 2019
	<i>Encyrtidae</i> sp.	EU	Morocutti, 2019
Eulophidae	<i>Aprostocetus</i> sp.	EU	Viggiani et al., 2002
	<i>Eulophidae</i> sp.	EU	Morocutti, 2019
Ichneumonidae	<i>Gelis areator</i>	EU	Mazzon, 2001
	<i>Ichneumonidae</i> sp.	EU	Morocutti, 2019
Braconidae	<i>Braconidae</i> sp.	EU	Morocutti, 2019
Pteromalidae	<i>Callitula bicolor</i>	EU	Viggiani et al., 2002
	<i>Pachyneuron muscarum</i>		
	<i>L</i>	EU	Viggiani et al., 2002
	<i>Trichomalus</i> sp.	EU	Viggiani et al., 2002
Eupelmidae	<i>Anastatus</i> sp.	EU	Viggiani et al., 2002
	<i>Eupelmus</i> sp.	EU	Viggiani et al., 2002
Torymidae	<i>Monodontomerus aereus</i>	EU	Viggiani et al., 2002

#### 1.2.4.1. Ichneumonidae

La famiglia Ichneumonidae, una delle più grandi dell'ordine Hymenoptera, conta oltre 24.000 specie (Yu et al., 2012). In Europa, sono state descritte oltre 6.500 specie (Achterberg & Zwakhals, 2004). La conoscenza di questa famiglia in Europa rimane scarsa nonostante il suo ruolo importante, come parassiti, nella lotta biologica (Di Giovanni et al, 2015).

In Italia, sono state segnalate circa 2.260 specie di Ichneumonidae, principalmente nel nord e nel centro della penisola, mentre le informazioni per Sicilia e Sardegna sono limitate (Achterberg & Zwakhals, 2004; Di Giovanni et al, 2015).

Degna di nota è la specie *Gelis areator* (Panzer 1804), un parassitoide generalista che può influenzare i programmi di lotta biologica contro *N. typhlocybae* (Morocutti, 2019). Alcuni studi hanno dimostrato che diverse specie appartenenti al genere *Gelis* presentano una fecondità molto basse deponendo solo 1-2 uova al giorno, anche in presenza di elevata disponibilità di ospiti (Harvey, 2008; Visser et al. , 2014). Le specie di *Gelis* mostrano una vasta gamma di ospiti, che includono sacche di uova di ragno, pupae di falene e bozzoli di iperparassitoidi (Bezant, 1956; Harvey et al., 2015).

#### 1.2.4.2. Pteromalidae

L'iperparassitizzazione di *N. typhlocybae* è fortemente influenzata dalla famiglia Pteromalidae, che svolge un ruolo cruciale in tale processo.

Il genere *Pachyneuron* (Walker, 1833) è cosmopolita, si caratterizza principalmente per la sua attività di iperparassitoide nel sottordine Homoptera e all'interno dell'ordine Hymenoptera. Inoltre, può fungere da parassita primario o secondario per i predatori delle famiglie Ditteri, Coleotteri e Neuropteri afidofagi, ma anche per le uova di alcune specie di Lepidotteri (Dzhanokmen, 2009).

In Italia e nella provincia di Padova troviamo la specie *Pachyneuron muscarum* (L., 1758) (Figura 3) come uno dei principali antagonisti del Driinide (Morocutti, 2019).

*P. muscarum* agisce principalmente come iperparassita su diversi Coccidae tramite gli Encyrtidae, nelle ninfe di Psyllidae e pupae di Coccinellidae (Dzhanokmen, 2009).



**Figura 3.** Esemplare di *Pachyneuron muscarum* (L.).

### 1.2.4.3. Eulophidae

La famiglia Eulophidae (Westwood, 1829) appartiene all'ordine Hymenoptera Chalcidoidea, che comprende numerose specie di parassitoidi.

Hanno dimensioni molto ridotte 1-4mm con livree spesso metalliche.

Gli Eulofidi agiscono principalmente come parassitoidi primari o come iperparassitoidi, solitamente ectofagi, ma vi sono diverse specie oofaghe.

I loro ospiti più comuni appartengono alle famiglie degli Imenotteri, Coleotteri, Ditteri e Lepidotteri. In misura minore, si possono trovare anche ospiti tra i Rincoti Omotteri e i Tisanotteri (Morocutti, 2019).

*Minotetrastichus frontalis* (Figura 4) è un parassitoide gregario che infesta larve e pupe e svolge sia il ruolo di entoparassitoide che di iperparassitoide.

È risaputo che *M. frontalis*, una specie europea, è in grado di parassitizzare la specie aliena *Phyllonorycter issikii*, le cui larve minatrici attaccano diverse specie del genere *Tilia*. Tuttavia, è anche noto che occasionalmente *M. frontalis* può agire come iperparassitoide su diverse specie come quelle appartenenti alla famiglia dei Braconidi (Yefremova & Mishchenko, 2008).



*Figura 4.* Esemplare di *Minotetrastichus frontalis*.

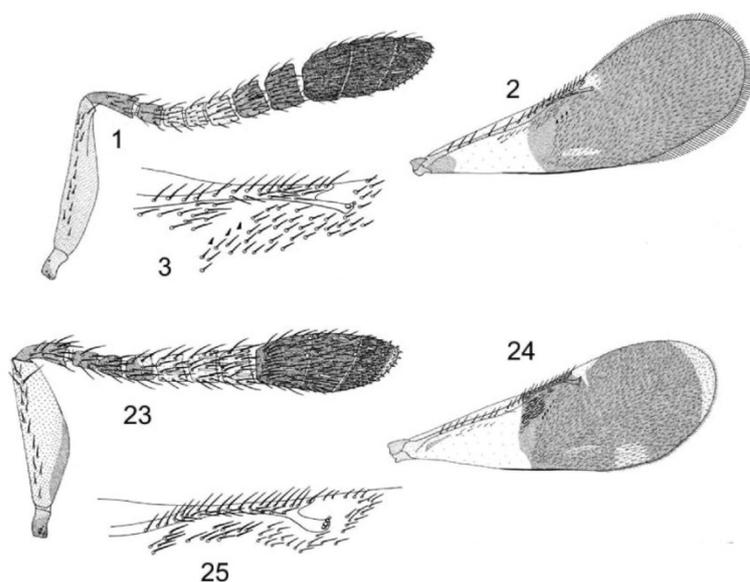
#### 1.2.4.4. Encyrtidae

All'interno degli Hymenoptera Chalcidoidea troviamo la famiglia degli Encirtidi (Walker, 1837) che comprende 450 generi. Molte specie sono parassitoidi e spesso vengono utilizzati nei programmi di lotta biologica per contrastare insetti dannosi.

Solitamente, gli Encirtidi, sono endoparassiti di stadi preimmaginali di cocciniglie, Rincoti e Chelicerati. Inoltre possono agire come iperparassiti, spesso mirando alle famiglie Braconidi e Calcidoidei (Morocutti, 2019).

All'interno degli Encirtidi troviamo il genere *Cheiloneurus* uno tra i generi più importanti come parassitosi di *N. typhlocybae*.

*Cheiloneurus swezeyi* (Ashmead 1903), diffuso in Nord America, e *Cheiloneurus boldyrevi* (Trjapitzin & Agekian, 1978), diffuso in Europa, sono due specie molto simili. Le femmine possono essere sia attere che alate. La principale differenza tra le due specie si trova nelle ali anteriori delle femmine, che rappresenta il miglior metodo per distinguerle. Nelle femmine di *C. swezeyi*, la metà distale del disco dell'ala è uniformemente infusa di colore, mentre in *C. boldyrevi* si osserva un'area subcircolare trasparente lungo il margine posteriore e una forma a mezzaluna trasparente all'apice (Figura 5)(Guerrieri & Viggiani, 2005).



**Figura 5.** ♀ *Cheiloneurus swezeyi*, antenna (1), ala anteriore (2), venatura dell'ala anteriore (3) ♀*Cheiloneurus boldyrevi*, antenna (23), ala anteriore (24), venatura dell'ala anteriore (25) (Guerrieri & Viggiani, 2005).

### 1.3. Identificazione

L'identificazione delle specie è un elemento essenziale per il riconoscimento e la descrizione della biodiversità. Storicamente, l'identificazione si è basata su diagnosi morfologiche fornite da studi tassonomici. Solo specialisti come tassonomi e tecnici qualificati possono identificare con precisione i taxa, poiché sono necessarie competenze specialistiche acquisite attraverso una vasta esperienza (Jinbo et al., 2011).

Attualmente l'identificazione si basa principalmente su basi molecolari poiché il numero di tassonomi e di esperti di identificazione si è significativamente ridotto, soprattutto in ambienti entomologici.

I progressi nelle tecnologie di sequenziamento del DNA hanno consentito ai ricercatori che studiano la biodiversità di condurre analisi del DNA semplici, economiche e veloci. Questo avanzamento nella biotecnologia, insieme alla stessa crisi nella tassonomia, ha giocato un ruolo fondamentale nello sviluppo del concetto di DNA barcoding (Jinbo et al., 2011).

### **1.3.1. DNA barcoding**

Il DNA barcoding è una tecnologia che permette l'identificazione genetica di una specie utilizzando una breve sequenza nucleotidica di gene bersaglio per le specie animali di origine mitocondriale. Tale tecnologia molecolare si basa su amplificazione, sequenziamento e confronto di segmenti con sequenze standard presenti nelle banche dati.

Nelle cellule eucariote sono presenti i mitocondri, organelli con diverse funzioni biochimiche tra cui la fosforilazione ossidativa, necessaria per la produzione di ATP. I mitocondri possiedono un genoma proprio, il DNA mitocondriale (mtDNA), completamente indipendente da quello nucleare. Una singola cellula possiede molti mitocondri, di conseguenza molto mtDNA rendendo facile l'estrazione del genoma. Il mtDNA è ereditabile solo per via materna, risulta facile la sua manipolazione, non è soggetto a ricombinazioni ed è presente in singola copia (Simon et al, 1994). Il mtDNA negli animali, in genere, è costituito da una molecola circolare a doppio filamento lunga 15-20 kb, che contiene al suo interno 37 geni. Lo studio dell'mtDNA è il sistema genomico più utilizzato e studiato per effettuare analisi sugli insetti (Boore, 1999; Cameron, 2014).

Il genoma mitocondriale degli insetti è costituito da 37 geni. Tra i 37 geni, vi sono 2 geni per gli rRNA (RNA ribosomiale), 13 geni per la codifica delle proteine (PCGs) e 22 geni per i tRNA (RNA di trasferimento). Questi geni sono distribuiti su entrambi i

filamenti del DNA mitocondriale, noti come filamento H (Heavy) e filamento L (Light), a causa della loro marcata asimmetria composizionale. Oltre ai geni, il genoma mitocondriale contiene molte strutture non codificanti. La più lunga di queste è una regione ricca di basi A e T, chiamata regione di controllo (control region) (Boore, 1999).

I geni citocromo-c ossidasi subunità I (COI) e citocromo-c ossidasi subunità II (COII) codificano per le subunità 1 e 2 dell'enzima citocromo c ossidasi, che è coinvolto nelle ultime fasi della catena di trasporto degli elettroni nel processo di fosforilazione ossidativa all'interno delle mitocondri. Questi geni sono altamente conservati all'interno della stessa specie, ma mostrano variabilità interspecifica, il che li rende un valido marcatore per gli studi tassonomici e di genetica di popolazione. Vengono utilizzati primers universali per amplificare frammenti di 684 paia di basi all'estremità 5' dei geni COI e COII (Ratnasingham et al, 2007).

L'uso dei dati molecolari per le identificazioni può contribuire a chiarire le relazioni tra individui di una stessa specie che presentano variabilità morfologica, come individui in diversi stadi di sviluppo, caste negli animali sociali e individui sessualmente dimorfici (Miller et al., 2005).

Il DNA barcoding può essere utile anche per identificare le interazioni tra le specie. La specificità dell'ospite per gli insetti parassiti è un argomento di grande interesse ed è stata valutata l'efficacia dell'utilizzo dei barcoding del DNA nello studio degli insetti parassitoidi (Smith et al. 2006). In Costa Rica sono stati identificati parassitoidi dei bruchi (Tachinidae) attraverso un'analisi morfologica dettagliata. Successivamente, hanno ripetuto lo studio utilizzando il barcoding DNA e sono riusciti a riconoscere 17 specie candidate in base alla morfologia e altre 15 specie candidate criptiche. Un approccio simile ha rivelato anche una sorprendente diversità di mosche tachinidi e vespe parassite nell'area di studio (Smith et al., 2007, 2008).

## 2. Scopo della tesi

Le recenti segnalazioni di recrudescenze di casi di infestazione di *M. pruinosa* sia in Veneto che in Trentino Alto Adige hanno stimolato una serie di ricerche volte ad individuarne le cause.

Si sono quindi ipotizzati due possibili scenari, entrambi correlati ad una diminuzione del controllo esercitato da parte di *Neodryinus typhlocybae*:

-uno legato agli effetti collaterali degli insetticidi utilizzati per la lotta contro *Halyomorpha halys* nei meleti

- l'altro legato ad aumento dell'incidenza degli iperparassitoidi autoctoni sul parassitoide di *M. pruinosa*.

Questo lavoro si è incentrato sullo studio della seconda ipotesi continuando e approfondendo una ricerca iniziata con una precedente attività di tesi (Morocutti, 2019).

In particolare, accanto ai tradizionali approcci di identificazione morfologica si sono condotte analisi genetiche (barcoding) degli iperparassitoidi ottenuti in laboratorio a partire da 3460 bozzoli raccolti nel corso del 2022 in natura in vari siti delle province di Padova e Venezia. L'indagine ha permesso inoltre di quantificare l'impatto delle varie specie, di studiarne la dinamica di popolazione e di creare una sorta di atlante di identificazione rapida dei più frequenti iperparassitoidi.



### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Esecuzione del campionamento

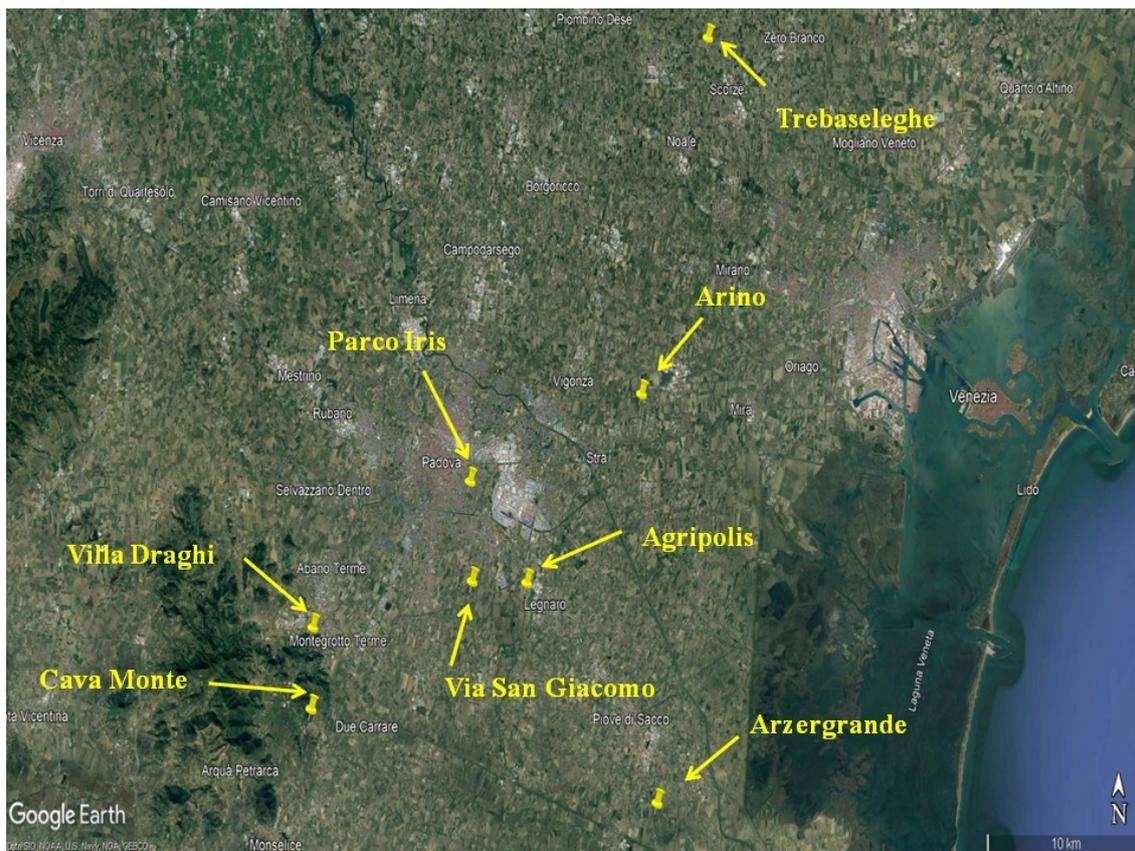
Il materiale di partenza, bozzoli di *N. typhlocybae*, è stato prelevato in diversi siti della provincia di Padova e Venezia a partire da aree boschive e siepi non trattate.

Le raccolte sono iniziate il 20 luglio 2022 e terminate il 20 ottobre 2022; in totale sono stati effettuati 12 campionamenti in 8 siti differenti (Figura 6).

Nella Tabella 2 vengono riportati i siti e la date di campionamento nonché i codici identificativi che verranno utilizzati in tutto l'elaborato.

**Tabella 2.** Geolocalizzazione dei siti di campionamento, data raccolte e codici ID.

Sito campionamento	Data	Codice ID
Arzergrande, 35020, PD. (45°15'21.7"N 12°03'17.6"E)	20/07/2022 25/07/2022	Arzergrande
Arino, 30031, VE. (45°25'59.2"N 12°02'19.0"E)	6/07/2022 12/08/2022	Arino
Trebaseleghe, 35010, PD. (45°35'41.3" N 12°05'30.2"E)	09/08/2022	Trebaseleghe
Villa Draghi, Montegrotto Terme, 35036, PD. (45°19'39.1"N 11°46'21.5"E)	24/08/2022	Villa Draghi
Università di Padova - Campus di Agripolis, Legnaro, 35020, PD. (45°20'57.9"N 11°56'47.7"E)	29/08/2022 20/09/2022	Agripolis
Parco ex Cava Monte Croce, Battaglia Terme, 35041, PD. (45°17'32.7"N 11°46'23.4"E)	13/09/2022	Cava Monte
Parco Iris, Padova, 35127, PD. (45°23'35.0"N 11°53'55.1"E)	14/09/2022	Parco Iris
Via San Giacomo a Padova, 35127, PD. (45°20'58.1"N 11°54'06.5"E)	20/10/2022	Via San Giacomo



**Figura 6.** Siti di campionamenti.

Caratteristica comune di tutti i siti considerati è la presenza di vegetazione mista costituita principalmente da: *Rubus ulmifolius*, *Acer Camperstre*, *Platanus occidentalis*, *Ulmus minor*, *Hedera helix* e *Carpinus betulus* (Figura 7).

Le foglie delle piante spontanee sopracitate, con bozzoli di *N. typhlocybae* sono state raccolte ispezionando accuratamente la vegetazione soprattutto nelle zone in cui erano presenti evidenti sintomi degli attacchi del flatide (esuvie, fiocchi cerosi, melata). Le foglie con i bozzoli sono state poste in sacchetti di plastica ed entro il giorno seguente, portate in laboratorio presso il dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova. Attraverso l'utilizzo dello stereomicroscopio sono stati accuratamente vagliati e catalogati tutti i bozzoli raccolti.



*Figura 7.* Esempio di sito di campionamento. Agripolis, Legnaro (PD).

### **3.2. Materiale di partenza**

Il materiale raccolto è stato così suddiviso (*Figura 8*):

- bozzoli sani (evidente grazie alla trasparenza del bozzolo la larva del parassitoide in perfette condizioni);
- bozzoli iperparassitizzati (evidenti larve estranee all'interno del bozzolo, esuvie larvali ed escrementi);
- bozzoli da cui erano già sfarfallati iperparassitoidi (evidenti piccoli fori circolari di sfarfallamento situati o al centro o lateralmente al bozzolo);
- bozzoli da cui il parassitoide *N. typhlocybae* era già sfarfallato (evidente un'apertura ad una delle estremità del bozzolo, di forma semi circolare);
- bozzoli predati o danneggiati (evidenti lacerazioni del bozzolo).



**Figura 8.** A) Bozzolo con foro di iperparassitoide. B) Bozzolo con foro di *N. typhlocybae*. C) Bozzolo rotto o predato

I bozzoli sani e quelli iperparassitizzati sono stati accuratamente ritagliati dalla foglia che li portava e quindi sono stati posti all'interno di contenitori trasparenti (diametro 4 cm; h 10 cm) in plastica con tappo dotato di apertura circolare (diametro 1 cm) chiusa con rete antiacaro in modo tale da consentire l'allevamento degli esemplari sfarfallati (*Figura 9*).

Ciascun contenitore è stato contrassegnato con sito e la data di campionamento, veniva riempito con bozzoli, in numero variabile ma mai superando i 35-40 bozzoli ciascuno.



**Figura 9.** Contenitori di allevamento.

### **3.3. Monitoraggi**

I contenitori durante la stagione estiva di raccolta sono stati mantenuti in laboratorio a temperatura e umidità ambientale. La trasparenza dei contenitori stessi ha reso possibile l'individuazione di eventuali sfarfallamenti.

A partire dal 22/11/2022 i contenitori sono stati portati all'aperto al riparo dai raggi solari e dalla pioggia, per consentire lo svernamento. In primavera, a partire dal 17/05/2023 i contenitori sono stati riportati in laboratorio al fine di continuare le osservazioni.

I monitoraggi, valutativi per le dinamiche di sfarfallamento e la numerosità, sono avvenuti a partire dal 29/07/2022 e terminati il 03/07/2023 con una frequenza di 7-10 giorni, con l'eccezione dei primi due monitoraggi avvenuti a distanza di 3 giorni.

Gli iperparassitoidi sfarfallati sono stati ad ogni monitoraggio estratti dai contenitori mediante aspiratore, e identificati morfologicamente mediante stereoscopio. In seguito sono stati catalogati, inseriti in eppendorf in alcool assoluto e conservati in freezer a -20°C in attesa di essere processati per eventuali analisi genetiche.

### **3.4. Identificazione**

Dopo una prima identificazione, avvenuta tramite chiavi dicotomiche, sono stati selezionati individui, di diverse specie, per poter procedere con analisi genetiche.

Prima di procedere con le prove genetiche è stato necessario selezionare gli individui campione; sono quindi stati selezionati tre individui per specie e sesso, dov'era possibile. Sono stati inseriti nell'indagine genetica inoltre esemplari raccolti da Elena Morocutti nel 2018 e conservati in alcool assoluto e a -20°C.

Il sequenziamento è avvenuto presso BMR Genomics di Padova.

### **3.4.1. Fotografie**

I campioni selezionati sono stati fotografati tramite un microscopio Leica fornito di fotocamera presso il laboratorio di Entomologia del dipartimento DAFNAE (Università di Padova).

Sono stati eseguiti diversi fotogrammi, dove necessario, ed in seguito attraverso il software Helicon Focus 8.2.2 i singoli scatti sono stati sovrapposti ottenendo immagini di alta qualità.

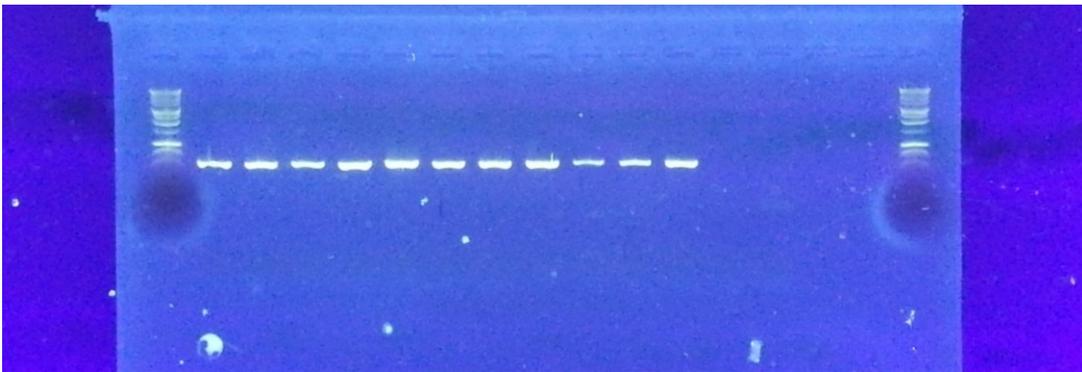
### **3.4.2. Analisi molecolari**

Per l'identificazione degli iperparasitoidi su basi molecolari è stata analizzata una regione del DNA mitocondriale che include la parte della Citocromo Ossidasi I (COI) utilizzata per il Barcoding. L'estrazione del materiale genetico è stata condotta presso il laboratorio di entomologia del Dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova utilizzando il Kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit seguendo il protocollo fornito dal produttore (Qiagen, Valencia, CA, USA).

La procedura di estrazione, utilizzando il kit Qiagen, ha incluso i seguenti passaggi:

- Si è proceduto all'asciugatura dei campioni dall'alcool.
- Si è effettuato il pestellamento degli interi individui, data la dimensione molto ridotta degli iperparasitoidi.
- I campioni sono stati lisati utilizzando la proteinasi K.
- È stata aggiunta una soluzione tampone per favorire il legame con il DNA, successivamente il lisato è stato caricato sulla colonna spin DNeasy Mini.
- Durante la centrifugazione, la membrana a base di silice presente nella colonna spin Dneasy Mini ha legato selettivamente il DNA, mentre i contaminanti sono passati attraverso la colonna e sono stati rimossi.
- Successivamente, sono state eseguite ulteriori due fasi di lavaggio per rimuovere eventuali contaminanti e inibitori enzimatici residui.
- Infine, il DNA è stato eluito nel tampone AE.

Dopo l'estrazione, è stata eseguita una PCR per amplificare il frammento desiderato del DNA mitocondriale utilizzando i primer universali LCO-1490/HCO-2198 (Folmer et al. 1994) et C1J-1718 and C1N-2191 (Simon et al. 1994). La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata operata in un volume totale di 20  $\mu$ L per ogni campione usando GoTaq <sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, USA). I campioni sono stati quindi amplificati seguendo le seguenti condizioni: 5 cicli a 95°C per 5 minuti, 95°C per 1' (denaturazione), 48°C per 1' (annealing), 72°C per 1' (estensione) e 40 cicli a 95°C per 1' (denaturazione), 50°C per 1' (annealing), 72°C per 1' (estensione), 72°C per 5' (estensione finale). Successivamente, i prodotti amplificati sono stati separati utilizzando un gel di agarosio e osservati su un trasluminatore ad UV (*Figura 10*).



**Figura 10.** Osservazione di PCR su un trasluminatore ad UV dei campioni esaminati.

Terminate queste procedure, si è inviato il materiale presso BMR Genomics per poter eseguire il sequenziamento.

Per completare l'analisi, le sequenze sono state sottoposte all'elaborazione mediante il software MEGA XI (Koichiro et al, 2021). Al fine di verificare l'identità delle sequenze, è stata effettuata una consultazione della banca dati online chiamata "Barcode of Life Database" (BOLDSYSTEMS), accessibile tramite il sito [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org). Inoltre, è stata utilizzata l'applicazione BLAST, disponibile sul sito dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information), per ulteriori conferme sull'identificazione dei campioni sequenziati.



## 4. Risultati e discussione

### 4.1. Dati di campo

#### 4.1.1. Dati generali

Sono state raccolte 2633 foglie per un totale di 3460 bozzoli di cui: 1649 presentavano fori di uscita e/o predati (48%), quindi senza la larva di *N. typhlocybae* all'interno, 1811 apparentemente sani (52%) (Figura 11).



**Figura 11.** Percentuale di bozzoli sani (52%) percentuale di bozzoli che presentavano fori d'uscita e/o predati (48%), rispetto al totale dei campioni analizzati.

Dei 1649 bozzoli “vuoti” si sono individuate tre sottocategorie:

- con fori di sfarfallamento di *N. typhlocybae* (n 464)
- con fori di sfarfallamento di iperparassitoidi (n 439)
- predati (n 746)

A questi, registrati immediatamente dopo il campionamento, successivamente sono stati sommati i dati degli sfarfallamenti (sia di iperparassitoidi che di *N. typhlocybae*) registrati in laboratorio nel corso della stagione e nella stagione successiva.

Dal totale dei bozzoli raccolti (n 3640) si sono categorizzate quattro macrogruppi (Figura 12):

- Bozzoli non sfarfallati (presumibilmente morti) (n 969)
- *N. typhlocybae* (data dalla somma degli sfarfallamenti avvenuti in laboratorio e di quelli avvenuti in campo prima della raccolta) (n 520)
- Iperparassitoidi (data dalla somma degli sfarfallamenti avvenuti in laboratorio e di quelli avvenuti in campo prima della raccolta) (n 1225)
- Bozzoli predati (n 746)

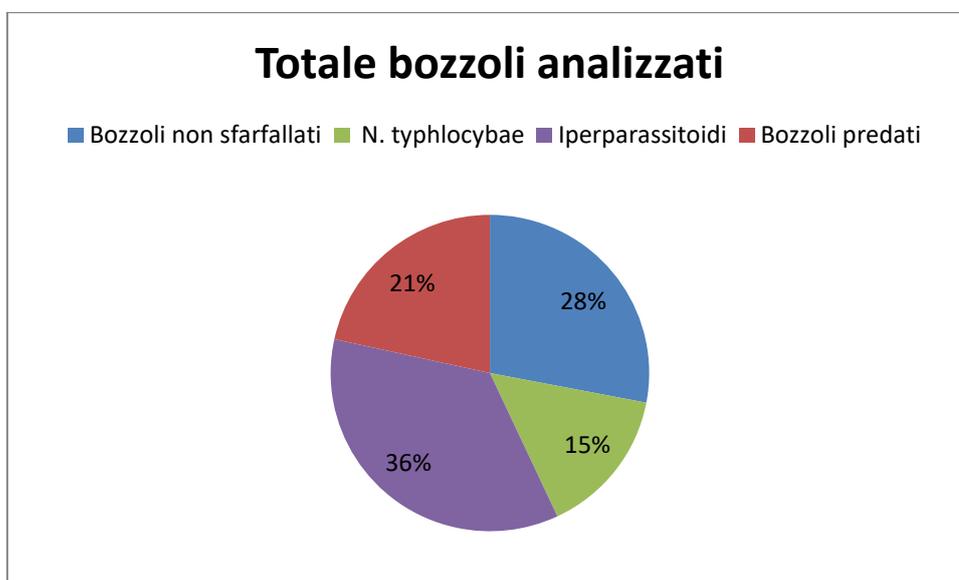
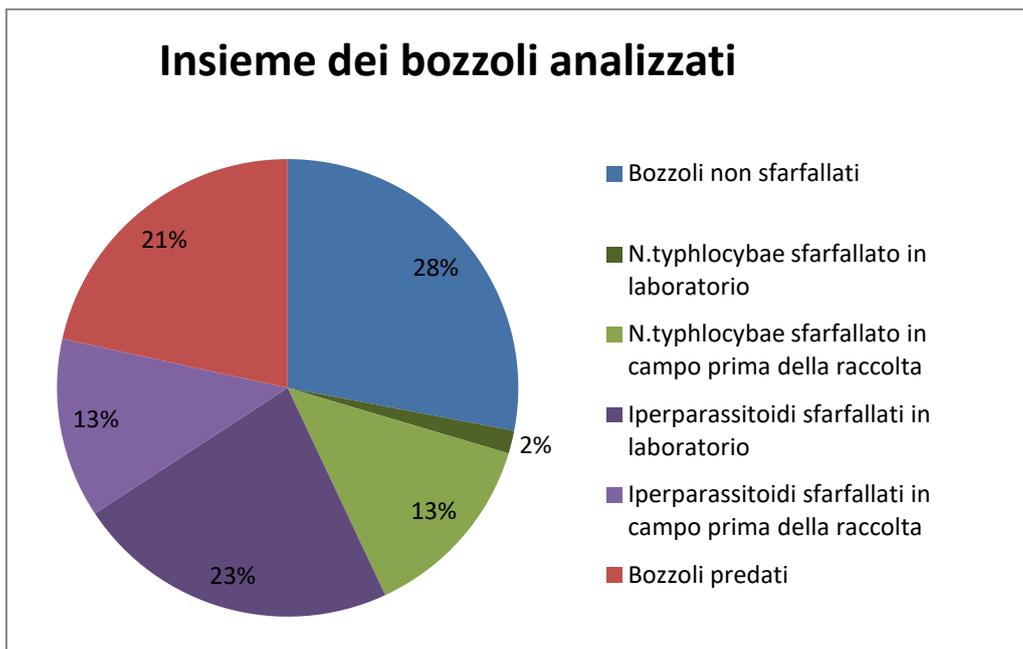


Figura 12. Percentuale dei bozzoli analizzati suddivisi nei quattro macrogruppi principali.

#### 4.1.2. Iperparassitizzazione totale

L'iperparassitizzazione totale è pari al 36%; tale percentuale risulta la più alta registrata sul totale degli individui esaminati.

Dei 1225 esemplari totali: 439 provengono da bozzoli i cui iperparassitoidi erano sfarfallati in campo in piena estate prima della raccolta (13%), mentre i rimanenti 786 sono iperparassitoidi rinvenuti in laboratorio dai bozzoli raccolti (23%). Questi ultimi sfarfallamenti sono comprensivi sia degli sfarfallamenti autunnali che di quelli primaverili post svernamento (Figura 13).

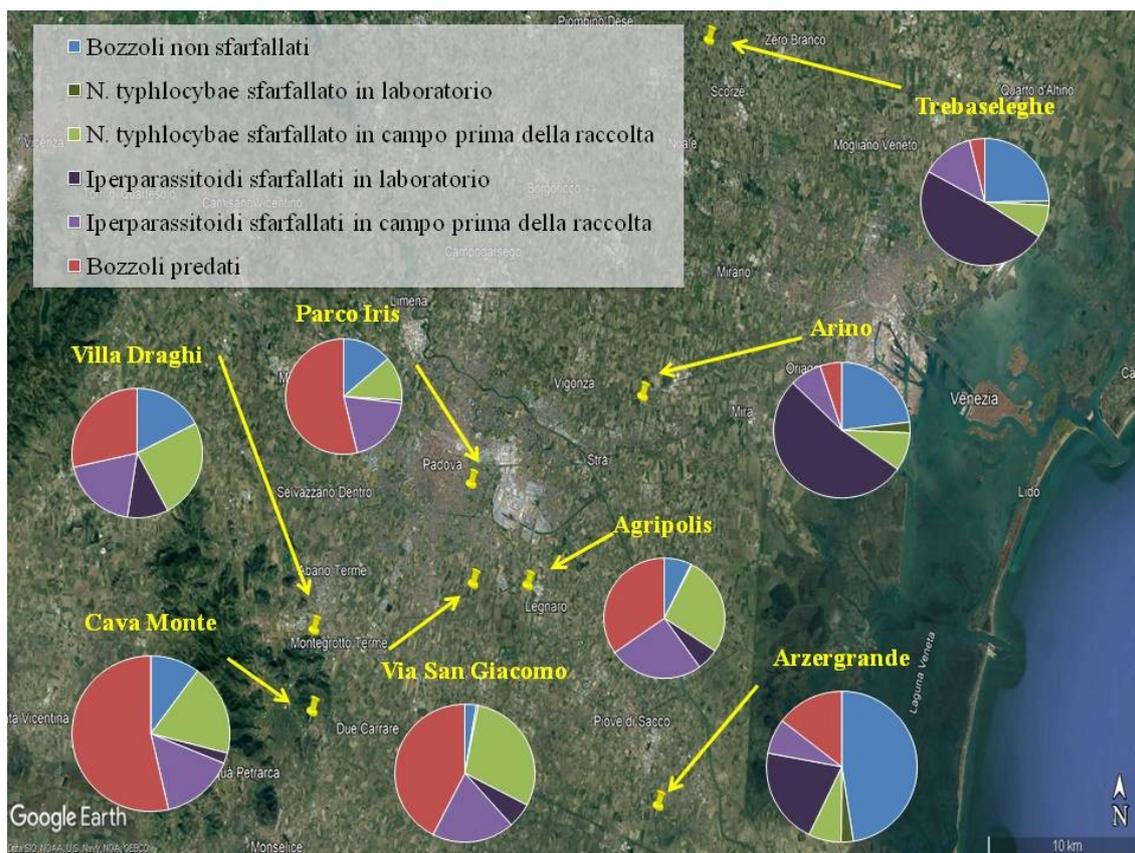


**Figura 13.** Suddivisione complessiva del campione di bozzoli raccolto nell'estate 2022.

Va evidenziato come l'entità della iperparassitizzazione sia piuttosto variabile da sito a sito. In particolare, le percentuali più importanti si sono avute nei siti di Arino e Trebaseleghe dove tale percentuale ha raggiunto rispettivamente il 60.1% e il 62.1% (Figura 14 e Tabella 3).

La variabilità maggiore di iperparassitizzazione legata agli sfarfallamenti avvenuti in laboratorio si è registrata sui campioni del sito di Arino, con una percentuale massima del 52.5%, mentre la minore, pari allo 0.9%, si è attestata nei campionamenti del sito Parco Iris.

I campioni relativi agli iperparassitoidi sfarfallati in campo prima della raccolta possiedono una variabilità inferiore: dal 25.2% del sito di Agripolis sino ad arrivare al 7.6% dei siti Arzergrande e Arino.



**Figura 14.** Suddivisione complessiva del campione di bozzoli raccolto nell'estate 2022 per sito di campionamento .

**Tabella 3.** Percentuali della suddivisione complessiva del campione di bozzoli raccolto nell'estate 2022 per sito di campionamento.

Sito	Bozzoli non sfarfallati	N. typhlocybae sfarfallato		Iperparassitoidi sfarfallati		Predati
		in laboratorio	in campo prima della raccolta	in laboratorio	in campo prima della raccolta	
Arzergrande	47.8%	2.6%	7.0%	20.8%	7.6%	14.5%
Arino	23.1%	2.6%	9.1%	52.5%	7.6%	5.2%
Trebaseleghe	24.7%	1.1%	8.2%	48.9%	13.2%	3.8%
Villa Draghi	17.5%	0.0%	24.8%	10.2%	19.1%	28.5%
Agripolis	7.3%	0.2%	26.7%	5.9%	25.2%	34.7%
Cava Monte	10.1%	0.0%	18.8%	2.2%	15.2%	53.6%
Parco Iris	13.7%	0.0%	12.3%	0.9%	19.4%	53.7%
Via San Giacomo	2.7%	0.4%	29.5%	22.7%	19.2%	21.6%

Dai bozzoli con fori presenti già al momento del campionamento è stato possibile valutare l'andamento dell'iperparassitizzazione nel tempo (Figura 15 e Tabella 4).

Le maggiori percentuali di iperparassitizzazione su questi, provengono dal sito Agripolis nelle date 29/08/22 e 06/10/22 registrando rispettivamente il 28% e il 23%.

Si può notare che nei primi campionamenti e sino al 26/07/22 non si sono raggiunte percentuali superiori al 7%; con il passare dei mesi vi è stato un aumento graduale ma costante, nonostante la presenza di variabilità riconducibile alla diversità dei siti.

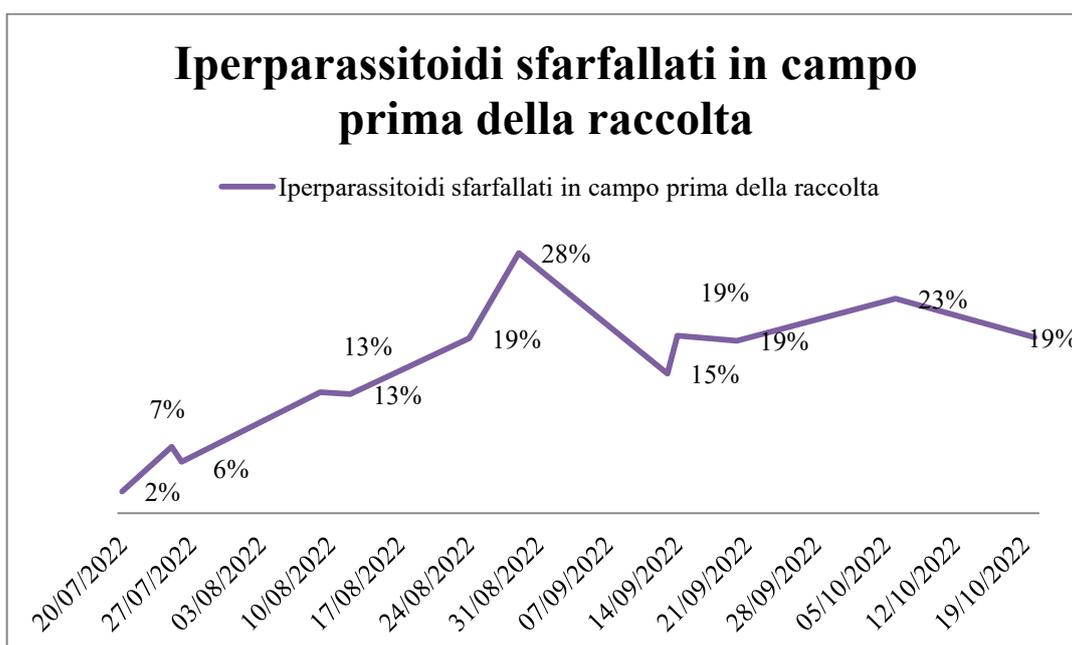


Figura 15. Andamento dell'iperparassitizzazione nel tempo.

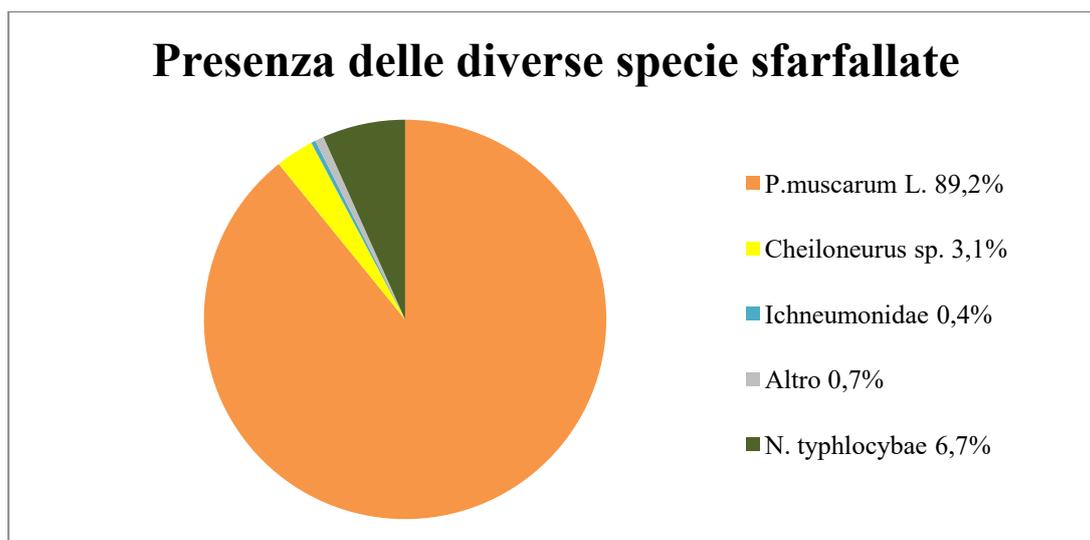
Tabella 4. Iperparassitoidi sfarfallati in campo prima della raccolta.

Sito	Data	Iperparassitoidi		Bozzoli Totali
		N°	%	
Arzergrande	20/7/22	16	2%	677
Arzergrande	25/7/22	26	7%	359
Arino	26/7/22	27	6%	482
Trebaseleghe	9/8/22	24	13%	182
Arino	12/8/22	23	13%	177
Villa Draghi	24/8/22	47	19%	246
Agripolis	29/8/22	44	28%	155
Cava Monte	13/9/22	21	15%	138
Parco Iris	14/9/22	44	19%	227
Arzergrande	20/9/22	61	19%	324
Agripolis	6/10/22	63	23%	269
Via San Giacomo	20/10/22	43	19%	224

### 4.1.3. Sfarfallamento di *N. typhlocybae* totale

Complessivamente, dai bozzoli raccolti nel corso dell'intera attività (n 3460) sono sfarfallati 520 esemplari di *N. typhlocybae* (15%), di cui 464 risultavano già sfarfallati in campo (13%) mentre solo 56 sono sfarfallati in laboratorio (2%)

Di tutti gli individui sfarfallati durante la sperimentazione (n 842), *N. typhlocybae* rappresenta il 6.7% ( *Figura 16*).



*Figura 16.* Percentuale totale dei diversi esemplari sfarfallati durante la sperimentazione.

In figura 17 è rappresentato l'andamento degli sfarfallamenti in relazione anche al sesso di *N.typhlocybae*. È evidente come lo sfarfallamento sia avvenuto in due epoche distinte: i) nella stessa estate di raccolta (frazione bivoltina) e ii) a maggio-giugno della stagione successiva (frazione svernante) con una stasi corrispondente alla fase diapausante.

I dati raccolti sono stati rappresentati attraverso istogramma, senza riportare le effettive date di sfarfallamento ma sommando le diverse date e raggruppandole per mesi, per rendere più facile la fruizione dei dati.

Si può vedere che gli esemplari sono usciti dallo svernamento nel 2023 tra maggio e giugno in particolare a partire dal 31/05/2023 .

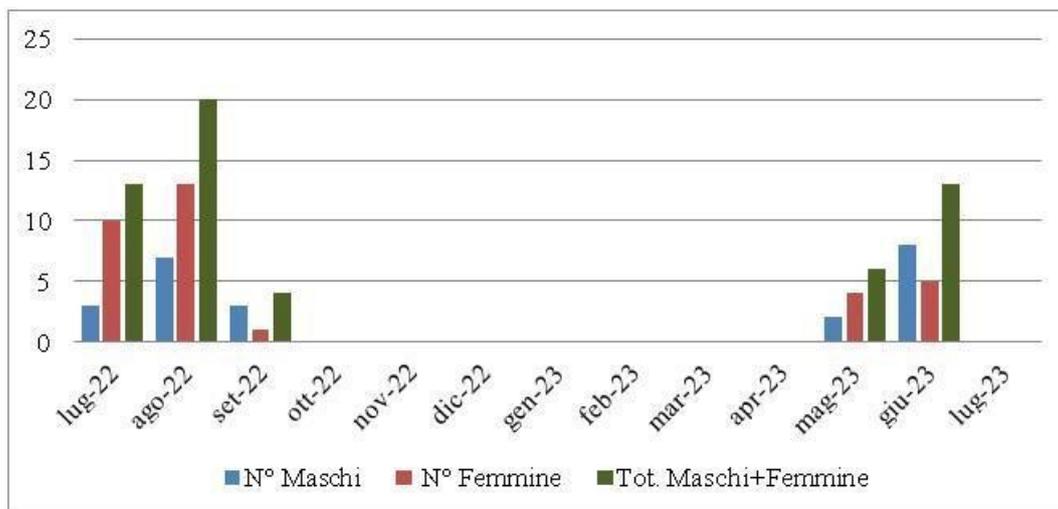


Figura 17. Epoca di sfarfallamento di *N. typhlocybae* in valore assoluto.

Al fine di valutare l'andamento nel tempo degli sfarfallamento del driinide sono stati elaborati i bozzoli raccolti in campo (Figura 18 e Tabella 5).

Il campionamento avvenuto il 29/08/2022 presso il sito di Agripolis ha presentato la percentuale più alta di sfarfallamento da parte di *N. typhlocybae* (34%).

Anche in questo caso si può notare un andamento crescente costante nonostante la variabilità legata alla diversità dei siti.

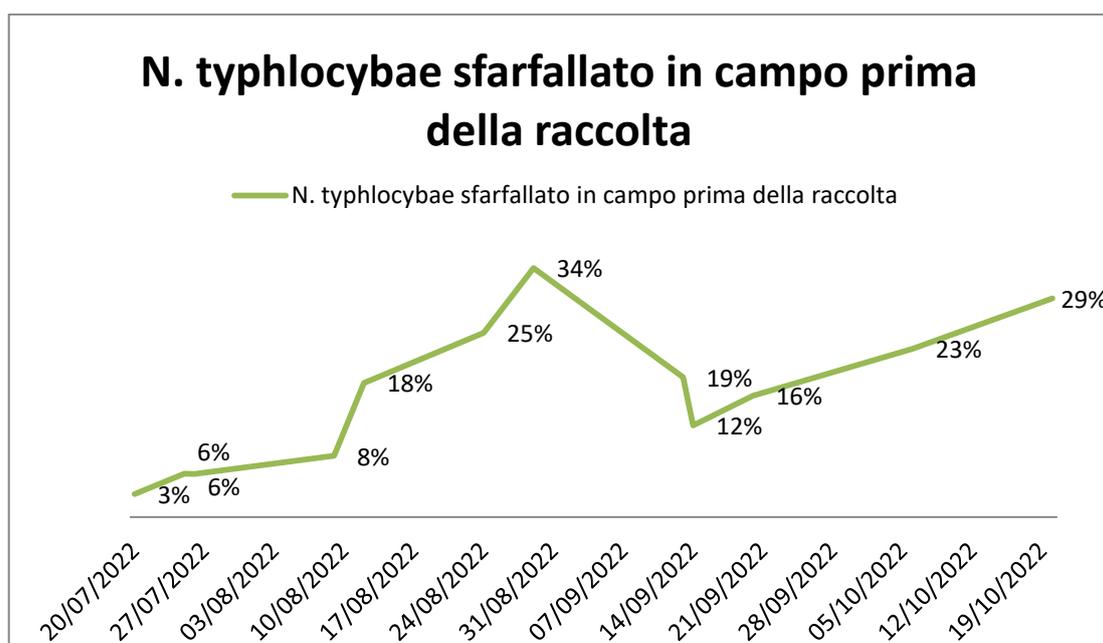


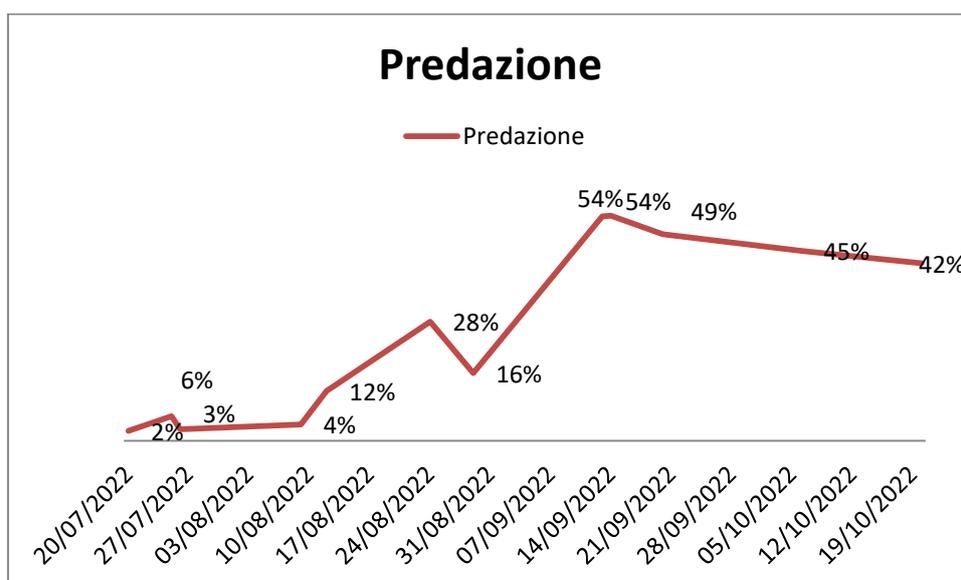
Figura 18. Andamento degli sfarfallamenti di *N. typhlocybae* nel tempo.

**Tabella 5.** *N.typhlocybae* sfarfallati in campo prima della raccolta.

Sito	Data	<i>N.typhlocybae</i>		Bozzoli Totali
		N°	%	
Arzergrande	20/7/22	21	3%	677
Arzergrande	25/7/22	21	6%	359
Arino	26/7/22	28	6%	482
Trebaseleghe	9/8/22	15	8%	182
Arino	12/8/22	32	18%	177
Villa Draghi	24/8/22	61	25%	246
Agripolis	29/8/22	52	34%	155
Cava Monte	13/9/22	26	19%	138
Parco Iris	14/9/22	28	12%	227
Arzergrande	20/9/22	53	16%	324
Agripolis	6/10/22	61	23%	269
Via San Giacomo	20/10/22	66	29%	224

#### 4.1.4 Predazione

Sono stati, classificati come predati 746 bozzoli già vuoti al momento del campionamento (21%). È interessante notare come l'entità del contingente di bozzoli predati tenda ad aumentare nel tempo (Figura 19 e Tabella 6).



**Figura 19.** Andamento della predazione nel tempo

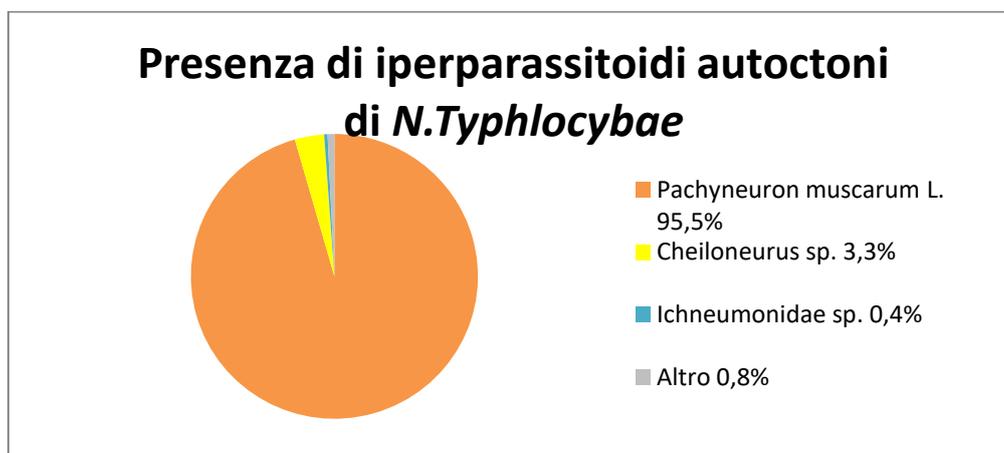
**Tabella 6.** Dati relativi al N° di bozzoli predati rispetto al totale dei campioni raccolti in relazione ai diversi siti, date di campionamento e relativa percentuale.

Sito	Data	Predati		Bozzoli Totali
		N°	%	
Arzergrande	20/7/22	16	2%	677
Arzergrande	25/7/22	21	6%	359
Arino	26/7/22	13	3%	482
Trebaseleghe	9/8/22	7	4%	182
Arino	12/8/22	21	12%	177
Villa Draghi	24/8/22	70	28%	246
Agripolis	29/8/22	25	16%	155
Cava Monte	13/9/22	74	54%	138
Parco Iris	14/9/22	122	54%	227
Arzergrande	20/9/22	160	49%	324
Agripolis	6/10/22	122	45%	269
Via San Giacomo	20/10/22	95	42%	224

#### 4.1.5. Specie di iperparassitoidi sfarfallati

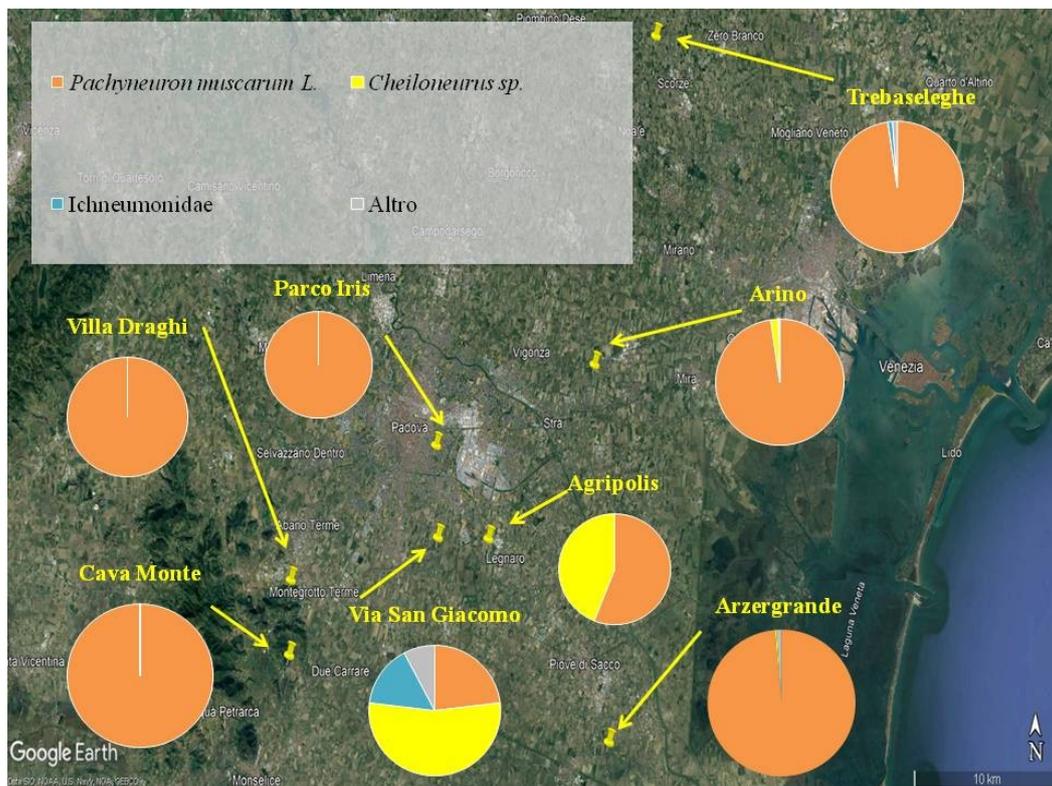
Dalla totalità degli iperparassitoidi sfarfallati (n 786) morfologicamente sono stati individuate 4 categorie sistematiche (*Figura 20*):

1. *Pachyneuron muscarum* L. (Fam. Pteromalidae) ( n 751)
2. *Cheiloneurus* sp. (Fam. Encirtydae) (n 26)
3. Ichneumonidae (n 3)
4. Altro (n 6)



**Figura 20.** Percentuale delle diverse specie di iperparassitoidi sfarfallate in laboratorio.

I siti Cava Monte, Villa Draghi e Parco Iris, hanno presentato il 100% degli sfarfallamenti legati a *Pachyneuron muscarum* L. La maggiore variabilità si osserva nel sito di Via San Giacomo che del resto presenta anche la percentuale più alta di individui di *Cheiloneurus* sp. (53.8%) (Figura 21 e Tabella 7) .



**Figura 21.** Specie di iperparassitoidi sfarfallate in relazione ai siti di campionamento

**Tabella 7.** Iperparassitoidi sfarfallati in laboratorio dal materiale raccolto nei diversi siti di campionamento.

Sito	<i>Pachyneuron muscarum</i> L.		<i>Cheiloneurus</i> sp.		Ichneumonidae		Altro		TOT. Iperparassitoidi sfarfallati
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Arzergrande	279	98,6%	279	0,4%	0	0,0%	3	1,1%	283
Arino	338	97,7%	338	2,0%	0	0,0%	1	0,3%	346
Trebaseleghe	87	97,8%	87	0,0%	1	1,1%	1	1,1%	89
Villa Draghi	25	100,0%	25	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	25
Agripolis	14	56,0%	14	44,0%	0	0,0%	0	0,0%	25
Monte Croce	3	100,0%	3	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3
Parco Iris	2	100,0%	2	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2
Via San Giacomo	3	23,1%	3	53,8%	2	15,4%	1	7,7%	13
Tot.	751	95,5%	751	3,3%	3	0,4%	6	0,8%	786

#### 4.1.5.1 *Pachyneuron muscarum* L. (Fam. Pteromalidae)

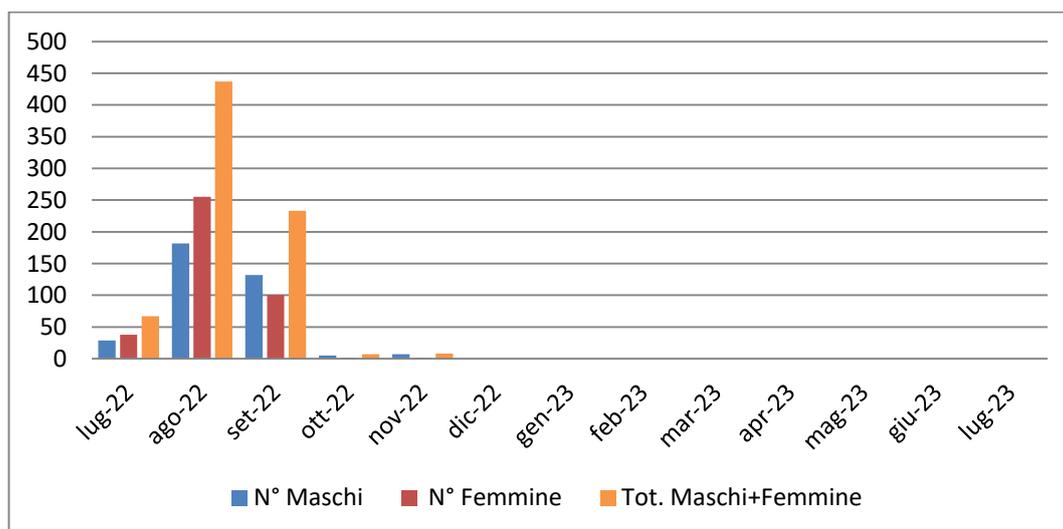
*P. muscarum* è risultata la specie con la maggior incidenza di parassitizzazione nei confronti di *N.typhlocybae*, con ben 751 esemplari sfarfallati su 786 rappresentando ben 95.5% del totale degli iperparassitoidi sfarfallati.

Gli esemplari sono sfarfallati tutti entro il 15/11/2022.

Durante la primavera e l'estate 2023 non si sono verificati sfarfallamenti.

Del totale di 751 esemplari 355 sono risultati maschi e 596 femmine.

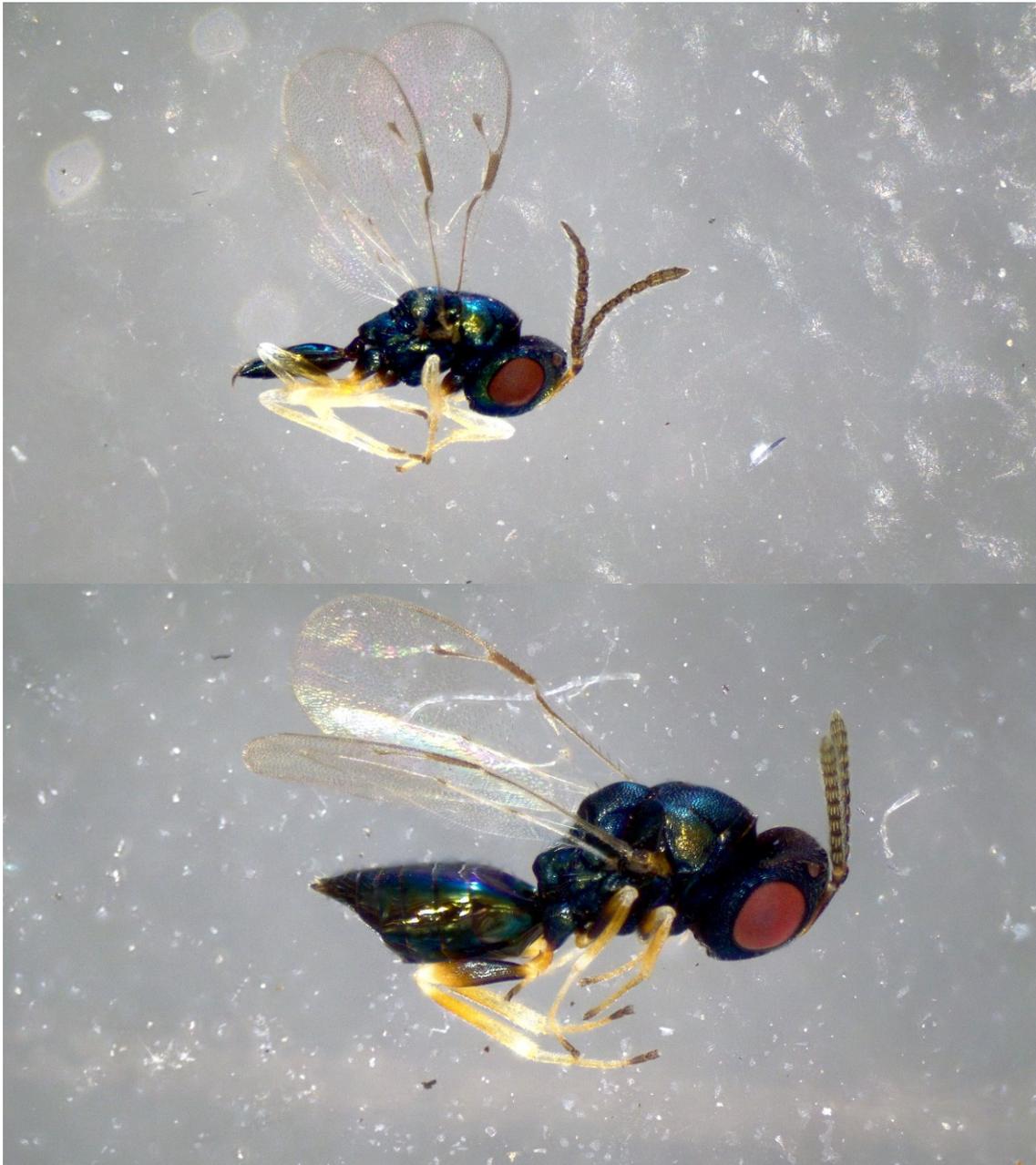
Le dinamiche di sfarfallamento dei maschi e delle femmine durante l'anno sembrano seguire lo stesso andamento (*Figura 22*).



**Figura 22.** Epoca di sfarfallamento di *P. muscarum* L. suddivisa per sesso e in valore assoluto.

La distinzione dei due sessi è avvenuta attraverso l'analisi visiva, mediante stereomicroscopio, osservando gli addomi degli individui (*Figura 23*).

Gli esemplari con addomi di forma pseudo triangolare sono stati catalogati come femmine mentre quelli con addomi schiacciati sono stati catalogati come maschi.



**Figura 23.** *P. muscarum* esemplare femmina con addome pseudo triangolare (sopra), esemplare maschio con addome appiattito (sotto).

#### **4.1.5.2. *Cheiloneurus* sp. (Fam. Encyrtidae)**

Per quanto riguarda gli esemplari appartenenti al genere *Cheiloneurus*, a livello morfologico non si è proceduto oltre l'attribuzione del genere in quanto gli esemplari sfarfallati non sembrano coincidere con la specie *C. boldyrevi* già segnalata su *N. typhlocybae* (Viggiani et al., 2002; Guerrieri e Viggiani, 2005; Vetek et al., 2019).

l'utilizzo delle chiavi dicotomiche si è rivelato piuttosto difficoltoso a causa del fatto che spesso la chiave fa riferimento alle ali, ma le femmine sfarfallate dai bozzoli raccolti sono risultate tutte attere.

Tutti i *Cheiloneurus* sfarfallati sembrano comunque appartenere alla stessa specie. Quantitativamente è risulta la seconda per importanza di parassitizzazione del driinide attestandosi, nel nostro studio, ad una percentuale di presenza del 3.3% dei bozzoli parassitizzati.

La distinzione tra i due sessi è risultata semplice dato l'elevato dimorfismo sessuale che la specie presenta (*Figura 24*).



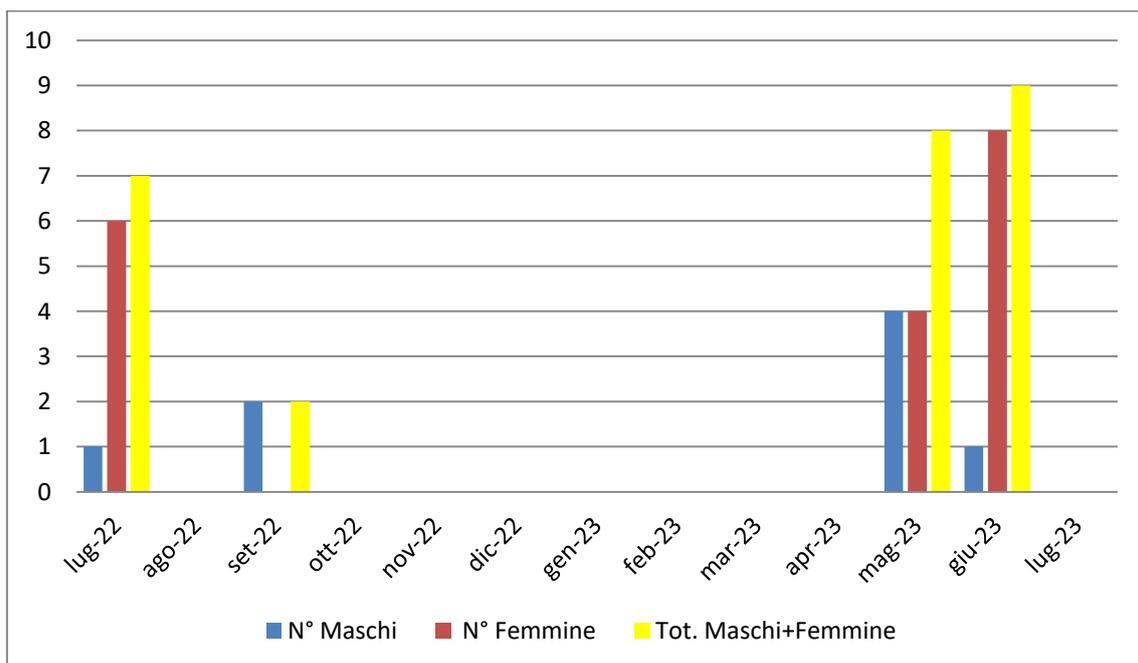
**Figura 24.** *Cheiloneurus sp.* esemplare femmina attera (sopra), esemplare maschio alato (sotto).

In totale sono sfarfallati 26 esemplari di cui 8 maschi e 18 femmine. I voli sono avvenuti a luglio e a settembre 2022 e sono ripresi a maggio e giugno 2023, evidenziando il fatto che questa specie può svernare all'interno dei bozzoli di *N.typhlocybae* (Figura 25) .

Su metà dei siti di campionamento si è assistito allo sfarfallamento dei 26 esemplari della specie, ottenuti:

- Arzergrande, 1 esemplare maschio,
- Arino, 1 maschio e 6 femmine,
- Agripolis, 6 maschi e 5 femmine,
- Via San Giacomo, 7 esemplari femmina.

I restanti siti di raccolta non hanno presentato alcun individuo sfarfallato.



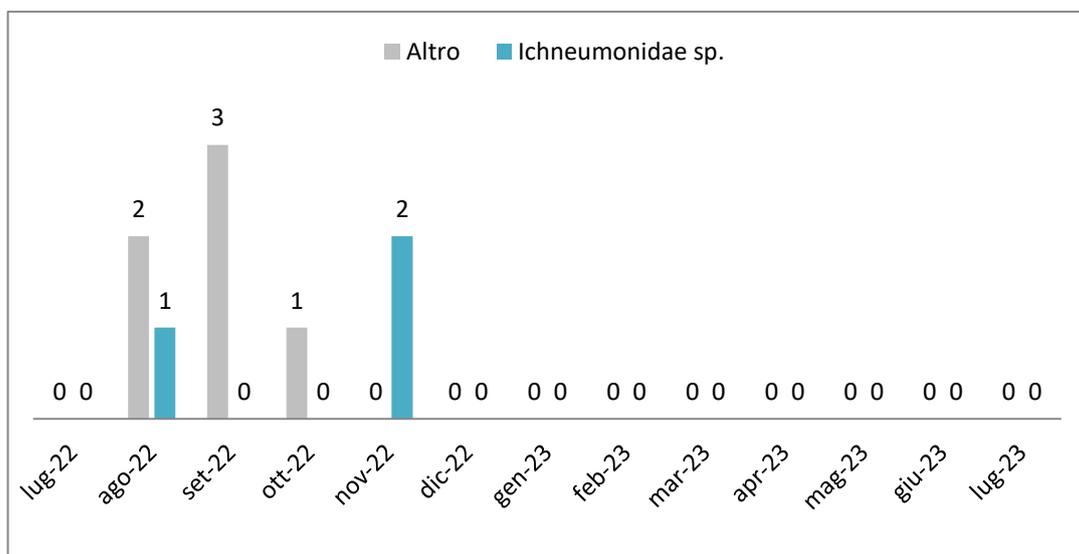
**Figura 25.** Epoca di sfarfallamento di *Cheiloneurus sp.* suddivisa per sesso e in valore assoluto.

### 4.1.5.3. Ichneumonidae

Gli esemplari appartenenti a questa famiglia complessivamente sono stati 3 (0.4% di tutti gli iperparassitoidi sfarfallati). La specie morfologicamente è stata attribuita a *Gelis areator* già segnalato su *N. typhlocybae* (Olmì, 2000; Mazzon 2001) (Figura 26).

### 4.1.5.4. Altro

Sei esemplari (0.8%) non sono risultati attribuibili a nessuna delle categorie trattate e per la loro scarsa incidenza non sono ancora stati studiati (Figura 26 e 27).



**Figura 26.** Epoca di sfarfallamento degli Ichneumonidae identificati e delle specie secondarie considerate come "Altro".



**Figura 27.** Esempio di esemplare non identificato inserito nel gruppo denominato "Altro".

## 4.2. Analisi genetiche

Dopo l'identificazione morfologica avvenuta attraverso chiavi dicotomiche sono stati selezionati alcuni esemplari per il sequenziamento.

Gli esemplari scelti stoccati a -20°C in alcool assoluto provengono:

- Dal presente lavoro (2022)
- Da precedenti indagini (Morocutti, 2019)

In totale sono stati scelti 18 esemplari: 11 provenienti dai campioni raccolti per questo studio e 7 dal precedente lavoro. La selezione degli individui si è basata grazie alle identificazioni morfologiche precedenti. Quando possibile, sono stati individuati 2 o 3 esemplari per morfotipo al fine di rappresentare la varietà di iperparassitoidi presente. All'interno dei 18 esemplari, ne sono stati inseriti 8 non identificati (N.I.): 6 provenienti dalla raccolta del 2018 e 2 del 2022 (*Tabella 8*).

Ad ogni esemplare selezionato è stato assegnato un codice alfanumerico; tutti gli esemplari provenienti dai campioni di Morocutti sono contrassegnati con la lettera "E", inserita all'inizio del proprio ID, lettera non presente negli esemplari provenienti dal presente lavoro.

Sono state ottenute sequenze di qualità per tutti e 18 gli esemplari di un numero di basi variabile da 300 a 600 bp. Il primer utilizzato è stato LCO-1490.

Le banche dati NCBI e BOLDsystem sono state utilizzate per valutare la percentuale di identità con specie già sequenziate e presenti nei database. Sono stati considerate anche le località di provenienza geografica degli esemplari con maggiore identità presenti nei database (*Tabella 9*).

**Tabella 8.** Provenienza degli individui selezionati in relazione all' identificazione morfologica. “N° Individui” indica la quantità totale del morfotipo identificato in relazione alla specie e alla famiglia. Gli esemplari contrassegnati con la lettera E nell’ID provengono da Morocutti (2019). “N.I.” indica esemplari non identificati a livello di specie o famiglia.

ID	Sito raccolta	Data raccolta	Data estrazione	Identificazione su base morfologica	N° Individui
A2	Arino	25/07/22	29/07/22	<i>Cheiloneurus</i> sp. ♀ Encyrtidae	18 26
B2	Agripolis	29/08/22	09/09/22	<i>Cheiloneurus</i> sp. ♂ Encyrtidae	8 26
F2	Via San Giacomo	20/10/22	08/11/22	<i>Gelis areator</i> ♀ Ichneumonidae	1 3
I1	Arino	12/08/22	25/10/22	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♂ Pteromalidae	355 751
I2	Arzergrande	20/07/22	31/07/22	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♂ Pteromalidae	355 751
I3	Villa Draghi	24/08/22	29/08/22	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♂ Pteromalidae	355 751
L1	Arzergrande	20/07/22	31/07/22	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♀ Pteromalidae	396 751
L2	Cava Monte	13/09/22	20/09/22	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♀ Pteromalidae	396 751
L3	Villa Draghi	24/08/22	29/08/22	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♀ Pteromalidae	396 751
M1	Trebaseleghe	09/08/22	18/08/22	N.I. Ichneumonidae	1 3
M11	Trebaseleghe	09/08/22	29/08/22	N.I. N.I	1 6
EG1	Arzergrande	27/07/18	30/07/18	N.I. Eulophidae	21 21
EG3	Arzergrande	27/07/18	03/08/18	N.I. Ichneumonidae	2 14
EH2	Arzergrande	24/07/18	30/07/18	N.I. Ichneumonidae	2 14
EH3	Arzergrande	24/07/18	03/08/18	N.I. Eulophidae	21 21
EH12-2	Arzergrande	24/07/18	31/10/18	N.I. Ichneumonidae	2 14
EL3	Arzergrande	26/07/18	03/08/18	<i>Gelis areator</i> ♂ Ichneumonidae	5 14
EN10	Arzergrande	26/07/18	20/11/18	N.I. Ichneumonidae	2 14

**Tabella 9.** Elenco delle sequenze ottenute e confronto tra identificazione morfologica e molecolare sulla base dei database NCBI e Bold System. Gli esemplari contrassegnati con la lettera E nell'ID provengono da Morocutti (2019). "N.I." indica esemplari non identificati a livello di specie o famiglia.

ID	bp	Identificazione su base morfologica	Identificazione su base molecolare	Identity (%)	Identificazione e su base molecolare	Identity (%)
			NCBI	NCBI	Bold System	Bold System
A2	600	<i>Cheiloneurus sp.</i> ♀ Encyrtidae	<i>Encyrtidae</i> Encyrtidae	86,07 (Canada)	<i>Cheiloneurus boldyrevi</i> Encyrtidae	87,7 (Ungheria)
B2	600	<i>Cheiloneurus sp.</i> ♂ Encyrtidae	<i>Encyrtidae</i> Encyrtidae	85,69 (Canada)	<i>Cheiloneurus boldyrevi</i> Encyrtidae	87,84 (Ungheria)
F2	600	<i>Gelis areator</i> ♀ Ichneumonidae	<i>Gelis areator</i> Ichneumonidae	91,34 (Svezia)	<i>Gelis liparea</i> Ichneumonidae	99,64 (Portogallo)
I1	300	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♂ Pteromalidae	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	97,3 (Austria)	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	98,31 (Ungheria)
I2	300	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♂ Pteromalidae	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	97,3 (Austria)	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	98,31 (Germania)
I3	300	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♂ Pteromalidae	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	91,43 (Austria)	<i>Pteromalidae muscarum</i> Pteromalidae	92,66 (Germania)
L1	600	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♀ Pteromalidae	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	98,54 (Austria)	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	98,72 (Germania)
L2	300	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♀ Pteromalidae	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	97,28 (Austria)	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	98,31 (Germania)
L3	600	<i>Pachyneuron muscarum</i> ♀ Pteromalidae	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	97,45 (Austria)	<i>Pachyneuron muscarum</i> Pteromalidae	98,53 (Germania)
M1	600	N.I. Ichneumonidae	<i>Cryptinea sp.</i> Ichneumonidae	93,69 (Canada)	<i>Diaglyptidea conformis</i> Ichneumonidae	100 (Austria)
M11	600	N.I. N.I.	<i>Helorus ruficornis</i> Heloridae	99,63 (Canada)	<i>Helorus ruficornis</i> Heloridae	99,82 (Francia)
EG1	600	N.I. Eulophidae	<i>Tetrastichinae sp.</i> Eulophidae	97,45 (Canada)	<i>Minotetrastichus frontalis</i> Eulophidae	99,26 (Inghilterra)
EG3	600	N.I. Ichneumonidae	<i>Bathythrix thomsoni</i> Ichneumonidae	98,92 (Svezia)	<i>Bathythrix thomsoni</i> Ichneumonidae	99,45 (Francia)
EH2	600	N.I. Ichneumonidae	<i>Tromatobia lineatoria</i> Ichneumonidae	97,3 (Inghilterra)	<i>Tromatobia lineatoria</i> Ichneumonidae	97,45 (Norvegia)
EH3	600	N.I. Eulophidae	<i>Tetrastichinae</i> Eulophidae	97,27 (Canada)	<i>Minotetrastichus frontalis</i> Eulophidae	99,08 (Inghilterra)
EH12-2	600	N.I. Ichneumonidae	<i>Tromatobia lineatoria</i> Ichneumonidae	83,81 (Inghilterra)	<i>Tromatobia lineatoria</i> Ichneumonidae	82,22 (Germania)
EL3	600	<i>Gelis areator</i> ♂ Ichneumonidae	<i>Gelis areator</i> Ichneumonidae	100 (Olanda)	<i>Gelis areator</i> Ichneumonidae	100 (Germania)
EN10	600	N.I. Ichneumonidae	<i>Bathythrix thomsoni</i> Ichneumonidae	99,46 (Svezia)	<i>Bathythrix thomsoni</i> Ichneumonidae	100 (Francia)

Le analisi molecolari hanno consentito di identificare iperparassitoidi appartenenti a cinque famiglie tutte appartenenti all'ordine degli Imenotteri (*Tabella 10*).

**Tabella 10.** Famiglie di Imenotteri attribuite a ciascun campione sequenziato.

<b>Encyrtidae</b>	<b>Ichneumonidae</b>	<b>Pteromalidae</b>	<b>Eulophidae</b>	<b>Heloridae</b>
A2	F2	I1	EG1	M11
B2	M1	I2	EH3	
	EG3	I3		
	EH2	L1		
	EH12-2	L2		
	EL3	L3		
	EN10			

#### 4.2.1. Fam. Ichneumonidae

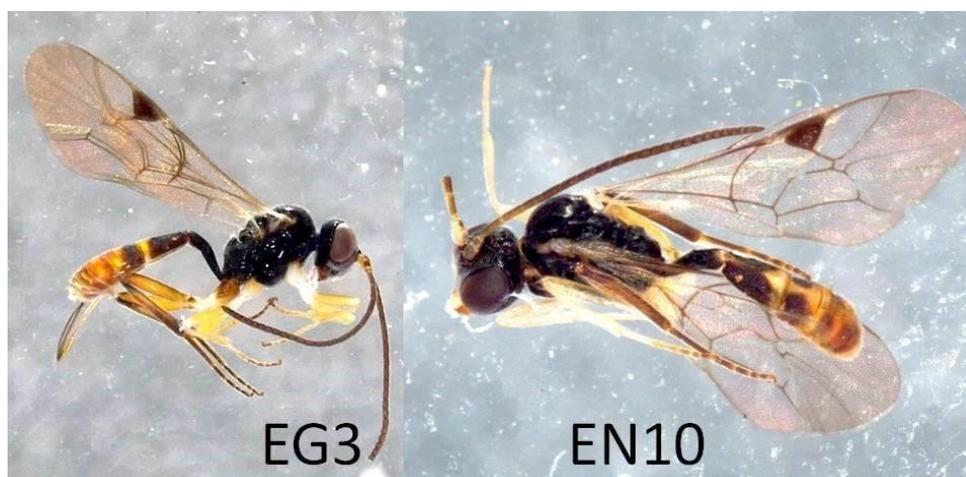
##### **Gen. *Bathythrix***

Gli esemplari appartenenti a questa famiglia sono risultati sette, dei diciotto sequenziati, ed erano tutti stati precedentemente identificati come tali anche con le chiavi dicotomiche. Le banche dati sono state in grado di fornirci risposte più che accettabili per la maggior parte dei campioni, spesso raggiungendo percentuali del 100%.

Su un totale di 14 esemplari identificati morfologicamente come appartenenti alla famiglia degli Ichneumonidae, esaminati nel 2019, gli individui EG3 e EN10, risultano gli unici 2 individui morfologicamente simili.

Questi ultimi sono stati identificati come *Bathythrix thomsoni* (Kerrich, 1942) (Figura 28). Questi due esemplari sono sfarfallati da bozzoli di *N. typhlocybae* raccolti rispettivamente nelle date: 27/07/2018 e 26/07/2018 in località Arzergrande. L'elevata percentuale di identità (99,46 e 98,42 rispettivamente per il campione EN10 e il campione EG3) e la descrizione della specie rende piuttosto certa l'identificazione. La specie è riportata nella checklist della fauna italiana per il nord Italia. Il genere *Bathythrix* è costituito da decine di specie presenti in quasi tutto il mondo, in particolare nell'emisfero settentrionale (Sawoniewicz, 1980). Poco è noto sulla biologia e sugli

ospiti di questa specie. E' noto come iperparassita, che attacca vari bozzoli. È stato ottenuto da bozzoli di *Gasparina* spp., *Diadegma armillata*, *Apanteles* sp. (Ichneumonidae, Hymenoptera), di *Yponomeuta padella* (L.) (Yponomeutidae, Lepidoptera), spp., di *Choristoneura murinana* (Hubn.) (Tortricidae, Lepidoptera); è probabile che sia anche un parassita primario poiché è stato ottenuto da pupe di *Coleophora* sp. (Coleophoridae) e *Caloptilia* sp. (Gracillariidae, Lepidoptera) e dai bozzoli di *Diprion* sp. (Sawoniewicz, 1980). È questa la prima segnalazione su bozzoli di *Neodryinus typhlocybae*.

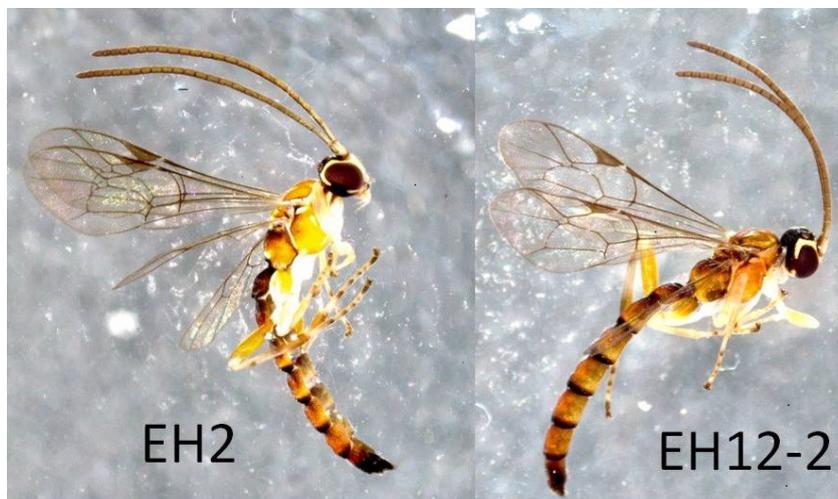


**Figura 283.** *Bathythrix thomsoni* (Fam. Ichneumonidae).

### **Gen. *Tromatobia***

Gli esemplari EH2 e EH12-2 sono stati identificati come *Tromatobia lineatoria* (Figura 29) . Il genere *Tromatobia* Förster, 1869 è un genere relativamente piccolo, che comprende 33 specie in tutto il mondo. La maggior parte delle specie di questo gruppo sono endoparassitoidi di uova di lepidotteri o di ragni mentre altre specie sono parassitoidi di Coleotteri e Imenotteri (Song et al., 2017). anche se con percentuali di identità piuttosto basse, sia in NCBI che in Bold System, soprattutto per l'esemplare EH12-2 (82,22%) rispetto ad EH2 (97,4%). Questo risultato rende l'identificazione poco affidabile e necessita approfondimenti sia di tipo molecolare che morfologico. Inoltre, mentre il genere *Tromatobia* risulta segnalato per l'Italia con tre specie (*T. oculatoria*, *T. ornata*, *T. ovivora*) la specie *lineatoria* sarebbe non nota per l'Italia.

Questi due esemplari sono sfarfallati da bozzoli di *N. typhlocybae* raccolti in località Arzergrande in data 27/07/2018 (EG3) e 26/07/2018 (EN10).



**Figura 29.** *Tromatobia lineatoria* (Fam. Ichneumonidae).

### **Gen. *Gelis***

Il genere *Gelis* è un genere molto vasto con oltre 270 specie descritte (di cui oltre 65 in Italia) e la stragrande maggioranza delle specie sono sia ectoparassitoidi solitari che di bozzoli di insetti olometaboli.

L'esemplare EL3 è stato identificato come *Gelis areator* (Panzer) (identità = 100% raggiunta in entrambe le banche dati utilizzate) (Figura 30).

L'esemplare F2, identificato morfologicamente come *G. areator*, è risultato invece avere maggiore identità in Bold System con *G. liparae* (99,64%) (Figura 31).

Questi due esemplari sono sfarfallati da bozzoli di *N. typhlocybae* raccolti:

- EL3 in data 26/10/2018 in località Arzergrande,
- F2 in data 20/10/2022 nel sito denominato Via San Giacomo.

La specie *G. areator* è già stata più volte segnalata su *N. typhlocybae* (Olmi, 2000) mentre l'identificazione di *G. liparae* richiede maggiori approfondimenti. La specie non è presente nella Check list della fauna italiana, tuttavia, è presente *G. ilicicolator* Aubert con il quale è messo in sinonimia da Schwarz e Shaw (1999). È evidente che sono necessari approfondimenti successivi.

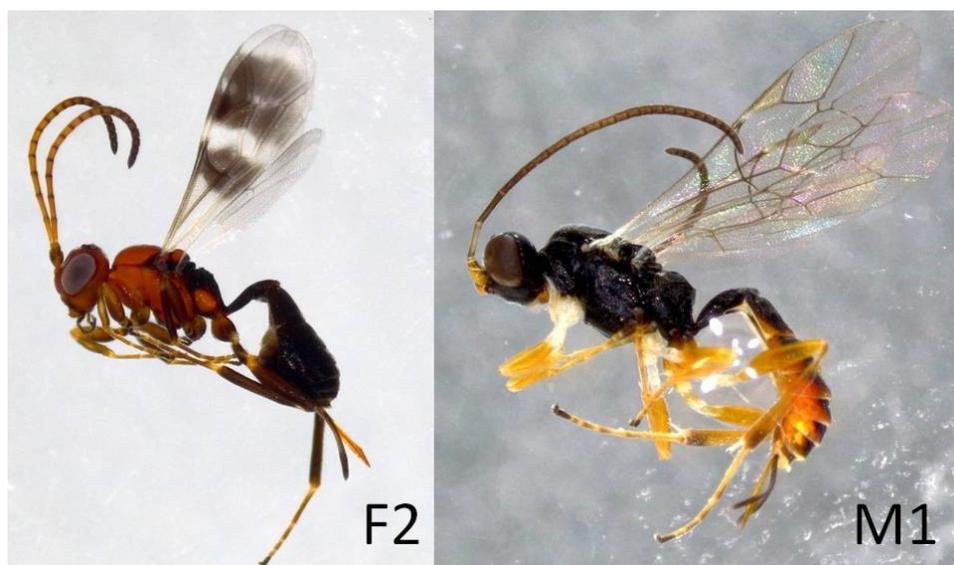


**Figura 30.** *Gelis areator* (Fam. Ichneumonidae).

### **Gen. *Diaglyptidea***

L'individuo M1 è stato identificato come *Diaglyptidea conformis* (Gmelin) con una identità uguale al 100% in Bold System (*Figura 31*). È l'unica specie di questo genere presente nella check list italiana. La biologia della specie è poco nota e ci sono segnalazioni di ospiti costituiti da microlepidotteri (Watanabe, 2021). Questo esemplare è sfarfallato da bozzoli di *N. typhlocybae* raccolti in data 09/08/2022 in località Trebaseleghe.

Se l'identificazione viene confermata si tratta della prima segnalazione su *N. typhlocybae*.



**Figura 31.** F2 *Gelis liparae* e M1 *Diaglyptidea conformis* (Fam. Ichneumonidae).

#### 4.2.2. Fam. Pteromalidae

##### Gen. *Pachyneuron*

Tutti i sei esemplari esaminati e sequenziati appartengono alla specie *Pachyneuron muscarum*. Si tratta di una specie cosmopolita nota come parassitoide o iper parassitoide di Ditteri e Coccoidei (Viggiani et al., 2002). I campioni sequenziati provengono tutti dai campioni raccolti nel 2022 e già precedentemente identificati morfologicamente come appartenenti a tale specie (Figura 32). *P. muscarum* è tra i più frequenti e abbondanti iperparassitoidi di *N. typhlocybae* (Viggiani et al., 2002).

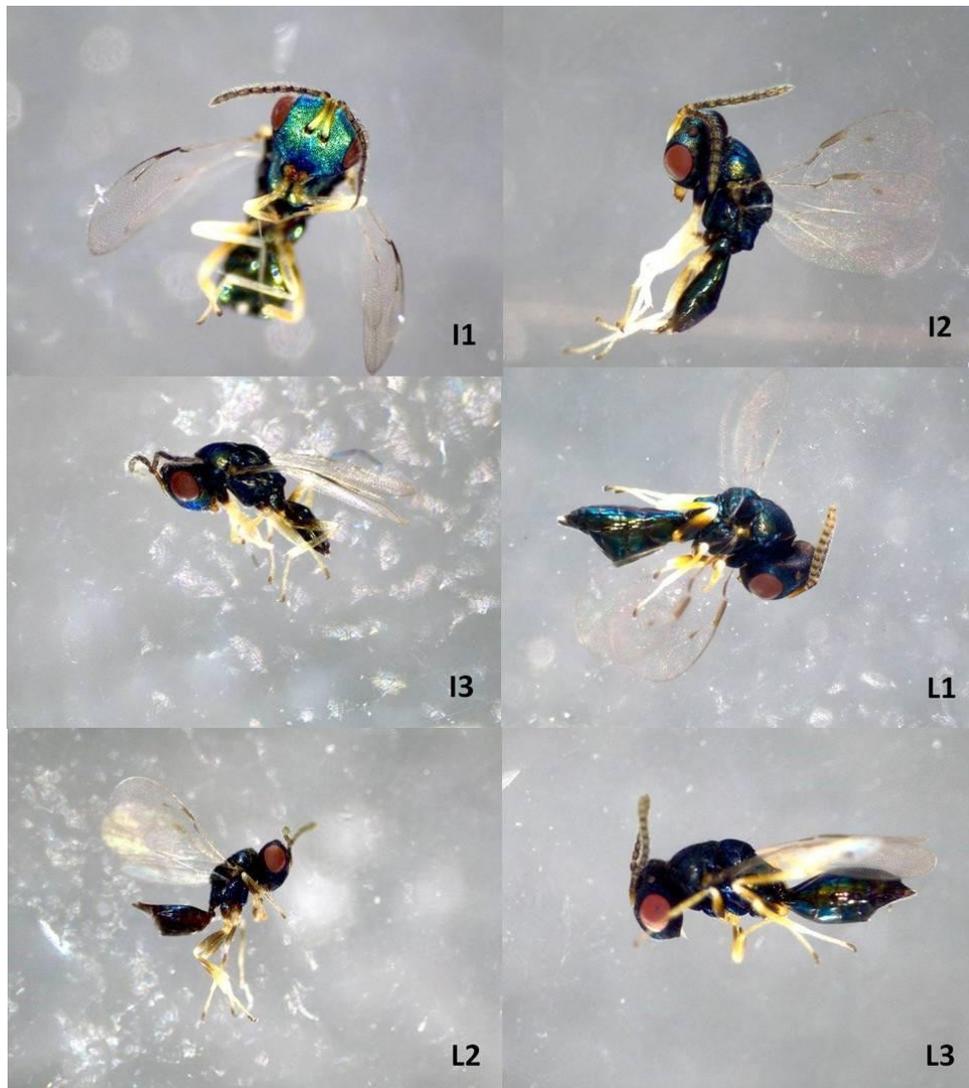


Figura 32. *P. muscarum*, maschio I1, I2 e I3, femmina L1, L2 e L3 .

### 4.2.3. Fam. Eulophidae

#### Gen. *Minotetrastichus*

Sono stati selezionati e sequenziati due esemplari provenienti dai campioni di *E. Morocutti* (EG1 e EH3) ed identificati come *Minotetrastichus frontalis* con percentuali superiori al 99% in Bold System (Figura 33). Questi esemplari sono sfarfallati da bozzoli di *N. typhlocybae* raccolti in località Arzergrande: EG1 in data 27/07/2018 mentre EH3 in data 24/27/2018. Per questo genere nella check list della fauna italiana sono riportate tre specie ma non è presente la specie *frontalis*. La specie è nota come parassitoide di minatori fogliari (Gokhman et al., 2014). Per questa famiglia era segnalato su *N. typhlocybae* il genere *Aprostocetus* sp. non rinvenuto nel corso di questa indagine (Viggiani et al., 2002).



Figura 33. *Minotetrastichus frontalis*.

### 4.2.4. Fam. Heloridae

#### Gen. *Helorus*

È una piccola famiglia, rappresentata solo dal genere *Helorus*, con 13 specie descritte di cui solo 4 in Europa e note per essere parassitoidi di Crysopidae (Neuroptera) (Soon e Tarlap, 2018).

E' stato sequenziato un unico individuo (M11) proveniente dal presente lavoro. Questo esemplare è sfarfallato da bozzoli di *N. typhlocybae* raccolti in data 09/08/2022 in

località Trebaseleghe L'esemplare è stato identificato come *Helorus ruficornis* (Figura 37) con percentuali di identità prossime al 100% (99,26). La specie è segnalata per tutta Italia ma il presente è il primo ritrovamento su *N. typhlocybae*. (Figura 34).



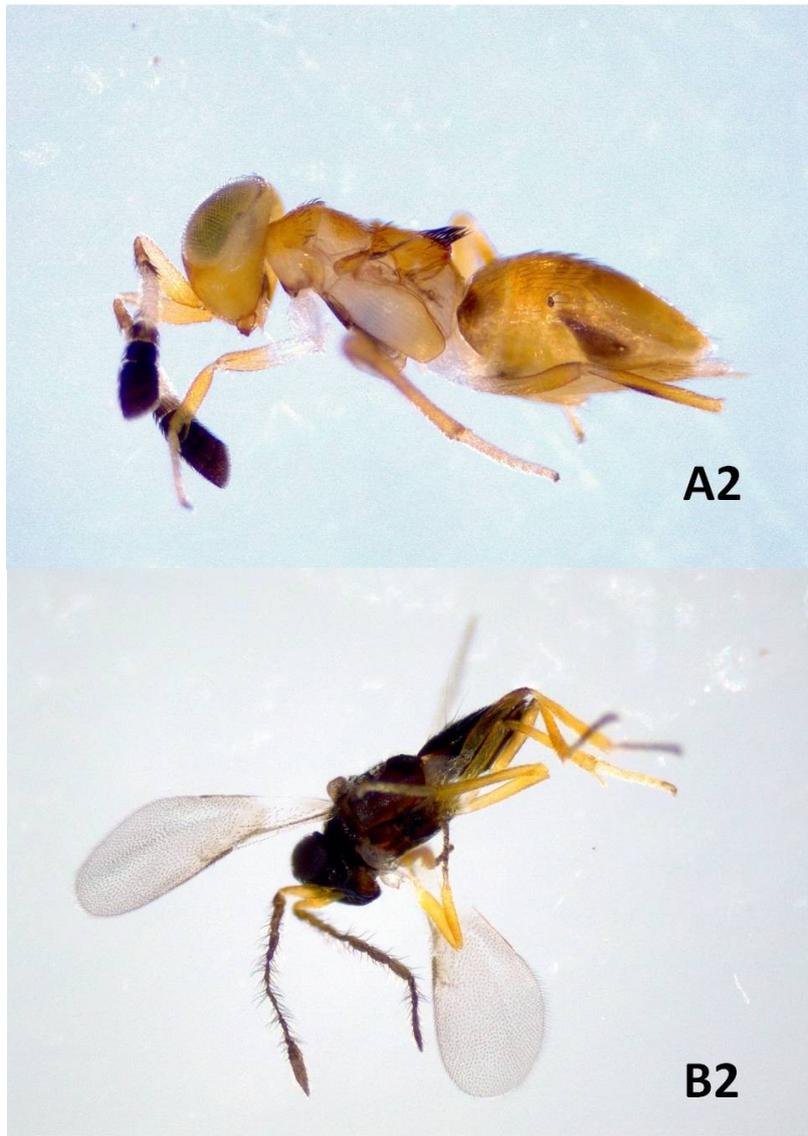
*Figura 34. Helorus ruficornis.*

#### **4.2.5. Fam. Encirtydae**

##### **Gen. Cheiloneurus**

Su bozzoli di *N. typhlocybae* sono note due specie appartenenti a questa famiglia: *Cheiloneurus swezeyi* Ashmead e *C. boldyrevi* T. & A.. *C. swezeyi* è una specie nearctica, nota come uno dei più importanti iperparassitoidi del driinide nella patria d'origine mentre *C. boldyrevi* (specie paleartica) è stato più volte segnalato come iperparassitoide nelle aree di liberazione del driinide ed è considerato uno degli iperparassitoidi più comuni (Olmi, 2000; Viggiani et al., 2002). I due esemplari di Encirtidi sequenziati (A2 e B2) non hanno portato ad un'identificazione precisa in quanto le percentuali di identità sono risultate basse. La specie più vicina geneticamente ai nostri campioni è data da *C. boldyrevi* ma le basse percentuali di identità emerse lasciano molti dubbi sulla bontà della identificazione. Va sottolineato che in nessun database sono presenti sequenze di *C. swezeyi*. Gli esemplari A2 e B2 erano stati precedentemente identificati come femmina e maschio di *Cheiloneurus* sp., già in precedenza con le chiavi dicotomiche senza tuttavia arrivare a livello di specie (Figura 35).

Ci siamo fatti inviare alcuni esemplari di *C. boldyrevi* (secchi da collezione) dal Prof. Olmi (Università della Tuscia di Viterbo) esperto di drinidi, sfarfallati da *N. typhlocybae* al fine di tentarne il sequenziamento dello stesso frammento per poterlo poi confrontare con i *Cheiloneurus* in nostro possesso. Come si vede da Figura 36 non vi è corrispondenza tra i nostri *Cheiloneurus* e *C. boldyrevi* (come peraltro emerso già da Bold System (Figura 37). Purtroppo, non siamo riusciti ad avere sequenze di *C. swezeyi* né esemplari freschi da poter sequenziare per cui non è possibile, allo stato attuale, escludere che i nostri esemplari possano coincidere con la specie neartica. L'accidentale introduzione di questo iperparassitoide potrebbe rappresentare un fattore molto negativo per le popolazioni di *N. typhlocybae* e di conseguenza per l'efficacia dell'azione di controllo nei confronti di *M. pruinosa*.



*Figura 35. Cheiloneurus sp.: femmina (A2) e maschio (B2).*

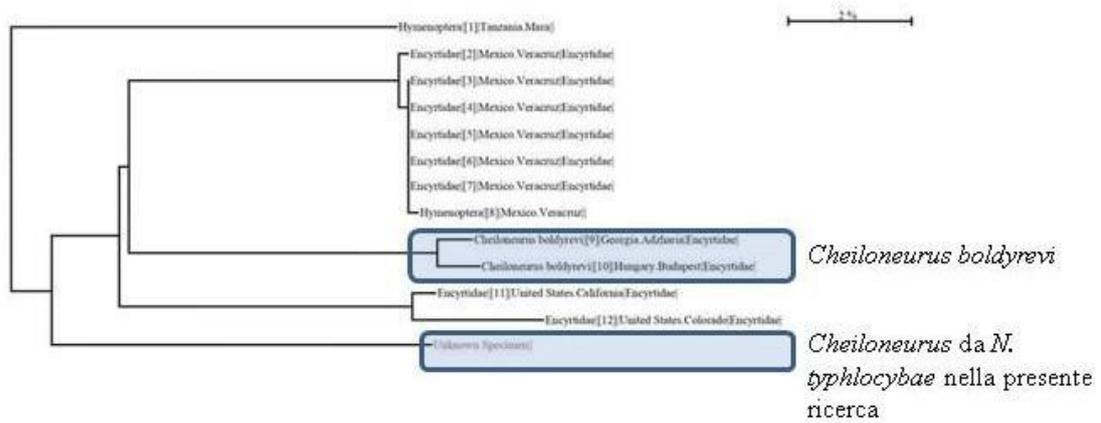
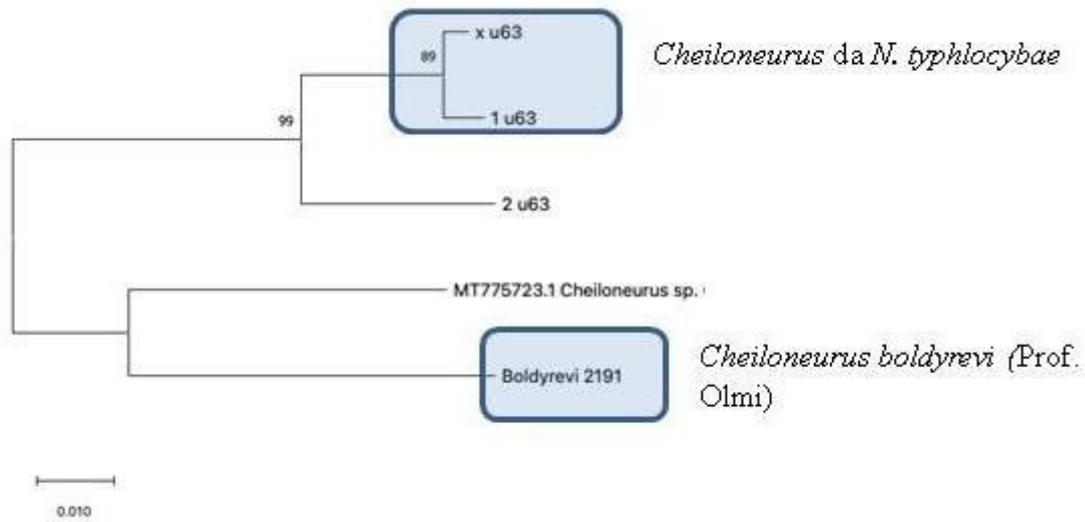


Figura 37. Albero filogenetico ottenuto dai dati di BOLD System.



## 5. Conclusioni

Il presente studio ha voluto indagare l'incidenza dei principali iperparassitoidi autoctoni, presenti nel territorio della provincia di Padova e Venezia, come possibili responsabili delle pullulazioni da parte di *M. pruinosa* che si riscontrano negli ultimi anni in Italia, incidendo sul ciclo vitale del suo parassitoide specifico *N. typhlocybae*.

In seguito all'introduzione, iniziata nel 1987 nell'ambito di programmi di ricerca dell'Università di Padova (Girolami e Camporese, 1984), dal Nord America del driinide *N. typhlocybae* per il controllo biologico di *M. pruinosa*, il parassitoide si è naturalizzato con successo, espandendosi naturalmente (aiutato anche dai lanci effettuati da numerosi enti di ricerca) in gran parte dell'Europa. La diffusione della specie nei nuovi areali ha offerto a un complesso di nemici naturali (soprattutto imenotteri parassitoidi) un nuovo ospite su cui adattarsi.

Dai dati elaborati per questa sperimentazione, su un totale di 3460 bozzoli raccolti durante la stagione estiva e autunnale del 2022, si è stati in grado di valutare l'incidenza degli antagonisti naturali; la predazione, ad opera delle diverse specie (uccelli insettivori, insetti e micromammiferi), ha riportato complessivamente una percentuale del 21% sul totale dei bozzoli raccolti, mentre l'iperparassitizzazione ha coinvolto in alcuni siti oltre il 60%, con una media del 36%. Risulta evidente come nel tempo le percentuali di bozzoli di driinide iperparassitizzati e predati presenti in natura (soprattutto a fine estate) siano andate velocemente aumentando, intaccando conseguentemente la quota di bozzoli diapausanti e destinati a svernare. Considerando la forte incidenza dell'iperparassitismo, risulta evidente come la pressione così elevata di questi antagonisti possa avere, in determinati casi, ripercussioni sul contingente di driinidi che nella primavera successiva potranno sfarfallare e quindi avere un impatto sul controllo delle popolazioni di *M. pruinosa*.

In particolare, *Pachineurum muscarum* (Pteromalidae), specie già nota come uno dei principali iperparassitoidi del driinide (Viggiani et al., 2002), è risultata in questa ricerca la specie maggiormente impattante, con una percentuale superiore al 95% sul totale degli iperparassitoidi sfarfallati durante la sperimentazione, risultando sempre presente nei diversi siti di raccolta e in alcuni casi l'unica specie sfarfallata.

Poco rassicurante per le popolazioni di *N. typhlocybae* è inoltre il ritrovamento di un ulteriore *Cheiloneurus* che non coincide con il già noto paleartico *C. boldyrevi*, ma che si sospetta possa corrispondere con l'iperparassitoide che maggiormente stressa le popolazioni del driinide nella sua patria d'origine, *C. swezeyi*. La specie è sempre stata di temuta introduzione in Europa, tanto che nelle prime raccolte di bozzoli di *N. typhlocybae* negli USA, questi venivano fatti sfarfallare in apposite gabbie prima di essere liberati in natura (Girolami, com. pers.). I dati raccolti meritano quindi attenti approfondimenti.

In conclusione, il presente elaborato conferma l'ipotesi di partenza sull'importanza degli iperparassitoidi, risultando uno dei fattori limitanti del driinide, essendo in grado di ridurre le popolazioni così da favorire la recrudescenza di *M. pruinosa*. I risultati, inoltre, evidenziano come sui bozzoli di *N. typhlocybae* sia in grado di adattarsi un'importante range di iperparassitoidi. Alcuni di questi sono da ritenersi occasionali e poco incidenti, tuttavia la facilità con cui si possono raccogliere in natura bozzoli del driinide offre una rilevante opportunità per indagare sulla diffusione e sulla tassonomia di questi parassitoidi.

L'elaborato, da ultimo, mette a disposizione un catalogo fotografico di diverse specie di iperparassitoidi di *N. typhlocybae*, facilitando i possibili futuri lavori nell'identificazione morfologica degli stessi.



## 6. Bibliografia

- Achterberg Cees van, Zwakhals K. Fauna Europaea: Ichneumonoidea. <http://www.faunaeur.org/> 2004 2.4.
- Bagnoli, B., & Lucchi, A. (2000). Dannosità e misure di controllo integrato. In *La Metcalfa negli ecosistemi italiani* (pp. 65-88). Arsia Toscana.
- Bezant, E. T. (1956). *Gelis micrurus* Forster (Hymenoptera: Ichneumonidae) parasitising a lycosid spider egg sac. *Ent. Mon. Mag.*, 92, 106.
- Byeon, D., Jung, J.-M., Jung, & S. e Lee, W.-H. (2018). Previsione della distribuzione geografica globale di *Metcalfa pruinosa* utilizzando CLIMEX. *Ricerca entomologica*, 48 : 99 – 107 . doi: [10.1111/1748-5967.12253](https://doi.org/10.1111/1748-5967.12253) .
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8), 1767-1780.
- Cameron, S. L. (2014). Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 59, 95-117.
- Cenderello K. (2006). *Studio del rapporto fra Metcalfa pruinosa (Say) e Neodryinus typhlocybae (Ashmead) mediante utilizzo di geostatistica e GIS*. Tesi di laurea, Facoltà di agraria, Università di Pisa, anno accademico 2005-2006.
- Di Giovanni, F., Cerretti, P., Mason, F., Minari, E., & Marini, L. (2015). Vertical stratification of ichneumonid wasp communities: the effects of forest structure and life-history traits. *Insect Science*, 22(5), 688-699.
- Donati, I., Mauri, S., Buriani, G., Cellini, A., & Spinelli, F. (2017). Role of *Metcalfa pruinosa* as a vector for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *The Plant Pathology Journal*, 33(6), 554.
- Duso, C., & Pavan, F. (1988). The occurrence of *Metcalfa pruinosa* (Say) in Italy. In *Proceeding 6th Auchenorrhyncha Meeting* (pp. 545-552).
- Duso, C., Mori, N., Pozzebon, A., Marchesini, E., & Girolami, V. (2010). Problemi, tendenze e innovazioni nel controllo degli artropodi dannosi alla vite. II. Vettori di fitoplasmii, cocciniglie, minatori fogliari, tripidi e acari. *PROTEZIONE DELLE COLTURE*, 4, 16-26.
- Dzhanokmen, K. A. (2009). Review of Kazakhstan species of the genus *Pachyneuron* Walker, 1833 (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae). *Zoosystematica Rossica*, 18(1), 73-82.

EPPO, 2023. EPPO Global Database (disponibile online). <https://gd.eppo.int> .

Favaro, R., Roved, J., Girolami, V., Martinez-Sañudo, I., & Mazzon, L. (2018). Host instar influence on offspring sex ratio and female preference of *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead)(Hymenoptera, Dryinidae) parasitoid of *Metcalfa pruinosa* (Say)(Homoptera, Flatidae). *Biological Control*, 125, 113-120.

Frilli, F., Villani, A., & Zandigiaco, P. (2001). *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead) antagonista di *Metcalfa pruinosa* (Say). Risultati di liberazioni pluriennali effettuate in Friuli-Venezia Giulia. *Entomologica*, 35, 27-38.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.

Girolami, V., & Camporese, P. (1994, June). Prima moltiplicazione in Europa di *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead)(Hymenoptera: Dryinidae) su *Metcalfa pruinosa* (Say)(Homoptera: Flatidae). In *Atti del XVII Congresso nazionale italiano di Entomologia, Udine* (pp. 13-18).

Girolami, V., & Conte, L. (1999). Possibilità di controllo chimico e biologico di *Metcalfa pruinosa*. *Informatore fitopatologico*, 49, 20-25.

Girolami, V., & Mazzon, L. (1999). Controllo di *Metcalfa pruinosa* ad opera di *Neodryinus typhlocybae*. *Informatore Agrario*, 55, 87-91.

Girolami, V. (1999). *Neodryinus typhlocybae*: introduzione, diffusione e comportamento. *Atti del Convegno "Metcalfa pruinosa: diffusione nel continente europeo e prospettive di controllo biologico," S. Donato Milanese (MI)*, 21, 10-99.

Girolami, V., & Mazzon, L. (2001). Esperienze di lotta biologica e integrata a *Metcalfa pruinosa* con *Neodryinus typhlocybae* in Italia. *ATTI DELL'ACCADEMIA NAZIONALE ITALIANA DI ENTOMOLOGIA. RENDICONTI*, 165-184.

Gokhman, V. E., Yefremova, Z. A., & Yegorenkova, E. N. (2014). Karyotypes of parasitic wasps of the family Eulophidae (Hymenoptera) attacking leaf-mining Lepidoptera (Gracillariidae, Gelechiidae). *Comparative Cytogenetics*, 8(1), 31.

Guerrieri, E., & Viggiani, G. (2005). A review of the encyrtid (Hymenoptera: Chalcidoidea) parasitoids of Dryinidae (Hymenoptera: Chrysidoidea) with description of a new species of *Cheiloneurus*. *Systematics and Biodiversity*, 2(3), 305-317.

Harvey, J. A. (2008). Comparing and contrasting development and reproductive strategies in the pupal hyperparasitoids *Lysibia nana* and *Gelis agilis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Evolutionary Ecology*, 22, 153-166.

- Harvey, J. A., Gols, R., Snaas, H., Malcicka, M., & Visser, B. (2015). Host preference and offspring performance are linked in three congeneric hyperparasitoid species. *Ecological Entomology*, 40(2), 114-122.
- Jinbo, U., Kato, T., & Ito, M. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 14(2), 107-124.
- Koichiro Tamura and others, MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, Molecular Biology and Evolution, Volume 38, Issue 7, July 2021, Pages 3022–3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Lucchi, A., & Santini, L. (1993). Note morfo-biologiche sugli stadi preimmaginali di *Metcalfa pruinosa* (Say)(Homoptera, Flatidae). *Frustula Entomologica*, 16, 175-185.
- Malausa J.C. (2000). Esperienze di introduzione di *Neodryinus typhlocybae* in Francia. Atti Convegno su “*Metcalfa pruinosa*: diffusione nel continente europeo e prospettive di controllo biologico”, S. Donato Milanese 21 ottobre 1999, *Sherwood* 55 (Suppl.), pp. 18- 20.
- Mazzon, L., & Girolami, V. (2002). *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead): comportamento ed impiego in difesa biologica. *Informatore fitopatologico*, 7-8: 27-31.
- Mazzon, L., & Martini, S. (2001). Una soluzione biologica al problema *Metcalfa pruinosa*. *IGIENE ALIMENTI. DISINFESTAZIONE & IGIENE AMBIENTALE*, 2, 13-16.
- Miller KB , Alarie Y , Wolfe GW , Whiting MF ( 2005 ) Associazione delle fasi di vita degli insetti utilizzando sequenze di DNA: le larve di *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae) . *Entomologia sistematica* **30** , 499 – 509 .
- Morocutti, E. (2019 ) INDAGINE SUGLI IPERPARASSITOIDI AUTOCTONI DI *NEODRYINUS TYPHLOCYBAE* (ASHMEAD) ANTAGONISTA DI *METCALFA PRUINOSA* (SAY). Tesi di laurea, Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli studi di Padova, anno accademico 2018-2019.
- Olmi, M. (1999). Hymenoptera Dryinidae–Embolemidae. *Fauna d'Italia*, 37.
- Olmi, M. (2000). Bio-ecologia degli Imenotteri Driinidi e loro impiego in programmi di lotta biologica. *La Metcalfa negli ecosistemi italiani*. *ARSIA, Firenze*, 93-117.
- Ratnasingham, S. H., Herbert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode Of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*, 7: 355-364.
- Roberti, D. (1980). OCHROMOLOPIS (EPERMENIA) STANTONELLA STANTON {LEP. EPERMENIIDAE) NUOVO OSPITE DI BRACONIDI PARASSITI DI PRAYS. *Entomologica*, 16, 41-45.

- Rossi, L. (1995). *Dinamica di popolazione e controllo biologico di Metcalfa pruinosa (Say) in Friuli*. Tesi di laurea, Istituto di difesa delle piante dell'Università di Udine, anno accademico 1994-95.
- Santini, L., & Lucchi, A. (1994). Su alcuni aspetti morfologici e biologici della riproduzione in *Metcalfa pruinosa* (Say)(Homoptera, Flatidae). *Frustula Entomologica*, 186-198.
- Sawoniewicz, J. (1980). Revision of European species of the genus *Bathythrix* FOERSTER (Hymenoptera, Ichneumonidae). In *Annales Zoologici* (Vol. 35, No. 23, pp. 319-366). Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. of the Entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Smith MA , Rodriguez JJ , Whitfield JB *et al.* ( 2008 ) Estrema diversità di vespe parassitoidi tropicali esposte dall'integrazione iterativa di storia naturale, codici a barre del DNA, morfologia e collezioni . *Atti dell'Accademia Nazionale delle Scienze degli Stati Uniti d'America* **105** , 12359 – 12364 .
- Smith MA , Wood DM , Janzen DH , Hallwachs W , Hebert PDN ( 2007 ) I codici a barre del DNA affermano che 16 specie di mosche parassitoidi tropicali apparentemente generaliste (Diptera, Tachinidae) non sono tutte generaliste . *Atti della National Academy of Sciences degli Stati Uniti d'America* **104** , 4967 – 4972 .
- Smith MA , Woodley NE , Janzen DH , Hallwachs W , Hebert PDN ( 2006 ) I codici a barre del DNA rivelano una criptica specificità dell'ospite all'interno dei presunti membri polifagi di un genere di mosche parassitoidi (Diptera: Tachinidae) . *Atti della National Academy of Sciences degli Stati Uniti d'America* **103** , 3657 – 3662 .
- Song, G. M., & Lee, J. W. (2017). Review of the genera *Scambus* and *Tromatobia* (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) from South Korea. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 33(3), 145-161.
- Soon, V., & Tarlap, P. (2018). First records of the family Heloridae (Hymenoptera) from Estonia.
- Schwarz, M., & Shaw, M. R. (1999). Western Palaearctic Cryptinae (Hymenoptera: Ichneumonidae) in the National Museums of Scotland. *Entomologist's Gazette*, 50.
- Vetek, G., Koranyi, D., MEZŐFI, L., Bodor, J., Penzes, B., & Olmi, M. (2019). *Neodryinus typhlocybae*, a biological control agent of *Metcalfa pruinosa*, spreading in Hungary and reaching Slovakia. *Bulletin of Insectology*, 72(1).
- Viggiani, G., Alma, A., Foschi, S., Lucchi, A., & Mazzon, L. (2002). Parassitoidi di *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead)(Hymenoptera: Dryinidae) in

Italia. *BOLLETTINO DEL LABORATORIO DI ENTOMOLOGIA AGRARIA FILIPPO SILVESTRI*, 58, 101-105.

- Villani, A., & Zandigiaco, P. (1999). Immissioni in Friuli-Venezia Giulia dell'entomofago *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead), antagonista naturale di *Metcalfa pruinosa* (Say).
- Villani, A., & Zandigiaco, P. (2000). Successo delle immissioni dell'entomofago *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead) contro *Metcalfa pruinosa* (Say) in Friuli-Venezia Giulia.
- Visser, B., Le Lann, C., Snaas, H., Hardy, I. C., & Harvey, J. A. (2014). Consequences of resource competition for sex allocation and discriminative behaviors in a hyperparasitoid wasp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68, 105-113.
- Watanabe, K. (2021). Taxonomic and zoogeographic study of the Japanese Phygadeuontinae (Hymenoptera, Ichneumonidae), with descriptions of 17 new species. *Bulletin of the Kanagawa Prefectural Museum (Natural Science)*, 2021(50), 55-136.
- Yefremova, Z. A., & Mishchenko, A. V. (2008). The parasitoid complex (Hymenoptera, Eulophidae) of the leafminer *Phyllonorycter issikii* (Kumata)(Lepidoptera, Gracillariidae) from the Middle Volga Basin. *Entomological Review*, 88, 178-185.
- Yu D. S., Achterberg C. van, Horstmann K. Taxapad 2012, Ichneumonoidea 2011. Database on flash-drive. Ottawa, Ontario, Canada. [www.taxapad.com](http://www.taxapad.com) 2012
- Zangheri, S., & Donadini, P. (1980). Comparsa nel Veneto di un omottero neartico: *Metcalfa pruinosa* Say (Homoptera, Flatidae).
- Zapponi, L., Mazzoni, V., Stacconi, R., & Anfora, G. (2021). *Lotta biologica alla cimice asiatica: azione ed interazioni tra antagonisti esotici ed autoctoni* (Vol. 8, No. 8). Fondazione Edmund Mach.

# 8. Appendice

**Tabella 11. A)** Iperassitoidi sequenziati B) studio dei bozzoli di *N. typhlocybae* C) sfarfallamenti delle diverse specie dai bozzoli sani raccolti durante la sperimentazione.

Esempi del presente studio (2022)				Esempi Moccanti Elena Terzi (2019)			
Sto	Data Campionamento	Data Estrazione	codice ID	Morfologia	Bozzolium	Identificazione	NCBY
Airno	25/07/2022	29/07/2022	A2	Cheloneurus sp. F	82,62 %	Cheloneurus sp. F	81,37 %
Agripolis	29/08/2022	09/09/2022	B2	Cheloneurus sp. M	84,07 %	Cheloneurus sp. M	83,07 %
Via San Giacomo	20/10/2022	08/11/2022	I2	Gelis areator	99,64 %	Gelis areator	91,34 %
Airno	12/08/2022	25/10/2022	I1	Pachyneuron muscarum	98,31 %	Pachyneuron muscarum	97,3 %
Azergrande	20/07/2022	31/07/2022	I2	Pachyneuron muscarum	98,31 %	Pachyneuron muscarum	97,3 %
Villa Draighi	24/07/2022	29/09/2022	I3	Pachyneuron muscarum	97,66 %	Pachyneuron muscarum	91,43 %
Azergrande	20/07/2022	31/07/2022	I1	Pachyneuron muscarum	98,72 %	Pachyneuron muscarum	96,54 %
Cava Monte	13/09/2022	20/09/2022	I2	Pachyneuron muscarum	98,33 %	Pachyneuron muscarum	97,28 %
Villa Draighi	24/08/2022	29/08/2022	I3	Pachyneuron muscarum	98,53 %	Pachyneuron muscarum	97,45 %
Trebasdeglie	09/08/2022	18/08/2022	M1	Iceanionide	100 %	Dialgryphide conformis	93,69 %
Trebasdeglie	09/08/2022	29/08/2022	M11	NI	99,88 %	Habrona ruficornis	99,63 %

**A**

Luogo e data di campionamento	N. Foglie	Tot. Bozzoli	Bozzoli con fori d'uscita e/o rotti		Bozzoli Sani	
			N. typhlocybae	Iceanionide	N. typhlocybae	Iceanionide
Azergrande 20/07/22	588	677	21	16	53	18
Azergrande 25/07/22	307	359	21	26	68	17
Airno 31/07/22	457	482	28	13	68	16
Trebasdeglie 09/08/22	146	182	15	24	46	2
Airno 12/08/22	132	177	32	23	78	1
Villa Draighi 24/08/22	178	246	61	47	178	0
Agripolis 29/08/22	111	155	52	44	121	0
Cava Monte 13/09/22	74	138	26	21	74	0
Parco Iris 14/09/22	216	227	28	44	122	194
Azergrande 20/09/22	216	324	53	61	160	0
Agripolis 06/10/22	165	269	61	63	122	246
Via San Giacomo 20/10/2022	137	224	66	43	95	204
Totale	2633	3460	464	439	1649	56
Media	219,41667	288,3333333	38,66666667	62,166667	137,4	4,66666667
Dev. st.	155,75999	156,3738721	18,45058922	15,85994574	52,547525	79,29
Errore St.	44,964036	45,14124858	5,326226325	4,57837197	15,169164	22,89

**B**

