

## Scheda tecnica

Confusione sessuale attraverso segnale vibrazionale

Un nuovo metodo per il controllo di *Scaphoideus titanus*



Lavoro realizzato in comune dagli agenti facilitatori del progetto Winetwork. I dati riportati risultano dalla pratica attraverso l'aiuto di 219 interviste e da una revisione della letteratura scientifica. Si ringrazia il dottor Valerio Mazzoni che ha partecipato allo sviluppo di questa scheda tecnica.

## Nota introduttiva

Durante il progetto WINETWORK, gli agenti facilitatori (FA) nelle 10 regioni vinicole europee coinvolte nel progetto hanno condotto 219 interviste. I FA hanno identificato diverse pratiche per combattere il fitoplasma della flavescenza dorata e / o il suo vettore, il cicadellidae *Scaphoideus titanus* Ball, uno dei quali è il disturbo dell'accoppiamento che utilizza segnali vibrazionali per influenzare il comportamento di *S. titanus*. Purtroppo questo metodo biotecnologico non è ancora disponibile per l'applicazione pratica da parte del viticoltore. Tuttavia, dato che si tratta di uno strumento innovativo e promettente, e c'è un forte interesse per i viticoltori e i tecnici per questa tecnica, il consorzio ha deciso di creare una scheda tecnica per farlo conoscere.

## Introduzione

*Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) è una cicalina, il principale vettore del fitoplasma che causa la Flavescenza dorata, la più severa minaccia tra i giallumi da fitoplasmi della viticoltura europea. A dispetto della sua importanza, vi sono ancora lati oscuri nella conoscenza della sua biologia e nel meccanismo di trasmissione della malattia. Con l'intento di trovare un'alternativa all'uso di insetticidi, normalmente utilizzati per abbattere le popolazioni dell'insetto, la nostra attenzione deve concentrarsi sul comportamento, ed in particolare per quanto riguarda l'accoppiamento. Il riconoscimento e la localizzazione del compagno negli Auchenorrhinchi sono mediati da segnali acustici, trasmessi attraverso un substrato. Si stima che 150 000 specie usino vibrazioni acustiche per ottenere l'accoppiamento e tra loro diversi insetti dannosi e vettori di malattie delle piante.



**Figure 1.** *S. titanus* Ball e sintomi di FD. (Fonte: Mazzoni *et al*, 2009.)

In Europa, La Flavescenza dorata è una malattia di quarantena e vi sono misure di lotta obbligatorie per il controllo delle popolazioni del vettore e per prevenire la diffusione dell'infezione, che includono l'uso di insetticidi su vasta scala, con un forte impatto sia economico che ambientale. Considerando che esiste un crescente interesse di mercato per i prodotti ottenuti senza l'uso della chimica di sintesi (da agricoltura biologica), e che le filiere commerciali impongono limiti sempre più forti alla presenza di residui di pesticidi negli alimenti, la Direttiva UE 128/2009, per l'uso sostenibile dei pesticidi, si muove nella direzione di trovare alternative alla lotta chimica e verso lo sviluppo di pratiche rispettose dell'ambiente.

**La confusione sessuale vibrazionale (VMD, vibrationale mating disrupting)** è un esempio di metodo innovativo, in quanto sfrutta vibrazioni simili a quelle emesse dagli insetti, sia per l'accoppiamento che per minaccia verso il rivale. La formazione di una coppia in *S. titanus* è caratterizzata da un duetto maschio-femmina che comincia con l'identificazione reciproca e continua con una fase di avvicinamento prima del corteggiamento finale che precede l'accoppiamento. Il duetto è caratterizzato da precise sequenze temporali, che cambiano durante le diverse fasi dell'accoppiamento. Nella fase di identificazione gli impulsi del maschio sono ritardati rispetto alle risposte della femmina, mentre sono completamente sincronizzati durante le fasi di avvicinamento e corteggiamento. Una ipotesi è che la VMD abbia maggiore successo se applicate durante la fase di riconoscimento quando le interferenze esterne possono provocare una perdita di informazioni importanti per identificare il partner.

Tuttavia, data la complessità del duetto di coppia, l'interferenza causata da VMD potrebbe influenzare tutte le fasi. **La chiave per prevenire l'accoppiamento di *S. titanus* è l'interruzione del segnale vibrazionale sessuale, attraverso l'emissione di un segnale di disturbo.**

## Metodologia e Applicazione

Le conoscenze attuali sul comportamento sessuale di *S. titanus* e e gli esperimenti di confusione vibrazionale (Mazzoni et al. 2009a; Eriksson et al., 2012; Polajnar et al., 2014) hanno suggerito che la riproduzione di un rumore di disturbo vibrazionale (VDN: rivalità) dovrebbe bastare a disturbare il comportamento di corteggiamento e impedire l'accoppiamento, rappresentando così un promettente percorso per sviluppare un approccio non chimico per il controllo di questo vettore invasivo in Europa.

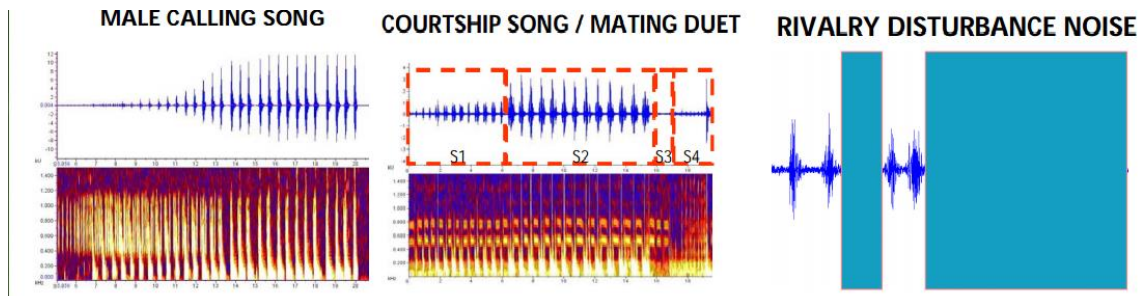
### Principio della confusione sessuale vibrazionale per *S. titanus*

Uno "shaker" elettromagnetico è stato utilizzato per far vibrare il filo con un segnale di maschio rivale, trasmettendo la vibrazione alla pianta. È stato possibile verificare la trasmissione di segnali di chiamata maschili su parti diverse della pianta, stabilendo lo spazio attivo dei segnali di accoppiamento per regolare la potenza dei segnali di disturbo dell'accoppiamento in efficaci segnali di mascheramento specifici per la specie (VDN) (Mazzoni et al., 2009b Polajnar et al., 2014).



**Figure 2.** Shaker disegnato per trasmettere segnali di disturbo a più lunga distanza (Fonte: Lucchi et. al)

I maschi richiamano l'altro sesso con uno specifico comportamento "chiama e vola" seguito da un canto di corteggiamento strutturato. Le femmine emettono segnali solo in risposta al maschio, mentre i maschi rivali entrano in competizione producendo un rumore di disturbo volto a interrompere il duetto delle coppie.



**Figure 3.** richiamo del maschio; canto di corteggiamento/duetto di accoppiamento Rumore di disturbo di *S. titanus* (Source: Mazzoni et. al, 2008)

## Dati scientifici e alcuni risultati

Dopo gli studi iniziali sul comportamento sessuale della specie, l'attenzione si è focalizzata sulla possibilità di disturbare l'accoppiamento attraverso l'emissione di segnali vibrazionali. L'efficacia dell'emissione, studiando la lunghezza d'onda appropriate, fu prima dimostrata in laboratorio, poi in condizioni seminaturali con gli insetti in una cassetta di contenimento, infine in un vigneto sperimentale. L'approccio era quello di acquisire una buona conoscenza della biologia riproduttiva basilare, che rivelò l'emissione di un rumore di disturbo naturalmente emesso dai maschi rivali (VDN) in grado di mascherare la struttura temporizzata dal richiamo maschile, in una interazione antagonista. L'uso del VDN ha un vantaggio rispetto alle onde dei toni puri generate sinteticamente, perché le sue caratteristiche si sono evolute per efficienza, pertanto le funzioni spettrali sono ottimali per questa funzione. Sebbene *S. titanus* sia una delle poche specie note per l'uso del disturbo acustico, in grado di mascherare i segnali vibrazionali per il riconoscimento del compagno, un meccanismo simile dovrebbe presentarsi anche in altre specie.

Mazzoni et. Al, nel 2009 hanno scoperto che la riproduzione di VDN ha ridotto il livello del richiamo maschile e ha interrotto il duetto maschio-femmina già stabilito, il che ha portato ad un numero significativamente ridotto di copulazioni. Questi risultati indicano che il canale di comunicazione vibrazionale è aperto a interferenze sia dal rumore ambientale abiotico che da

segnali prodotti da concorrenti sessuali o addirittura eterospecifiche. Lo studio suggerisce inoltre che una comprensione dettagliata del comportamento della cicalina sia essenziale per tentare nuovi approcci nello sviluppo di pratiche di controllo più rispettose dell'ambiente.

Eriksson et. Al (2012) hanno mostrato, per la prima volta, che un'interruzione efficace di accoppiamento basata su segnali vibrazionali di substrato può essere raggiunta in campo. Quando i segnali vibrazionali di disturbo venivano applicati alle piante di vite attraverso il filo di sostegno, la frequenza di accoppiamento dello *S. titanus* è scesa al 9% in condizioni di seminaturalità e al 4% in un vigneto maturo. Il meccanismo sottostante questa tecnica di controllo ecocompatibile è la mascheratura dei segnali vibrazionali utilizzati nel riconoscimento e nella localizzazione del compagno.

Nel 2012, Lucchi et. Al, in condizioni di campo aperto, hanno trovato differenze significative tra i trattamenti delle piante sottoposte o meno a vibrazione (C), riguardanti il numero delle femmine vergini, utilizzando un agitatore elettromagnetico per far vibrare il filo con segnale di disturbo.

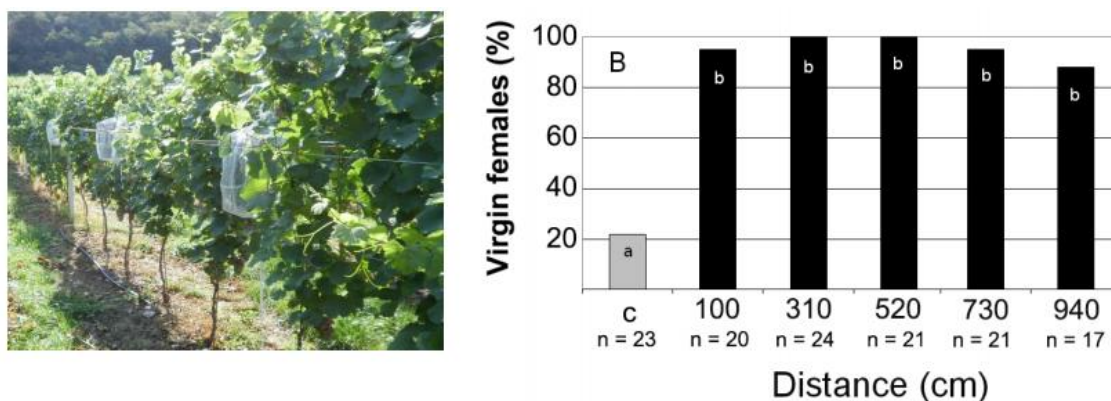


Figure 4. Numero di femmine vergini rinvenute su viti sottoposte a vibrazione o non sottoposte (C) in un vigneto in produzione, 2012 (Distance = distanza dal filare testimone (c)).

Nel 2013 gli stessi ricercatori hanno applicato la metodologia a distanze più lunghe. Hanno trovato che è ancora possibile raggiungere il 65% del disturbo di accoppiamento a 45 metri con 18 ore di agitazione. Il successo è nell'80% dei casi. I risultati indicano che il principio dell'interruzione di accoppiamento con segnali vibrazionali è applicabile anche a livello di campo, su piante mature. Il disturbo è stato efficace su più del 90% delle coppie testate quando sono state rispettate alcune condizioni. In particolare, si è visto che l'accoppiamento è quasi totalmente impedito quando il dispositivo funziona per periodi di oltre 19 ore. Si sono infatti rilevate importanti perdite e dispersione del segnale, a causa di numerosi punti di contatto tra i

fili vibranti, viti e pali. Questo limite deve essere eliminato o ridotto fortemente, ad esempio bypassando il segnale o utilizzando ammortizzatori in corrispondenza di tali punti critici.

Anche Polajnar et al. (2016) hanno pubblicato lavori sull'argomento. Basandosi su esperienze pubblicate in precedenza, è stato messo a punto un metodo di accoppiamento in laboratorio per determinare la soglia di ampiezza per una riproduzione efficiente e rivelare il meccanismo di funzionamento, mentre i test sul campo sono stati eseguiti per convalidare questa soglia ed esplorare la possibilità di ridurre l'utilizzo di energia, sfruttando lo schema delle attività di accoppiamento di questa specie. La soglia ottenuta in prove di laboratorio – picco di ampiezza di 15  $\mu\text{m/s}$  - è stata confermata da misure di attenuazione del segnale e accoppiamento in gabbie di campo a distanze progressive dalla sorgente. Si è visto che ridurre il periodo di disturbo da 18 a 10 ore non ha ridotto l'efficacia del metodo sul campo, consentendo un risparmio energetico. L'effetto del suono generato non seguiva una curva di efficacia, ma era del tutto efficace oppure del tutto inefficace sul comportamento di accoppiamento di *S. titanus*, al superamento di una soglia critica, e non si è stati in grado di accertare l'esatto meccanismo della rottura della comunicazione, ma l'approccio appare abbastanza robusto da meritare un test su larga scala in futuro.

Disruption amplitude ( $\mu\text{m/s}$ )	Males		Females		Fisher's exact test
	Total	Stopped calling	Total	Stopped replying	
<1.25	20	0	11	1	NS
1.251–2.5	14	0	14	1	NS
2.501–5	18	2	14	6	*
5.001–10	21	3	19	10	*
10.001–20	13	3	22	15	*
>20	11	4	11	10	***

Note that the classes are not paired, as male- and female-perceived amplitudes were measured separately

\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$

**Figure 5.** Prove nelle quali l'accoppiamento è fallito perché uno degli animali ha smesso di emettere il segnale. (Polajnar et. al, 2016)

## Punti chiave per un'implementazione di successo del metodo

L'adozione di strategie basate su strumenti di tipo acustico potrebbe consentire a medio-lungo termine la riduzione dell'uso di pesticidi chimici, che si inserisce bene nell'IPM e nei concetti di agricoltura ecologica. Tuttavia per sviluppare una tecnica che possa essere adottata nella pratica deve diventare accessibile e commercialmente valida. Questi strumenti dovrebbero quindi essere economicamente competitivi con altre soluzioni già disponibili sul mercato, vale a dire considerare il costo del dispositivo (acquisto + manutenzione). I costi delle

apparecchiature, secondo alcune valutazioni di costruttori, potrebbero essere portati a 300 € / ha, paragonabile al costo dei trattamenti antiparassitari, se si presume un ciclo di vita di 5 anni. Un'altra caratteristica di tale sistema è l'utilizzo di fili esistenti i filari di vigneto, che possono essere utilizzate per fornire energia vibrazionale a singole piante senza la necessità di elaborare soluzioni tecniche.

Tuttavia, è importante comprendere meglio l'effetto di diverse condizioni ambientali (pioggia, cambiamento della pressione atmosferica) e anche gli effetti collaterali su insetti utili o altri parassiti.

## **Conclusioni**

I ricercatori ritengono che l'uso di dispositivi acustici per una difesa sostenibile per i viticoltori è ancora da venire, ma la conoscenza biologica per farlo funzionare e la tecnologia sono già disponibili. La mancanza di soluzioni verrebbe superata se si accrescessero gli sforzi per unificare e ottimizzare le conoscenze già disponibili e per studiare e sviluppare nuove soluzioni per l'applicazione pratica, in base alle peculiarità dei vari sistemi coltura-vettore, dove è possibile realizzare un approccio acustico. Tuttavia va sottolineato che molte questioni aperte devono ancora essere risolte, come l'approvvigionamento di energia nei vigneti, prima che il metodo sia pronto all'attuazione.

A parte le suddette problematiche di attenuazione e l'effetto delle vibrazioni sulle piante, c'è molto spazio per migliorare il progetto e la fruibilità dei dispositivi, che sono ancora in fase di prototipo. Occorre considerare con attenzione anche i diversi sistemi di sostegno e vigneti abbandonati, anche se queste sono le questioni in gran parte condivise con i metodi di controllo convenzionali, quindi non è necessario partire da zero. Ciò detto, i ricercatori ritengono che questo approccio sia degno di essere perseguito ulteriormente e che abbia il potenziale per sostituire o almeno integrare misure chimiche per il controllo di lin Europa.

## **Bibliografia**

A. Lucchi, A. Eriksson, G. Anfora, M. V. Doberlet, V. Mazzoni, 2013. A ten-year research on vibrational communication in *Scaphoideus titanus*: science fiction or future prospect?

Ard Nieuwenhuizen, PURE - Pesticide Use-and-risk Reduction in European farming systems with Integrated Pest Management, 2007-2013. Collaborative Project, SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME.



Eriksson, A, Gianfranco Anfora, Andrea Lucchi, Francesco Lanzo, Meta Virant-Doberlet, Valerio Mazzoni, 2012. Exploitation of Insect Vibrational Signals Reveals a New Method of Pest Management. PLOS ONE 9(6): e100029. doi: 10.1371/journal.pone.0100029.

Eriksson, A., 2013. Mating disruption in *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) by vibrational signals. PhD Thesis. University of Pisa Fondazione Edmund Mach.

Jernej Polajnar, Anna Eriksson, Andrea Lucchi, Gianfranco Anfora, Meta Virant-Doberlet, Valerio Mazzoni, 2016a. Manipulating behaviour with substrate-borne vibrations – potential for insect pest control. Pest Management Science. Volume 71 , Issue 1, Pages 15–23.

Jernej Polajnar, Anna Eriksson, Meta Virant-Doberlet, Valerio Mazzoni, 2016b. Mating disruption of a grapevine pest using mechanical vibrations: from laboratory to the field. J Pest Sci. Volume 89, Issue 4, pp 909–921.

Valerio Mazzoni, Andrea Lucchi, Andrej Čokl, Janez Prešern, Meta Virant-Doberlet, 2009a. Disruption of the reproductive behaviour of *Scaphoideus titanus* by playback of vibrational signals. Entomologia Experimentalis et Applicata, Volume 133, Issue 2, Pages 174–185.

Valerio Mazzoni, Andrea Lucchi, Janez Prešern and Meta Virant-Doberlet, 2008. Vibrational communication and other behavioural traits in *Scaphoideus titanus*. Bulletin of Insectology 61 (1): 187-188.

Valerio Mazzoni, Janez Prešern, Andrea Lucchi and Meta Virant-Doberlet, 2009b. Reproductive strategy of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). Bulletin of Entomological Research, Volume 99, Issue 4, pp. 401 -413.

Veronelli V., 2009. MATING DISRUPTION IN IPM: pheromones and beyond. Lucerne 19-20 October, ABIM 2009.