

M. SACCO, F. PASIN, G. PELLIZZARI, E. ARATO, C. REGIS, C. PASINI

**Predazione di *Macrolophus caliginosus* Wagner (Heteroptera: Miridae) su *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae) e sua verifica mediante un marcatore specifico**

**Riassunto** - Nel 2006 è stata effettuata una ricerca volta ad accertare l'attività del miride predatore autoctono *Macrolophus caliginosus* Wagner nei confronti del lepidottero licenide *Cacyreus marshalli* Butler, fitofago esotico particolarmente dannoso ai gerani, recentemente introdotto in Europa. Lo studio è stato affrontato seguendo due diversi approcci sperimentali. Il primo ha riguardato una prova di confronto, effettuata in serra, tra piante di geranio zonale (*Pelargonium x hortorum* Bailey) infestate da *C. marshalli*, con e senza *M. caliginosus*. Il secondo approccio era volto a sviluppare un marcatore molecolare specifico di *C. marshalli*, a partire dal gene mitocondriale citocromo-ossidasi subunità I, impiegato per dimostrare, mediante la tecnica PCR, l'effettiva attività predatrice in campo di *M. caliginosus* nei confronti del licenide. La prova di confronto ha confermato l'ipotesi che il miride si nutre delle uova e delle giovani larve di *C. marshalli*, essendosi ridotta fortemente l'infestazione nella tesi "con *M. caliginosus*". L'osservazione è stata convalidata con l'analisi molecolare, dato che nell'apparato digerente di *M. caliginosus* catturato in pieno campo è stata verificata la presenza del DNA di *C. marshalli*. Vengono discussi brevemente alcuni aspetti applicativi della PCR e il possibile impiego di *M. caliginosus* come agente di controllo di *C. marshalli*.

**Abstract** - *Predatory activity of Macrolophus caliginosus* Wagner (Heteroptera: Miridae) on *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae) and its assessment using a specific marker

During 2006 a study was carried out to assess the predatory activity of the autochthonous mirid *Macrolophus caliginosus* Wagner on the butterfly *Cacyreus marshalli* Butler. This exotic phytophagous Lycaenid recently introduced to Europe, also known as Geranium Bronze, is a pest of cultivated Geranium. Two different experimental approaches were performed. The first one was carried out in greenhouse and concerned a comparison trial between geranium plants (*Pelargonium x hortorum* Bailey) infested by Geranium Bronze, "with" or "without" *M. caliginosus* input. The second one concerned the development of a specific *C. marshalli* molecular marker, with the aim to demonstrate, by PCR, the predatory activity of *M. caliginosus* on the exotic Lycaenid. The molecular marker was designed on mitochondrial

citocrome-oxidase subunit I gene sequence. The comparison trial confirmed the hypothesis that the mirid feeds on eggs and young larvae of Geranium Bronze: the Lycaenid infestation was strongly reduced in the treatment "with" *M. caliginosus*, in comparison with the treatment "without" it. These data were supported by molecular analysis, since DNA of *C. marshalli* was detected in the digestive system of *M. caliginosus* caught outdoors on infested geranium plants. Some PCR features and the possible employment of *M. caliginosus* as biocontrol agent of *C. marshalli*, are briefly discussed.

**Key words:** *Cacyreus marshalli*, *Macrolophus caliginosus*, biological control, Geranium Bronze Butterfly, molecular marker, PCR (Polymerase Chain Reaction).

## INTRODUZIONE

È noto ormai da diversi anni che la coltura dei gerani, in alcuni paesi del bacino del Mediterraneo e, segnatamente, in Italia, sta correndo seri rischi a causa dell'attività di un fitofago esotico sconosciuto nel nostro paese fino al 1997, e la cui comparsa, dapprima nel Lazio (Trematerra *et al.*, 1997), e successivamente in altre regioni, è motivo oggi di serie preoccupazioni. Si tratta di *Cacyreus marshalli* Butler, lepidottero licenide introdotto accidentalmente dal Sudafrica in Spagna attraverso le isole Baleari, e poi, negli anni '90, diffusosi in buona parte dell'Europa (Sarto i Monteys, 1992; Trematerra *et al.*, 1997; Trematerra & Zilli, 1999). L'espansione di questo fitofago nei paesi europei è stata favorita anche dall'assenza di nemici naturali (parassitoidi e predatori) (Pignataro & Vicidomini, 2005). In tali condizioni la lotta chimica è stata finora l'unica soluzione consigliata per il contenimento del fitofago. Svitati principi attivi, sia di origine naturale che di sintesi, si sono dimostrati efficaci contro le larve di questo licenide (Trematerra & Parenzan, 2003; Sacco *et al.*, 2004) e vengono di norma utilizzati dai produttori di gerani. Il problema tuttavia rimane aperto per i consumatori finali (operatori del verde pubblico e hobbisti), poco propensi a dover trattare le piante più volte al mese; tale situazione ha portato non pochi consumatori a preferire altre piante ornamentali da balcone in sostituzione dei gerani.

Presso il CRA - Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie ornamentali di Sanremo, nel periodo maggio-giugno 2006, su piante di geranio allevate all'aperto per essere utilizzate in prove di lotta chimica contro *C. marshalli*, è stato osservato un consistente volo di adulti del lepidottero *C. marshalli*. Tuttavia, alla notevole ovideposizione operata dal lepidottero, non hanno fatto seguito l'attesa infestazione di larve e i successivi danni. Su tali piante di geranio è stata osservata la presenza di una popolazione di *Macrolophus caliginosus* Wagner, noto come attivo predatore di stadi diversi di insetti. Dato che non risultano segnalati a tutt'oggi predatori autoctoni a carico di questa specie esotica, si è voluto verificare in serra l'attività predatrice di *M. caliginosus* nei confronti di *C. marshalli*, e, come ulteriore riprova, individuare una coppia di primer specifica per *C. marshalli*, in modo da poterne reperire il DNA nell'intestino di esemplari di *M. caliginosus* raccolti in campo, a conferma della loro attività di predazione a carico del lepidottero.

### Note su *C. marshalli* e *M. caliginosus*

#### *C. marshalli*

La biologia di *C. marshalli* in Italia è stata studiata da Trematerra & Parenzan (2003) e da Favilli & Manganelli (2006), ai cui lavori si fa riferimento.

Questa specie compie da 5 a 6 generazioni annuali sovrapposte; è caratterizzata da un lungo periodo di volo (inizio aprile-prima metà di novembre), con femmine ovideponenti presenti da maggio a ottobre. Le uova vengono deposte singolarmente soprattutto sui sepali, sui boccioli e sui peduncoli fiorali, ma anche sulle foglie o sui fusticini. Fino alla 3<sup>a</sup> età le larve sono endofite e si nutrono dapprima del mesofillo fogliare, penetrando poi negli steli, entro i quali scavano gallerie discendenti. Raggiunta l'ultima età (4<sup>a</sup>), le larve abbandonano le gallerie e rodono fiori e foglie fino alla maturità. Le larve tollerano basse temperature, perciò, nei paesi ad inverno mite, non presentano diapausa invernale, ma solo un rallentamento dell'attività. I danni alla pianta ospite sono gravi, per tale motivo la specie è stata inserita dall'EPPO nella lista A2, cioè tra gli organismi di cui si raccomanda la regolamentazione come specie da quarantena.

#### *M. caliginosus*

Per quanto riguarda *M. caliginosus*, si tratta di un miride a regime alimentare misto. Conosciuto come attivo predatore di aleirodidi, afidi, acari tetranichidi, uova di lepidotteri, può nutrirsi anche di linfa, pungendo i tessuti vegetali, senza tuttavia arrecare danni. È una specie a diffusione mediterranea che colonizza svariate piante spontanee, tra le quali la preferita risulta *Inula viscosa* (Asteraceae). In campo e in serra è frequente su piante di pomodoro, tabacco, gerbera e crisantemo, sulle quali trova le sue prede preferite, rappresentate dagli aleirodidi *Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia tabaci* (Albajes & Alomar, 1999; Bonato *et al.*, 2006; Gabarra *et al.*, 2004; Hamdan, 2006 a, 2006 b). Le uova vengono infisse nei tessuti vegetali. La fecondità varia a seconda del tipo di alimentazione e della temperatura e si aggira sulle 100 - 200 uova per femmina. Negli areali a clima mite, quale quello della riviera ligure, rimane attivo tutto l'anno. Viene allevato nelle biofabbriche e utilizzato in programmi di lotta biologica (Benuzzi *et al.*, 2000; Conte *et al.*, 2001).

### MATERIALI E METODI

#### Attività di predazione

Le osservazioni sono state condotte presso l'Unità di Ricerca di Sanremo, nel periodo tra fine agosto e ottobre 2006, mettendo a confronto piante di geranio infestate dal licenide in assenza di *M. caliginosus*, con altre ugualmente infestate, ma in presenza del predatore. Allo scopo di eliminare l'eventuale entomofauna presente sui gerani, è stato effettuato in via preliminare, sulle piante da utilizzare per la prova, un trattamento con deltametrina. Le piante trattate sono state collocate in una piccola serra,

suddivisa in 4 scomparti chiusi (n° 1, 2, 3 e 4), nella misura di 8 piante per scomparto.

In data 12 settembre, in ognuno dei quattro scomparti della serra sono state introdotte 35 crisalidi di *C. marshalli*. Gli adulti sono sfarfallati gradualmente nella seconda metà di settembre; si è provveduto a rimpiazzare successivamente gli individui adulti che per cause diverse venivano perduti.

A partire dal 19 settembre, una volta iniziata l'ovideposizione da parte di *C. marshalli*, sono stati immessi negli scomparti 1 e 2, che rappresentavano la tesi "con *M. caliginosus*", 25 individui di *M. caliginosus* per scomparto, prelevati da piante di *I. viscosa* vegetanti nei dintorni e colonizzate dal miride. Il 5 ottobre sono stati introdotti altri 25 individui di *M. caliginosus* per scomparto, in sostituzione degli individui morti nel frattempo.

Gli scomparti 3 e 4 rappresentavano la tesi di confronto "senza *M. caliginosus*".

### *Rilievi eseguiti*

Dopo un primo controllo visuale delle uova deposte sui gerani, il 10/10 è stato eseguito un rilievo accurato su 4 piante per tesi, conteggiando al binoculare:

- 1) le uova vitali;
- 2) le uova regolarmente schiuse;
- 3) le larve vive.

Un secondo rilievo è stato eseguito il 16/10, su un uguale numero di piante e con le stesse modalità, conteggiando anche le uova predate. I dati sono stati elaborati con l'analisi della varianza.

## **Analisi molecolare tramite Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Obiettivo di questa sperimentazione è stato quello di individuare un marcatore specifico di *C. marshalli* e successivamente di verificare l'effettiva capacità di *M. caliginosus* di predare a carico di *C. marshalli*, analizzando, mediante PCR, il contenuto dell'apparato digerente di esemplari di *M. caliginosus* raccolti all'aperto su piante infestate, e accertando se in esso fosse presente il marcatore specifico di *C. marshalli*, a riprova dell'avvenuta predazione.

### *Campioni utilizzati*

Sulle piante di geranio coltivate all'aperto presso l'Unità di Ricerca di Sanremo sono stati raccolti uova, larve e adulti di *C. marshalli*, larve di *Helicoverpa armigera* Hübner e *Autographa gamma* L. (Lepidoptera, Noctuidae), otto individui di diverse età di *M. caliginosus* e quattro di *Dicyphus errans* Wolff (Heteroptera, Miridae). Prima dell'estrazione del DNA due esemplari di *M. caliginosus* e uno di *D. errans* sono stati tenuti a digiuno in laboratorio, in condizioni controllate (a 26° per 60 ore); tra questi, un individuo di *M. caliginosus* è stato nutrito con un uovo di *C. marshalli* e congelato a - 20° C mezz'ora dopo la suzione. Sono stati altresì considerati come testimoni il

geranio zonale (*Pelargonium x hortorum*) e *Inula viscosa*, essendo nota la capacità dei miridi di nutrirsi anche di succhi vegetali.

#### *Estrazione del DNA totale e disegno dei primer*

L'estrazione del DNA totale di *C. marshalli* è stata effettuata da un adulto a cui erano state asportate le ali e l'addome. Per i nottuidi è stato impiegato solamente il capo dell'ultima età larvale, i predatori sono stati considerati nella loro interezza; per *I. viscosa* e geranio è stato utilizzato un frammento di foglia di 100 mg. Ogni campione è stato pestellato in N<sub>2</sub> liquido, e l'estrazione è stata condotta seguendo la metodologia indicata da Patwary *et al.*, (1994). Il pellet di DNA ottenuto è stato risospeso in acqua sterile alla concentrazione di 10 ng/μL, in seguito a quantificazione su gel di agarosio.

Per la definizione di un marcatore specifico di *C. marshalli*, la sequenza del gene mitocondriale (mtDNA) della citocromo-ossidasi subunità I (CoI) di *C. marshalli* (GenBank AY556966) è stata confrontata con la sequenza nota della CoI di *M. caliginosus* (GenBank AY855089). Sono state in tal modo individuate le regioni idonee allo sviluppo di primer specifici, elaborati poi con Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) e perfezionati con NetPrimer (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, U.S.A.). La porzione genica compresa tra i primer, forward CmCoIF1 5'- AATGGAGCAGGAACAGGATG-3' e reverse CmCoIR1 5'- ACCAACAGCTCAAATAAATAAGAT-3', è lunga 210 bp.

#### *Amplificazioni PCR e sequenziamento*

Le reazioni di PCR sono state effettuate in provette di polipropilene da 0,2 mL, utilizzando i seguenti reagenti: buffer 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 400 μM, primer Forward e primer Reverse 0,4 μM, 1,5 U di Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), e 20 ng di DNA totale, in acqua sterile, in un volume finale di 25 μL. Il programma di amplificazione è stato eseguito secondo i seguenti parametri: denaturazione iniziale a 94°C per 2'; quindi, per 30 cicli, denaturazione a 94°C per 30", appaiamento dei primer a 58°C per 30" ed estensione a 72°C per 30"; estensione finale dei frammenti a 72°C per 5'. Le reazioni sono state effettuate in un termociclatore T Gradient 96 (Biometra, GmbH, Göttingen, Germany). I prodotti di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel all'1% di agarosio in buffer TAE, con l'aggiunta di etidio bromuro, e visualizzati con lampada UV.

I prodotti di PCR sono stati infine purificati e sequenziati con un sequenziatore ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

## RISULTATI

#### *Attività di predazione*

È stato innanzitutto effettuato un confronto tra le medie di uova vitali deposte dal fitofago, presenti rispettivamente nelle due tesi. Tali medie, nel complesso dei due rilievi, erano: 24 uova per pianta nella tesi senza *M. caliginosus* e 31 uova per pianta nella tesi con *M. caliginosus*, con una differenza statisticamente non significativa. Prendendo in

considerazione soltanto il primo dei due rilievi, (10/10/2006), la media risulta di 38 uova vitali per pianta in ognuna delle due tesi.

Riguardo al numero di uova regolarmente schiuse e alle larve vive, nel primo rilievo si è riscontrato, nella tesi senza *M. caliginosus*, un valore medio di 38 uova schiuse per pianta, mentre nella tesi con *M. caliginosus* è stato osservato un numero medio di 17 uova schiuse per pianta. Tale differenza non risulta statisticamente significativa. Riguardo invece al numero di larve vive, il valore medio osservato nella tesi senza *M. caliginosus*, pari a 20 larve per pianta, si scosta significativamente dalla media osservata nella tesi con *M. caliginosus*, di 4 larve per pianta (tab.1).

Tab. 1 - Risultati del confronto tra le due tesi per quanto riguarda uova vitali, uova schiuse e larve vive di *C. marshalli*, relativamente al primo rilievo.

A lettere diverse, sulla stessa riga, corrispondono differenze significative, per  $p = 0,05$ .

<i>C. marshalli</i> , N° medio per pianta di:	T E S I	
	Senza <i>M. caliginosus</i>	Con <i>M. caliginosus</i>
Uova vitali	38 a	38 a
Uova schiuse	38 a	17 a
Larve vive	20 a	4 b

Non viene presentata l'analisi statistica dei dati del secondo rilievo (16/10/2006), perchè privi di significato sperimentale a causa di una accidentale invasione di *M. caliginosus*, verificatasi tra il primo e il secondo rilievo, anche nella tesi prevista senza *M. caliginosus*. Ciò ha comportato che il numero di uova predate fosse elevato in entrambe le tesi, annullando di fatto ogni differenza. Nel secondo rilievo, infatti, il numero medio di uova predate è risultato essere di 74/pianta nella tesi prevista senza *M. caliginosus*, e di 88/pianta nella tesi con *M. caliginosus*, mentre il numero medio di uova vitali è risultato 11/pianta nella tesi senza *M. caliginosus* e 25/pianta in quella con *M. caliginosus*.

#### Analisi molecolare

Per valutare la specificità della coppia di primer CmCoIF1/CmCoIR1, è stato effettuato un primo esperimento di PCR, utilizzando come campioni il DNA totale di *C. marshalli*, *H. armigera*, *A. gamma*, *M. caliginosus* e *D. errans* a digiuno, *Pelargonium x hortorum* e *I. viscosa*. Come si può osservare nella figura 1, il frammento atteso di 210 bp era presente solo in *C. marshalli*.

Tramite un secondo esperimento di PCR è stata valutata l'attività predatrice dei miridi che si sono rinvenuti sui gerani all'aperto. Come controllo positivo è stato usato il DNA totale di *C. marshalli*. Si può notare (fig. 2), che il marcatore è stato amplificato in *M. caliginosus* a digiuno e nutrito con un solo uovo del licenide in condizioni controllate, contrariamente al campione tenuto completamente a digiuno. La presenza del marcatore è stata anche rilevata in un esemplare di *M. caliginosus* e in uno di *D. errans* raccolti in pieno campo, attestando l'avvenuta predazione a carico di *C. marshalli*. Attraverso il sequenziamento dei tre prodotti di PCR dei campioni di *C. marshalli*, di

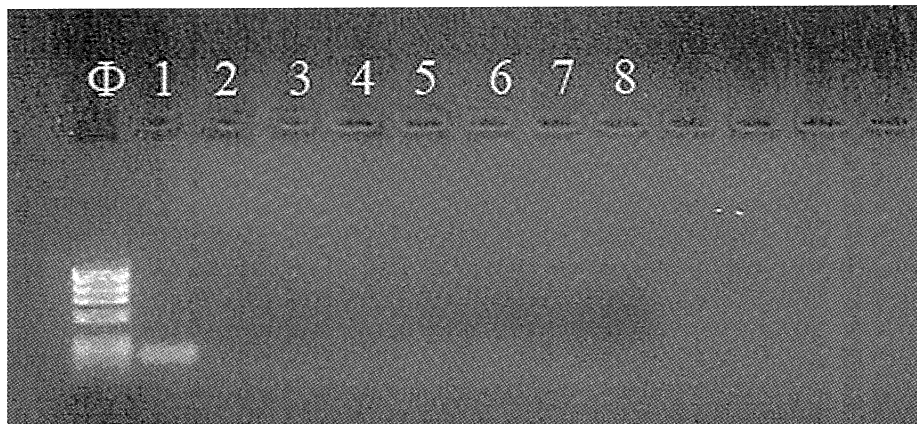


Fig. 1 - PCR: verifica specificità CmCoIF1/CmCoIR1. 1, adulto *C. marshalli*; 2, *M. caliginosus* a digiuno; 3, *D. errans* a digiuno; 4, *A. gamma*; 5, *H. armigera*; 6, *P. x hortorum*; 7, *I. viscosa*; 8, controllo negativo. Φ, ΦX174/HaeIII digest.

Il frammento atteso di 210 bp è presente solo in *C. marshalli* (n.1) ed assente in tutti gli altri campioni: viene confermata così la specificità del primer.

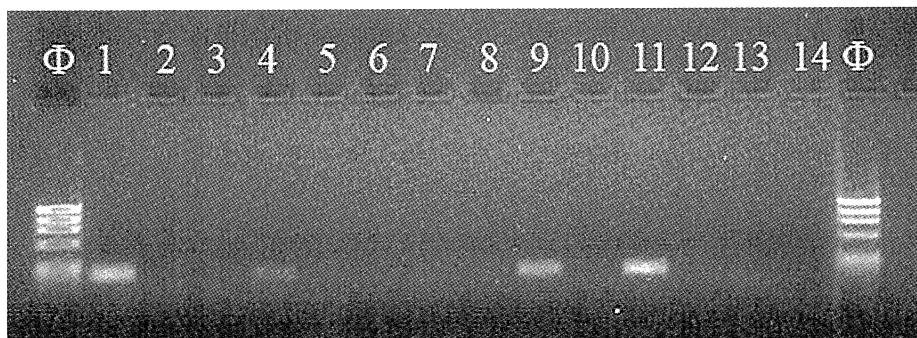


Fig. 2 - Amplificazione del frammento di 210 bp con primer selettivi per *C. marshalli* su estratti di predatori raccolti da *P. x hortorum*: 1, adulto *C. marshalli*; 2, *M. caliginosus* a digiuno; 3, *D. errans* a digiuno; 4, *M. caliginosus* nutrito con un uovo di *C. marshalli*; 5-10, *M. caliginosus* raccolti in campo negli stadi di: adulto (5, 8, 10), neanide (6, 7), ninfa II (9); 11-13 - *D. errans* raccolti in campo negli stadi di: adulto (11), ninfa II (12), ninfa I (13); 14, controllo negativo. Φ, ΦX174/HaeIII digest.

Il frammento 210 bp è presente in *C. marshalli* (n.1), in *M. caliginosus* nutrito in laboratorio con un uovo di *C. marshalli* (n.4), in *M. caliginosus* e *D. errans* raccolti in campo su pianta infestata da *C. marshalli* (n.9 e n.11), dimostrando così l'avvenuta predazione a carico del licenide.

*M. caliginosus* e di *D. errans* catturati in pieno campo, è stata verificata la loro identità con la porzione di DNA del gene CoI di *C. marshalli*, compreso tra la coppia di primer CmCoIF1 e CmCoIR1.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le osservazioni effettuate in serra hanno confermato che *M. caliginosus* è un predatore di uova e larve neonate di *C. marshalli*. L'accidentale penetrazione del miride anche negli scomparti 3 e 4, previsti come confronto senza *M. caliginosus*, pur avendo vanificato la differenza osservata nel primo rilievo tra la tesi con e quella senza predatore, ha paradossalmente confermato l'efficacia della predazione di *M. caliginosus* a carico di *C. marshalli*. L'attività del miride infatti, oltre a compromettere la schiusura delle uova, ha eliminato la quasi totalità delle larve neonate.

L'analisi mediante PCR ha dato una conferma qualitativa delle osservazioni effettuate all'aperto e verificate in serra, essendo stato trovato in *M. caliginosus* catturato all'aperto il marcatore di *C. marshalli*, sviluppato in questo lavoro. Questo marcatore è risultato specifico per *C. marshalli*, dato che non sono stati ottenuti prodotti aspecifici con i campioni utilizzati; anche nel caso dei nottuidi non sono sorti problemi di ambiguità.

La specificità dei primer, cioè la capacità di riconoscere e legarsi al DNA della preda anziché a quello del predatore, è fondamentale per condurre studi sull'attività predatrice. La maggior parte dei lavori di questo genere è stata condotta su predatori mantenuti in condizioni artificiali e solo alcuni hanno preso in esame popolazioni naturali (Agustì *et al.*, 2003 a) e b); Dodd *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Read *et al.*, 2006). Tuttavia, su popolazioni di predatori raccolti in pieno campo, i risultati possono essere anche molto inferiori alle aspettative (Hoogendoorn & Heimpel, 2003). Ciò è dovuto anche al fatto che molti predatori digeriscono rapidamente la loro preda e raramente vengono catturati con lo stomaco pieno (Sheppard & Harwood, 2005). Inoltre in secrezioni extra-orali di alcuni eterotteri è stata rinvenuta la presenza di DNAsi (Agustì *et al.*, 1999), con probabile parziale degradazione del DNA della preda prima dell'ingestione da parte del predatore. Il DNA della preda, peraltro, costituisce una frazione minima del DNA totale usato come template, in quanto è preponderante quello del predatore. Per aumentare le probabilità di individuare il marcatore in tempi più lunghi dal momento dell'ingestione è quindi importante la scelta di primer amplificanti frammenti di ridotte dimensioni e localizzati in regioni presenti in copie multiple nel genoma, come già dimostrato da Zaidi *et al.*, (1999). Analisi condotte a livello del DNA mitocondriale indicano come esso sia lo strumento ideale per discriminare specie diverse (Chen *et al.*, 2000). La coppia di primer CmCoIF1/CmCoIR1, che amplifica la porzione di 210 bp del gene mitocondriale CoI, nelle condizioni di PCR utilizzate, è risultata molto sensibile, permettendo l'amplificazione anche nel predatore nutritosi di un singolo uovo. Tale risultato potrebbe essere giustificato dalla presenza di un elevato numero di copie del gene CoI. Ogni cellula, infatti, può contenere migliaia di mitocondri.

Il risultato ottenuto nell'esperimento condotto sui miridi predatori catturati in pieno



campo, nei quali è stato trovato il marcatore sviluppato, è stato quindi soddisfacente, tenuto conto dell'esiguità del numero di individui analizzati e del fatto che non era noto il tempo trascorso tra la predazione e la preparazione del campione per l'estrazione del DNA. Questa evidenza sperimentale, confortata dai risultati del sequenziamento, conferma la validità del test messo a punto. Esso potrà essere utilizzato in futuro per monitorare la predazione a carico di *C. marshalli*, affiancando costi contenuti alla rapidità e semplicità di esecuzione, con la possibilità, inoltre, di valutare contemporaneamente un elevato numero di campioni. Inoltre il test, applicato a popolazioni naturali, includendo anche altre specie di predatori oltre a *M. caliginosus*, può fornire dati abbastanza vicini alla realtà di campo riguardo ai rapporti trofici intercorrenti tra *C. marshalli* e i suoi possibili predatori, tra i quali *D. errans*, come osservato in questo lavoro. Indipendentemente da tali considerazioni, la concordanza dei risultati ottenuti con due diverse metodologie può essere considerata come una dimostrazione dell'attitudine di *M. caliginosus* a predare a carico di *C. marshalli*, non solamente in ambiente confinato, ma anche all'aperto.

Riguardo all'incidenza effettiva di tale attività e all'aspetto pratico che potrebbe avere nella difesa dei gerani ornamentali, può essere interessante l'osservazione che *M. caliginosus* vive preferibilmente su alcune specie botaniche, tra cui la più importante risulta essere, almeno in determinati ambienti dell'areale mediterraneo, *I. viscosa*, e non ultime anche le stesse specie del genere *Pelargonium* (Hamdan, 2006b). Resta da verificare se sarà possibile sfruttare questa situazione per usare eventualmente *I. viscosa* come banker plant, consociata ai gerani, in alternativa, o almeno come ausilio ai trattamenti chimici, nella difesa contro *C. marshalli*.

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la Dott.ssa M. Costanzi, dell'Istituto Regionale per la Floricoltura di Sanremo, per aver gentilmente fornito le crisalidi di *C. marshalli*, il Dott. M. Simonato, del Dipartimento di Agronomia ambientale e Produzioni vegetali, Sezione Entomologia, dell'Università di Padova, per la preziosa collaborazione e per i consigli relativi alle analisi molecolari, il Prof. V. Girolami, del medesimo Dipartimento, per la revisione critica del testo.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALBAJES R., ALOMAR O., 1999 - Current and potential uses of polyphagous predators. - In: ALBAJES R., GULLINO M.L., LENTEREN VAN J.C., ELAD Y. (Eds.), Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. - Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 265-275.
- AGUSTI' N., DE VICENTE M. C., GABARRA R., 1999 - Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. - Molecular Ecology, 8: 1467-1474.
- AGUSTI' N., SHAYLER S.P., HARWOOD J.D., VAUGHAN I.P., SUNDERLAND K.D., SYMONDSON W.O.C., 2003a - Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. - Molecular Ecology, 12: 3467-3475.

- AGUSTI' N., UNRUH T.R., WELTER S.C., 2003b - Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. - Bulletin of Entomological Research, 93 (3): 179 - 185.
- BENUZZI M., MOSTI M., NICOLI G., 2000 - I Miridi predatori di Aleurodidi. In: Gli ausiliari nell'agricoltura sostenibile. (G. Nicoli e P. Radegheri Eds.). - Calderini Edagricole, Bologna: 73-95.
- BONATO O., COUTON L., FARGUES J., 2006 - Feeding Preference of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) on *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). - Journal Econ. Entomol., 99 (4): 1.143-1.151.
- CHEN Y., GILES K. L., PAYTON M. E., GREENSTONE, 2000 - Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. - Molecular Ecology, 9: 1887-1898.
- CONTE L., DALLA MONTÀ L., GUIDO M., 2001 - Gli insetti utili per le colture protette. - Edizioni L'Informatore Agrario, Verona, 114 pp.
- DODD C. S., BRUFORD M. W., GLEN D. M., SYMONDSON W.O.C., 2003 - Detection of slug DNA within carabids using prey-specific PCR primers. - Slug and Snails: Agricultural, Veterinary and Environmental Perspectives. British Crop Protection Council Monograph, 80: 13-20.
- FAVILLI L., MANGANELLI G., 2006 - Life history of *Cacyreus marshalli*, a South African species recently introduced into Italy (Lepidoptera Lycaenidae). - Boll. Soc. Entomol. ital., 138 (1): 51-61.
- GABARRA R., ALOMAR O., CASTANE C., GOULA M., ALBAJES R., 2004 - Movement of greenhouse whitefly and its predators in and outside of Mediterranean greenhouses. - Agriculture, Ecosystems and Environment, 102: 341-348.
- HAMDAN A. J. S., 2006a - Effect of different arthropod prey species on the biology of the predatory bug, *Macrolophus caliginosus* Wagner (Hemiptera: Miridae). - Hebron University Research Journal, 2 (2): 48-64.
- HAMDAN A. J. S., 2006b - Effect of host plant species on the survival, adult longevity and fertility of predatory bug, *Macrolophus caliginosus* Wagner (Hemiptera: Miridae). - Hebron University Research Journal, 2 (2): 1-15.
- HOOGENDOORN M. & HEIMPEL G., 2003 - PCR-based gut content analysis of insect predators: a field study. - 1° International Symposium on Biological Control of Arthropods: 91-97.
- MA J., LI D., KELLER M., SCHMIDT O., FENG X., 2005 - A DNA marker to identify predation of *Plutella xylostella* (Lep. Plutellidae) by *Nabis kinbergii* (Hem., Nabidae) and *Licosa* sp. (Araneae, Lycosidae). - Journal of Applied Entomology, 129: 330-335.
- PATWARY M.U., KENCHINGTON E.L., BIRD C.J., ZOUROS E., 1994 - The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop *Plactopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). - Journal of Shellfish Research, 13: 547-553.
- Pignataro C., Vicidomini S., 2005 - Prime segnalazioni di antagonisti di *Cacyreus marshalli* (Butler) in Italia (Lepidoptera: Lycaenidae). - Il naturalista Campano, 2: 1-5.
- Read D. S., Sheppard S. K., Bruford M. W., Glen D. M., Symondson W.O.C., 2006 - Molecular detection of predation by soil micro-arthropods on nematodes. - Molecular Ecology, 15: 1963-1972.
- Rozen S., Skåletsky H. J., 2000 - Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. - In: KRAWETZ S., MISENER S. (eds) - Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. - Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- SACCO M., ARATO E., D'AQUILA F., PASINI C., 2004 - Prove di difesa da *Cacyreus marshalli* Butler su geranio. - Atti Giornate Fitopatologiche, 1: 201-206.
- SARTO I MONTEYS V., 1992 - Spread of the Southern African Lycaenid butterfly, *Cacyreus marshalli* Butler, 1898, (Lep.: Lycaenidae) in the Balearic Archipelago (Spain) and considerations on

- its likely introduction to continental Europe. - Journal of Research on Lepidoptera, 31 (1-2): 24-34.
- SHEPPARD S. K., HARWOOD J.D., 2005 - Advances in molecular ecology: Tracking trophic links through predator - prey food-webs. - Functional Ecology 19: 751-762.
- TREMATERRA P., PARENZAN P., 2003 - *Cacyreus marshalli*, lepidottero in rapida diffusione sui gerani. - Informatore Agrario, 17: 1-5.
- TREMATERRA P., ZILLI A., 1999 - Sulla presenza in Europa di *Cacyreus marshalli* Butler, 1898, lepidottero licenide sudafricano dannoso ai gerani coltivati. - Notiziario sulla Protezione delle Piante, 10: 45-52.
- TREMATERRA P., ZILLI A., VALENTINI V., MAZZEI P., 1997 - *Cacyreus marshalli*, un lepidottero sudafricano dannoso ai gerani in Italia. - Informatore Fitopatologico, 7/8: 2-6.
- ZAIDI R. H., JAAL Z., HAWKES N. J., HEMIGWAY J., SYMONDSON W. O. C., 1999 - Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? - Molecular Ecology, 8: 2081-2087.

DR. MAURO SACCO, DR. ELISA ARATO, DR. CRISTINA REGIS, DR. CARLO PASINI – CRA -Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie ornamentali, Corso Inglesi 508, 18038 Sanremo, Italy.  
E-mail: m.sacco@istflori.it

PROF. GIUSEPPINA PELLIZZARI, DR. FABIO PASIN - Dipartimento Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali – Entomologia, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italy.  
E-mail: giuseppina.pellizzari@unipd.it

Accettato il 21 novembre 2007