



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

RISPOSTE COMPORTAMENTALI DEGLI
ADULTI DI *TENEBRIO MOLITOR* AI
COMPOSTI VOLATILI EMESSI DAL
FARINACCIO

BEHAVIORAL RESPONSES OF *TENEBRIO*
MOLITOR ADULTS TO WHEATMEAL
VOLATILES

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:
FLORINDA PERUGINO

Relatore:
PROF. PAOLA RIOLO

Correlatore:
DOTT.SSA SARA RUSCHIONI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

RISPOSTE COMPORTAMENTALI DEGLI ADULTI
DI *TENEBRIO MOLITOR* AI COMPOSTI VOLATILI
EMESSI DAL FARINACCIO

BEHAVIORAL RESPONSES OF *TENEBRIO*
MOLITOR ADULTS TO WHEATMEAL VOLATILES

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:
FLORINDA PERUGINO

Relatore:
PROF.SSA PAOLA RIOLO

Correlatore:
DOTT.SSA SARA RUSCHIONI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	7
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	8
CAPITOLO 1 IL FRUMENTO E I SUOI INFESTANTI.....	9
1.1 Il frumento	9
1.2 La lavorazione del frumento	10
1.2.1 Il farinaccio di frumento	11
1.2.2 Proprietà del farinaccio.....	12
1.3 Infestanti del frumento	12
1.3.1 Famiglia Tenebrionidae	13
1.3.2 Fattori che influenzano lo sviluppo di infestanti	14
1.4 Lotta agli infestanti del frumento.....	15
1.4.1 Prevenzione.....	15
1.4.2 Monitoraggio.....	16
1.4.3 Controllo	18
1.5 I semiochimici.....	20
1.5.1 I feromoni	20
1.5.2 Allelochimici.....	21
1.5.3 Semiochimici come mezzi di controllo	21
CAPITOLO 2 <i>TENEBRIO MOLITOR</i> L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).....	23
2.1 Distribuzione e habitat.....	23
2.2 Morfologia.....	23
2.2.1 Uovo	24

2.2.2 Larva.....	25
2.2.3 Pupa.....	26
2.2.4 Adulto.....	27
2.3 Ciclo di sviluppo.....	27
2.4 Ecologia chimica.....	28
2.5 <i>Tenebrio molitor</i> nelle derrate.....	29
2.5.1 Mezzi di controllo.....	29
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI.....	31
3.1 Insetti e substrato di crescita.....	31
3.2 Biosaggi in Pitfall.....	31
3.3 Analisi statistica dei dati.....	33
CAPITOLO 4 RISULTATI.....	34
4.1 Indice di risposta in maschi e femmine.....	34
CAPITOLO 5 CONCLUSIONI.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	38

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 4-1 Indice di risposta negli adulti a dosi crescenti di volatili del farinaccio in pitfall a doppia scelta, coefficiente di determinazione (R^2) dell'analisi di regressione lineare log-(dose) e la sua significatività (p).....	35
---	----

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1 Cariosside di frumento	10
Figura 1-2 Diagramma di flusso indice lavorazione del frumento	11
Figura 1-3 Farinaccio di frumento	12
Figura 1-4 Principali semiochimici.....	20
Figura 2-1 Diversi stadi evolutivi di <i>Tenebrio molitor</i>	24
Figura 2-2 Diversi stadi larvali delle larve di <i>Tenebrio molitor</i>	26
Figura 3-1 Pitfall con beuta contenente farinaccio e beuta contenente aria come controllo..	32
Figura 4-1 Indice di risposta nelle femmine.....	35
Figura 4-2 Indice di risposta nei maschi	35

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

FAO	ORGANIZZAZIONE DELLE NAZIONI UNITE PER L'ALIMENTAZIONE E L'AGRICOLTURA
A _w	ATTIVITÀ DELL'ACQUA
IPM	INTEGRATED PEST MANAGEMENT
LDL	LOW DENSITY LIPOPROTEIN
HDL	HIGH DENSITY LIPOPROTEIN
IGE	IMMUNOGLOBULINE E
UR	UMIDITÀ RELATIVA
IR	INDICE DI RISPOSTA
LSD	LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae) è un coleottero dannoso per i cereali immagazzinati. Le infestazioni non solo causano perdite significative dovute al consumo dei prodotti, ma determinano anche elevate condizioni di temperatura e umidità che provocano la crescita accelerata di muffe, comprese specie tossiche (Germinara, et al., 2008; Germinara, et al., 2002). L'uso di semiochimici ha stimolato l'interesse su come questi potrebbero essere utilizzati per ottimizzare l'attuale monitoraggio, oltre che come mezzi di controllo diretti per gli insetti dannosi per le derrate (Phillips, et al., 1993; Germinara, et al., 2008). Fino ad ora sono stati condotti pochissimi studi sul comportamento di *T. molitor* nei confronti delle sostanze volatili emesse dai cereali. Nella letteratura è stato dimostrato che questi insetti fitofagi usano i volatili dei materiali vegetali per individuare substrati su cui cibarsi (Visser, 1986). La comprensione di come questi coleotteri possano rispondere a queste sostanze volatili può essere utile per lo sviluppo di efficaci strategie integrate di gestione degli insetti dannosi.

Nel presente studio sono quindi state analizzate le risposte comportamentali degli adulti di questo coleottero ai composti volatili emessi dal farinaccio di frumento, un sottoprodotto utilizzato principalmente in campo zootecnico.

Capitolo 1

IL FRUMENTO E I SUOI INFESTANTI

1.1 Il frumento

Il frumento è il cereale più coltivato e consumato in Italia. Appartiene al genere *Triticum* che, a sua volta, si suddivide in tre gruppi in base al numero di cromosomi (Cappelli & Vannucchi, 2016). Esistono infatti frumenti diploidi ($2n= 14$), tetraploidi ($2n= 28$), tra cui compare il frumento duro (*Triticum turgidum* spp. *durum*), prevalentemente primaverile ed esaploidi a cui appartiene il frumento tenero (*Triticum aestivum* spp. *aestivum*), prevalentemente invernale.

Il primo viene coltivato soprattutto nell'Italia meridionale e insulare, mentre il secondo nell'Italia centrale e settentrionale. Le differenze bromatologiche tra i due tipi di grano sono minime, oltre al diverso numero di cromosomi, il grano duro ha un contenuto leggermente superiore in proteine. Notevoli, invece, risultano le differenze nei prodotti della loro macinazione: il grano duro dà origine a semole e semolati da dai granuli grossi, con spigoli netti e colore leggermente ambrato, destinati principalmente alla produzione di paste; dal grano tenero si ottengono, invece, le farine, con granuli piccoli, tondeggianti e di colore bianco, dalla cui lavorazione si ricava il pane (Cappelli & Vannucchi, 2016). Nella cariosside di frumento si distinguono varie parti (Fig 1-1):

- l'involucro esterno, conosciuto comunemente come crusca è formato da tre strati: pericarpo, spermoderma e perisperma, costituiti prevalentemente da cellulosa e sali minerali;

- l'endosperma, che comprende verso la periferia lo strato aleuronico, costituito da cellule monostrato ricche di proteine ad alto valore biologico, lipidi, vitamine, sali minerali ed enzimi e al centro l'endosperma amilifero, con cellule contenenti granuli di amido e proteine di riserva;

- l'embrione (o germe), separato dall'endosperma da un rivestimento esterno detto scutello, rappresenta la parte da cui si forma una nuova pianta quando si verificano le condizioni per la germinazione ed ha un elevato valore in proteine e lipidi. La composizione media della cariosside è la seguente. Amido: 60-70%; proteine: 8-20%; zuccheri semplici: 2,5-4%; fibra:

2-2,5%; ceneri 1,5-2,2%. Per una buona conservabilità, il contenuto di umidità non deve eccedere il 12-13% (Toderi & D'Antuono, 2000)

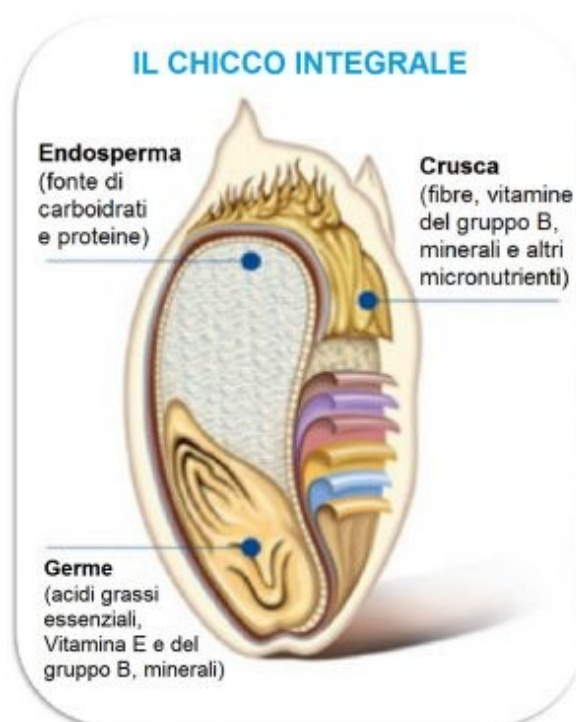


Figura 1-1 Cariosside di frumento

1.2 La lavorazione del frumento

Per la macinazione del frumento viene attualmente impiegata la “macinazione a cilindri e alta macinazione” (Cappelli & Vannucchi, 2016). Dopo il ricevimento, il frumento viene sottoposto ad un processo di ripulitura mediante vagli in corrente e passaggio su magneti e successivamente immesso in strutture per lo stoccaggio dove devono essere controllate e monitorate l’attività dell’acqua (A_w), la temperatura, il potenziale redox e le infestanti. A questo periodo di stoccaggio segue un’ulteriore pulitura (svecciatura) e l’umidificazione (condizionamento) con acqua potabile. Quest’ultima operazione ha lo scopo di migliorare la macinazione, facilitando la separazione dell’endosperma dalla regione corticale, e permette di ottenere sfarinati con maggiore attitudine all’impastamento per l’aumento della forza del glutine (umidificazione in profondità e stazionamento al caldo).

La macinazione vera e propria viene effettuata in mulini a cilindri o laminatoi ed è costituita da due fasi: la rottura e la rimacina. Successivamente si passa alla setacciatura, ovvero la separazione delle farine e delle semole dalle parti più grossolane e cruscali.

Attraverso il processo di macinazione si ottengono un prodotto principale (farina di frumento e semola di grano duro) e prodotti secondari, comunemente denominati sottoprodotti (crusca, cruschetto, farinetta, farinaccio, tritello). Questi ultimi vengono destinati principalmente al consumo animale (come materie prime per mangimi o mangimi semplici) (Fig.1-2)

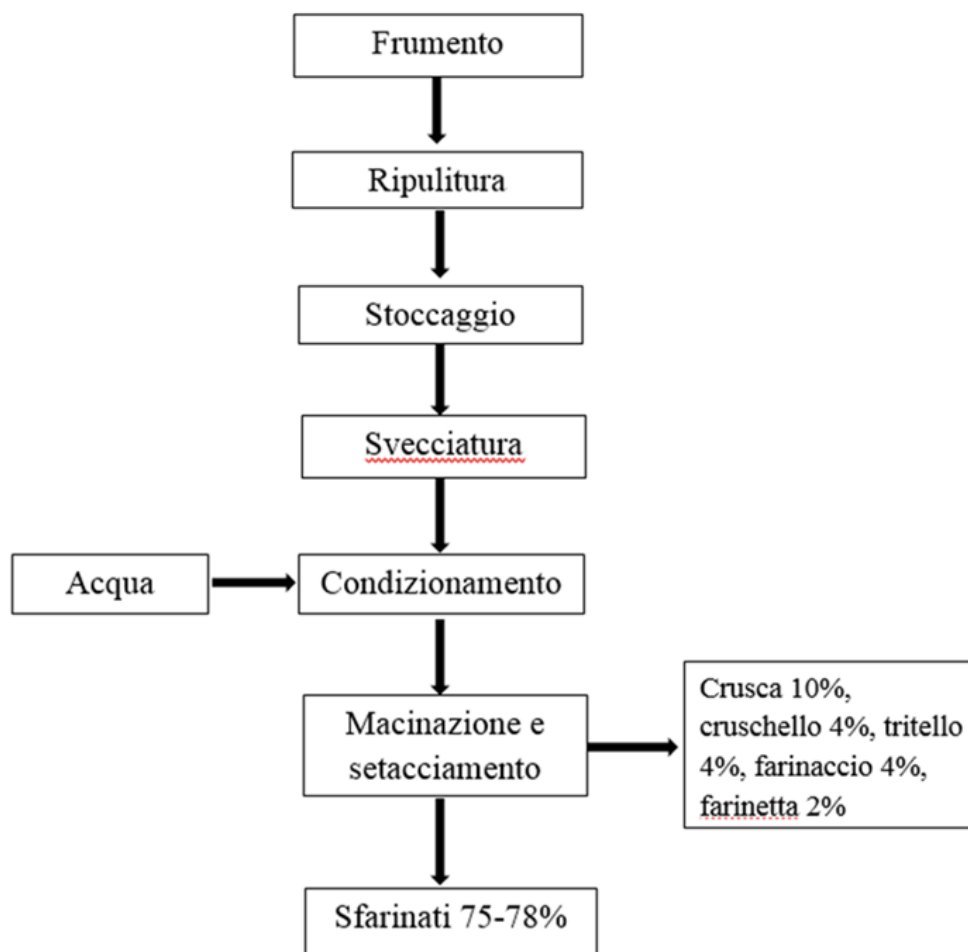


Figura 1-2 Diagramma di flusso della lavorazione del frumento

1.2.1 Il farinaccio di frumento

Il farinaccio rappresenta l'ultimo sottoprodotto della molitura prima della farina. Appare come uno sfarinato fine di colore nocciola, dall'odore gradevole e caratteristico e dal sapore dolciastro. Viene principalmente utilizzato nell'industria zootecnica come mangime per

diversi animali allevati, in particolare nell'alimentazione dei vitelli. Il suo utilizzo in quest'ambito è regolamentato dal Regolamento (UE) N. 575/2011 della Commissione del 16 Giugno del 2011 concernente il catalogo delle materie prime per mangimi.



Figura 1-3 Farinaccio di frumento

1.2.2 Proprietà del farinaccio

Questo sottoprodotto è ricco di amidi e fornisce un buon apporto di vitamina B. Il suo valore energetico (su 100g) è pari a 1526 kJ- 361 kCal. Il quantitativo di umidità è solitamente inferiore del 13%, mentre il contenuto di fibra grezza è del 3.0- 5.0% s.s., quello di proteine grezze 17.0-22.0% s.s. e la percentuale di estrattivi inazotati raggiunge anche il 60.0-80.0% s.s.

1.3 Infestanti del frumento

Il frumento viene stoccato e conservato all'interno di silos o magazzini, dove viene monitorata la temperatura mediante sonde poste a diverse altezze. Il molino rappresenta il punto cardine e più delicato della filiera produttiva della produzione di farina. Costituisce infatti la principale fonte di sviluppo, moltiplicazione e diffusione di insetti e di parassiti oltre che di animali indesiderabili, a causa sia di strutture non sempre all'avanguardia sul piano

tecnologico, sia di lavorazione di frumento già infestato da parassiti, sia dalla presenza di forti quantità di polvere conseguenti ad un sistema di aspirazione e captazione non sempre efficace, sia infine a sistemi di disinfestazione non sempre razionali e sistematici (Maroli & Khoury, 1995).

Diversi insetti possono attaccare il frumento arrecando danni anche notevoli (Toderi & D'Antuono, 2000). Oltre 100 specie di insetti infestanti sono state rinvenute nel grano immagazzinato e oltre 355 specie di acari (Sinha, 1961) sono state rinvenute nelle derrate alimentari, con 54 specie provenienti da grano immagazzinato e farina (Hughes, 1976). Moltissimo grano viene perso o danneggiato durante lo stoccaggio. Il range stimato va dal 5% degli Stati Uniti (Worley, 2002) al 10% in altri paesi sviluppati fino al 50% in paesi in via di sviluppo (Adam, et al., 2006).

Anche nei paesi con i numeri più bassi, comunque, come gli Stati Uniti, Kenkel et al. (1994) hanno stimato che le perdite dovute a insetti, muffa, riscaldamento e germinazione corrispondono ad approssimativamente 300 milioni di dollari solo per il grano duro rosso invernale e per il frumento primaverile. Quindi le perdite non sono basse neanche nei paesi sviluppati (Adam, et al., 2006)

Gli insetti più temibili sono la “calandra” o “punteruolo del frumento” (*Sitophilus granarius*) (L.) (Coleoptera: Curculionidae), i cui danni sono causati, all’interno dei silos o dei granai, dalle larve che si nutrono della parte amidacea delle cariossidi fino a svuotarle completamente, lo “struggigrano” (*Tenebroides mauritanicus*) (L.) (Coleoptera: Ostomidae), le cui larve attaccano l’embrione e la parte amidacea delle cariossidi, la “vera tignola del frumento” (*Sitotroga cerealella*) (L.) (Lepidoptera: Gelechiidae) che attacca le cariossidi sia in campo che nei granai, nutrendosi sempre della parte amidacea di esse e la “falsa tignola del frumento” (*Tinea granella*) (L.) (Lepidoptera: Tineidae), i cui danni sono determinati dalle larve che rodono le cariossidi superficialmente o vi penetrano.

Altri insetti che attaccano la cariosside di frumento sono la “tignola grigia delle provviste alimentari” (*Ephestia kuhniella*) (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), la “tignola fasciata del grano” (*Plodia interpunctella*) (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), il “punteruolo del riso” (*Sitophilus oryzae*) (L.) (Coleoptera: Curculionidae), il “bostrico del grano” (*Rhizopertha dominica*) (L.) (Coleoptera: Bostrychidae) (Toderi & D'Antuono, 2000).

1.3.1 Famiglia Tenebrionidae

La famiglia Tenebrionidae è una delle più importanti all’interno dell’ordine Coleoptera (Koleòs= guaina), infatti comprende circa 10.000 specie, di cui un centinaio sono associate alle derrate alimentari (Khoury & Bianchi, 2010). Si tratta di insetti fitofagi (adulti e larve).

L'adulto presenta cinque segmenti tarsali nelle zampe anteriori e mediane e quattro nelle posteriori. Le antenne sono filiformi o moniliformi e le elitre da sclerificate a fortemente sclerificate. La larva è elateriforme. Gli adulti dei Tenebrionidi secernono benzochinone, sostanza dall'odore sgradevole che impregna le derrate rendendole inutilizzabili (Khoury & Bianchi, 2010). Le principali specie infestanti degli sfarinati sono: *Tribolium confusum* (chiamato anche Tribolio della farina o Tribolio nero), *Tribolium castaneum* (chiamato anche Tribolio delle farine o Tribolio castano), *Tenebrio molitor* (chiamato anche Tenebrio mugnaio o Verme della farina) e *Gnathocerus cornutus* (chiamato anche Gnatocero cornuto) e sono state rinvenute sia in regioni tropicali che temperate.

Mentre le uova di tutte le specie sono identiche tra loro e caratterizzate da una dimensione di 0,6-0,7 mm, colore biancastro e sostanze viscoso che la ricoprono, larve pupe e adulti possono differire per alcune caratteristiche. In particolare, *T. molitor* è notevolmente più lungo delle altre tre specie, con adulti che raggiungono i 13-20 mm e larve lunghe 30-40 mm.

Sono tutti consumatori esterni, detriticoli su substrati già deteriorati e incapaci di forare gli imballaggi. I loro obiettivi principali sono sfarinati e granaglie già infestate.

1.3.2 Fattori che influenzano lo sviluppo di infestanti

Il sistema di stoccaggio e conservazione del grano è complesso e molti fattori possono influenzare lo sviluppo di insetti infestanti.

In America sono stati condotti studi che hanno dimostrato come la latitudine, la grandezza dei contenitori per la conservazione e il tempo di aerazione influenzano lo sviluppo della popolazione di insetti.

In Oklahoma il grano solitamente viene immagazzinato 3-4 settimane prima di quello raccolto in Kansas. Questo perché le calde temperature primaverili arrivano prima. Poiché in Oklahoma il grano viene immagazzinato prima, esso rimane al caldo per più tempo prima che possa raffreddarsi in autunno. In questo modo, l'ambiente rimane favorevole per la crescita della popolazione degli insetti per un tempo maggiore in Oklahoma che in Kansas (Flinn, et al., 1997)

Tuttavia, l'aerazione generata mediante l'utilizzo di ventilatori elettrici può essere utilizzata per raffreddare il grano prima, così da impedire la proliferazione di insetti. Infatti, sono stati condotti numerosi studi che hanno dimostrato che un'aerazione precoce permette l'immagazzinaggio sicuro del grano per diversi mesi (Mason, et al., 1994) (Reed & Harner, 1998).

Anche la grandezza del contenitore influisce molto sullo sviluppo degli insetti all'interno del grano. In autunno, la periferia della massa di grano si raffredda più rapidamente del centro.

Infatti, è stato dimostrato che la popolazione degli insetti continua ad aumentare nel centro dei contenitori anche nei freddi mesi invernali. Sappiamo che la grandezza del contenitore influenza la velocità con cui il grano si raffredda in autunno, se ne deduce quindi che il centro dei contenitori più grandi impiega un tempo maggiore a raffreddarsi rispetto ai piccoli (Flinn, et al., 1997).

Altri fattori che possono favorire lo sviluppo degli insetti all'interno degli edifici di stoccaggio sono la non adeguata progettazione dell'impianto, che potrebbe rendere difficili le operazioni di pulizia e facilitare l'insediamento di parassiti animali e la presenza di lampade sovrastanti i macchinari, in quanto potrebbero attrarre insetti caratterizzati da fototropismo. Anche una non corretta e tempestiva raccolta ed eliminazione dei rifiuti può determinare un incremento del numero di insetti infestanti.

1.4 Lotta agli infestanti del frumento

La protezione del frumento in magazzino dall'attacco degli insetti è necessaria, dato il lungo periodo di conservazione della granella.

L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) promuove l'uso della difesa integrata o Integrated Pest Management (IPM), definita dall'organizzazione stessa come "l'attenta considerazione di tutte le tecniche di controllo degli insetti infestanti disponibili e la successiva integrazione di appropriate misure che impediscano lo sviluppo di insetti e che mantengano l'uso di pesticidi e altri interventi entro livelli economicamente accettabili e che riducano o minimizzino il rischio per la salute umana e per l'ambiente. L'IMP enfatizza la crescita di un raccolto sano, con le più basse possibilità di rottura dell'agro-ecosistema e incoraggia meccanismi naturali di controllo degli insetti infestanti"

Il termine Integrated Pest Management e il suo acronimo IPM sono stati inclusi nella letteratura e accettati dalla comunità scientifica nel Novembre del 1972, con la pubblicazione del report *Integrated pest management* redatto dal Consiglio sulla Qualità Ambientale (Marcos, 1998).

La difesa integrata si basa su tre pilastri principali: prevenzione, monitoraggio e controllo.

1.4.1 Prevenzione

La prevenzione è alla base della difesa integrata. Consiste nell'impedire agli insetti infestanti di raggiungere i locali di stoccaggio del frumento attraverso la corretta progettazione

degli edifici e degli impianti, le adeguate norme di pulizia e l'utilizzo di materiali di confezionamento e di imballaggio che non favoriscano l'insediamento di infestanti.

Anche mantenere una corretta temperatura nei reparti di conservazione è importante, nello specifico essi dovrebbero essere ad una temperatura inferiore ai 15°C e con umidità relativa massima del 30%.

1.4.2 Monitoraggio

Il monitoraggio serve a tenere sotto controllo la popolazione degli insetti e ad evitare attacchi.

Per il monitoraggio è importante analizzare un campione rappresentativo della partita di merce da cui viene prelevato. Per questo campionamento vengono utilizzati diversi tipi di sonde:

- Sonda corta a tubi cilindrici senza partizioni (0.40 m)
- Sonda lunga a due tubi cilindrici con partizioni (2.5 m)
- Sonda per sacchi ad una sola finestra
- Sonda a scodella conica

I campioni elementari possono essere prelevati da frumento in sacchi utilizzando una sonda corta in sacchi a caso, da frumento accumulato alla rinfusa con una sonda a due tubi cilindrici con partizioni effettuando prelievi in cinque o più punti, da frumento in contenitori utilizzando sempre una sonda a due tubi cilindrici con partizioni su punti a caso e da frumento che si muove in flusso con campionatori automatici prelevando campioni in tempi diversi da una massa in movimento.

Un altro metodo per il monitoraggio è la setacciatura mediante vagli posti in serie con il successivo conteggio degli insetti rinvenuti. È piuttosto limitato e impreciso in quanto alcune specie di insetti vivono all'interno della cariosside e sfuggono al controllo.

Nel metodo biologico invece il campione viene posto in un ambiente favorevole allo sviluppo degli insetti (25°C e 75% U.R.) per circa 50-60 giorni, poi vengono eseguite setacciate ogni 3-4 giorni.

Tramite il metodo della colorazione, invece, la cariosside da esaminare viene schiacciata in una apposita macchina e eventuali insetti presenti all'interno vengono a contatto con una carta impregnata di ninidrina dando un caratteristico colore viola dovuto alla reazione data dagli amminoacidi di origine animali presenti.

La presenza di insetti determina anche una variazione nella concentrazione di CO₂ e delle differenze di temperatura nelle diverse parti di una massa di frumento, rilevabili

rispettivamente attraverso il metodo respirometrico e calorimetrico, che si basano entrambi sull'utilizzo di una sonda. Il metodo respirometrico non può essere usata per grani con più del 15% di umidità, perché ad elevati livelli di idratazione il grano da solo produce esso stesso più CO₂ (Semple, 1992).

È possibile anche sfruttare la gravità e separare le cariossidi attaccate da quelle sane utilizzando sostanze a peso specifico diverso. Immergendo il campione per 10 minuti nella soluzione i semi non danneggiati vanno a fondo, mentre quelli infestati tendono a galleggiare.

Tutti questi metodi prevedono l'utilizzo di campioni prelevati dalla massa di grano, ma questa procedura si è rivelata imprecisa e laboriosa. Diversi limiti nel campionamento sono stati rivelati da prove su scala (Wilkin & Fleurat-Lessard, 1991) come dimostrato da esperimenti condotti in una massa statica di grano (Fleurat-Lessard, et al., 1994). La raccolta e il prelievo di campioni sono stati utilizzati per la rivelazione degli insetti in masse statiche di grano. Sono stati aggiunti al grano insetti morti durante le operazioni di caricamento del contenitore in tre aliquote: 0.2 insetti/kg, 1 insetti/kg, 5 insetti/kg per ogni specie. I risultati hanno mostrato che, sebbene siano stati raccolti più campioni di quelli previsti nel campionamento standard e di grandi quantità di grano, il rilevamento è stato possibile solo alle più elevate densità di popolazione.

Il monitoraggio *in situ* degli insetti potrebbe permettere di superare molti dei limiti associati al campionamento. Le trappole e i rivelatori acustici hanno un elevato potenziale in questo campo (Fleurat-Lessard, et al., 1994).

I rivelatori acustici si basano sui suoni prodotti dagli insetti quando si muovono e si nutrono all'interno della massa di grano (Hagstrum, et al., 1990). Questo approccio ha un grande potenziale per l'incorporazione in un sistema di monitoraggio automatizzato per il controllo degli insetti in situ, installato direttamente nei contenitori del grano (Fleurat-Lessard, et al., 1994).

Dall'agosto del 1994 tra i metodi analitici dei cereali e derivati è ufficialmente annoverato il filth-test. Il filth-test è un prezioso strumento per evidenziare la qualità igienica del prodotto e delle materie prime da cui ne deriva; questa analisi può essere considerata un mezzo per monitorare sia la materia prima, sia la sanità ambientale (Platè, 1983). Tale metodo si basa sulla solubilizzazione dell'alimento mediante trattamento chimico (digestione acido-nitrica), separazione dei frammenti mediante filtrazione e flottazione, raccolta su un vetrino delle impurità e osservazioni allo stereo-microscopio.

Infine, è possibile effettuare il monitoraggio degli ambienti tramite trappole. Sono ampiamente usate trappole pitfall o a sonda affondate sulla superficie o ad una bassa profondità in masse di grano di molte migliaia di tonnellate. I risultati pubblicati da Loschiavo (1975), Burkholder (1983), Cogan e Wakefield (1987) hanno confermato che sia le pitfall che le trappole a sonda o una combinazione delle due sono molto più efficaci nel rilevamento degli insetti in una massa statica di grano rispetto ai tradizionali metodi di campionamento (Fleurat-Lessard, et al., 1994).

1.4.3 Controllo

Il controllo viene attuato impiegando una serie di mezzi fisici, biologici, chimici, biotecnici e meccanici.

I mezzi fisici includono:

-L'impiego delle alte temperature, che possono essere raggiunte mediante essiccazione al sole (Murdock & Shade, 1991), aria calda in letto fluido (Fields, 1992), trattamento con microonde (15-180 s) (Warchalewski, et al., 2000) alla potenza di 2,45 GHz (Vadivambal, et al., 2008) e radiazioni ionizzanti (da 0.05 kGy per alcuni coleotteri fino a 0.45 kGy per alcuni lepidotteri) (Hallman, 2013) di diversa natura, dai raggi γ ai raggi x.

Le radiazioni ionizzanti risultano particolarmente interessanti in quanto subito dopo la loro scoperta alla fine del diciannovesimo secolo è stato osservato che gli organismi possono essere soddisfacentemente sterilizzati con dosi di radiazioni relativamente bassi che hanno mostrato non avere grossi effetti sugli organismi (Hunter, 1912).

-L'impiego delle basse temperature tramite rimescolamento, ventilazione e ventilazione refrigerata (Fields, 1992). Due sono gli effetti fondamentali delle basse temperature: 1) la diminuzione del tasso di sviluppo e fecondità e 2) diminuzione della sopravvivenza (Jayas, et al., 1995)

-Forza centrifuga che determina uno spostamento verso l'esterno, con successiva morte e sminuzzamento degli insetti infestanti. Uno studio sulla calandra del grano (*Sitophilus granarius*) ha dimostrato che per uccidere gli adulti e gli insetti ad uno stadio immaturo non protetti basta una forza d'impatto relativamente piccola, mentre per quelli immaturi che vivono all'interno del frumento è necessaria una forza abbastanza intensa da causare una eccessiva rottura del grano (Bailey, 1962).

-Polveri inerti che provocano la morte per essiccamento. L'aerogel di silice assorbe le particelle ceree dalla superficie della cuticola (Le Patourel, et al., 1989) e sebbene le farine di diatomee, caratterizzate da piccole particelle dense di biossido di silicio, siano considerate responsabili dell'abrasione della cuticola (Alexander, et al., 1944), la loro funzione è anche

quella di assorbire cera (Ebeling, 1971). Tuttavia, l'aerogel di silice è più efficiente delle farine diatomee e delle altre polveri inerti, poiché mantiene la sua attività anche a livelli elevati di umidità (Marceljski & Korunic, 1971).

-Atmosfera controllata che comporta l'alterazione della proporzione dei normali gas atmosferici (nitrogeno, ossigeno, CO₂) per creare una atmosfera letale per gli insetti del frumento immagazzinato (Bailey & Banks, 1980). La composizione modificata, generalmente prodotta artificialmente, viene inoltre mantenuta invariata generando i gas desiderati (CO₂ o N₂) (Navarro, 2006). A determinare la morte degli insetti è il soffocamento (N₂) e la perdita di acqua (CO₂).

I **mezzi biologici** si basano sulla predazione da parte di parassitoidi (o nemici naturali) degli insetti infestanti le derrate. I parassitoidi, a differenza dei parassiti, depongono le uova nel/sul corpo della larva ospite portandola lentamente alla morte. Le specie di nemici naturali variano significativamente nella loro biologia e comportamento e anche nel loro potenziale di riduzione degli insetti infestanti (Scholler, et al., 1997).

I **mezzi biotecnici**, invece, sfruttano feromoni e caïromoni, sia per innescare le trappole sia come mezzo di controllo diretto, sfruttando, ad esempio, la confusione sessuale. Quest'ultima è una tecnica che consiste nell'impiego di elevate dosi di feromone sessuale di sintesi al fine di impedire ai maschi di localizzare le femmine, inibendoli e inattivandoli, con conseguente diminuzione dell'attività sessuale.

Per i **mezzi chimici** la normativa italiana distingue due categorie di formulati:

- I prodotti fitosanitari (Direttiva 91/414/CEE e Regolamento CE 1107/2009)
- I presidi medico chirurgici (PMC: D.P.R 392 del 6 Ottobre 1998; Biocidi: Direttiva 98/8/CE e D.Lgs 25 Febbraio 2000 n.174)

I Primi comprendono tutte le sostanze attive destinate a proteggere i prodotti vegetali da tutti gli organismi nocivi o a prevenirne gli effetti, mentre i secondi includono sia insetticidi per uso domestico e civile, sia topicidi e raticidi, sempre ad uso domestico e civile. Per i cereali, incluso il frumento, è possibile intervenire con la fumigazione di formulati a base di idrogeno fosforato o fosfina. È stato dimostrato che fumigazioni con quest'ultima influenzano lo sviluppo di *Cryptolestes ferrugineus* (L.) (Coleoptera: Cucujidae), *Lasioderma serricornis* (L.) (Coleoptera: Anobiidae), *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) (Rejendran, et al., 2004).

I prodotti fitosanitari sono disponibili in varie forme: emulsione concentrata da diluire in acqua, in polvere, in compresse, in paste, in gel, come lacche. Queste ultime, ad esempio, vengono sempre impiegate per i silos verticali, distribuite sui nastri di trasporto degli impianti di stoccaggio.

Le modalità di azione possono essere diverse, vi sono infatti gli insetticidi neurotossici diretti (provocano la degenerazione di membrane, gangli e nervi), neurotossici indiretti (bloccano l'attività dell'acetilcolinaesterasi) e le piretrine (modulano il canale del Na).

1.5 I semiochimici

Con il termine semiochimici (σημείον semeion "segnale") vengono indicati tutti i composti chimici che regolano le interazioni tra organismi viventi, nei quali sono in grado di indurre modificazioni di carattere etologico, fisiologico o anatomico (Masutti & Zangheri, 2001). Vengono generalmente classificati in *feromoni* e *allelochimici*. I primi favoriscono la comunicazione di individui appartenenti alla medesima specie, mentre i secondi hanno un effetto interspecifico e mediano la comunicazione tra specie e regni diversi.

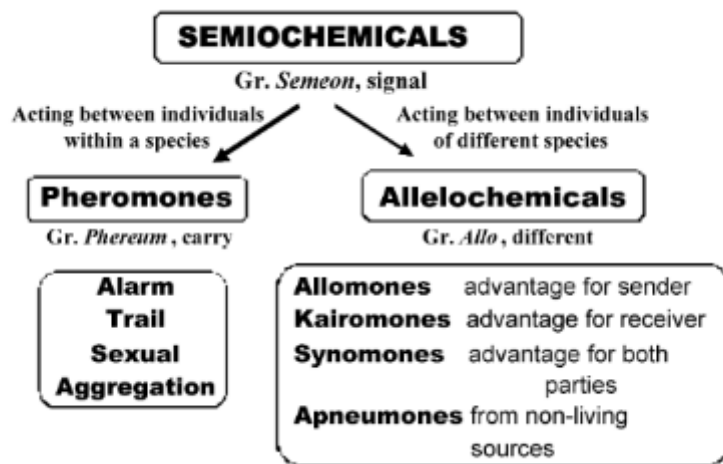


Figura 1-4 Principali semiochimici

1.5.1 I feromoni

Tra i feromoni ogni miscela si contraddistingue per composizione e concentrazione delle sostanze che la compongono ed è strettamente specie-specifica (Birch & Haynes, 1984).

A seconda del tipo di risposta comportamentale che sono in grado di indurre, si distinguono diversi tipi di feromoni:

- feromone sessuali
- feromone di aggregazione
- feromone di dispersione
- feromone di aggressione o di allarme
- feromone traccia

I *feromoni sessuali* regolano l'accoppiamento, che avviene dopo due importanti fasi comportamentali: una prima fase di localizzazione del partner, mediata da composti chimici definiti attrattivi sessuali (effetto a distanza) e una seconda fase di corteggiamento, mediata da specifici feromoni di corteggiamento (effetto più ravvicinato). Per evitare che l'accoppiamento possa avvenire tra individui dello stesso sesso, alcuni insetti emettono anche dei feromoni di contatto. Da un punto di vista chimico i feromoni sessuali sono spesso miscele di alcoli, aldeidi ed esteri che possono essere prodotti dalle femmine, dai maschi o coinvolgere entrambi i sessi in un vero e proprio "colloquio chimico".

I *feromoni di aggregazione* sono composti che inducono i membri di una stessa specie ad affluire e concentrarsi nei pressi della sorgente emettrice. Sono, ad esempio, molto frequenti nei Coleotteri.

I *feromoni di dispersione* stimolano un comportamento che limita l'aggregazione e, quindi, la competizione intraspecifica (Birch & Haynes, 1984).

1.5.2 Allelochimici

Gli allelochimici includono gli allomoni, i cairomoni e i sinomoni.

I primi sono segnali utili all'organismo che li emette. Fanno parte di questa categoria tutte quelle sostanze chimiche di tipo difensivo, più o meno volatili, che sollecitano l'allontanamento di altre specie a vantaggio di quella emittente (Tremblay, 1999).

I cairomoni sono segnali favorevoli solo all'organismo che li riceve (Tremblay, 1999).

I sinomoni sono favorevoli sia all'organismo emittente che al ricevente (Tremblay, 1999).

1.5.3 Semiochimici come mezzi di controllo

Lo sviluppo di sistemi di gestione degli insetti infestanti basati sui semiochimici nelle derrate alimentari si sta rendendo necessario a causa della diminuzione dell'utilizzo di pesticidi tradizionali. L'applicazione di questi composti che ha avuto maggior successo è stato l'utilizzo degli attrattivi come trappole per indagare e monitorare gli insetti infestanti nei luoghi di stoccaggio (Phillips, 1997; Norin, 2007).

I semiochimici sono altamente efficaci in piccolissime quantità, dell'ordine di frazioni di microgrammo, non sono tossici e, a differenza degli agrofarmaci, non determinano effetti secondari indesiderati a carico di eventuali nemici naturali con cui possono giungere in contatto (Franco, et al., 2009)

L'applicazione dei feromoni di sintesi è ancora oggi in gran parte mirata ai programmi di monitoraggio finalizzati ad intercettare tempestivamente le specie di nuova o temuta introduzione (Millar, 2012) e per seguire le dinamiche delle specie già presenti (Suma, et al., 2013).

Capitolo 2

TENEBRIO MOLITOR L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

2.1 Distribuzione e habitat

Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae) è una specie nativa dell'Europa, tuttavia ora è cosmopolita, con una maggiore diffusione nelle regioni temperate e nell'emisfero settentrionale. È olometabolo ed è ritenuto l'insetto infestante più dannoso del grano immagazzinato in Sud America (Schroeckenstein, et al., 1990). È incapace di riprodursi ai tropici.

2.2 Morfologia

T. molitor è il più grande grande tra i coleotteri delle derrate alimentari. Le uova hanno le dimensioni di 0,6-0,7 mm, sono di colore bianco e ricoperte di sostanze viscosi. La larva è elateriforme, lunga 30-40 mm e di colore giallo rossiccio. La pupa ha una lunghezza di 15-20 mm e l'adulto raggiunge i 13-20 mm di lunghezza, ha una forma allungata e si contraddistingue per il colore scuro brillante e le antenne filiformi.



Figura 2-1 *Diversi stadi evolutivi di Tenebrio molitor. Da sinistra: larva matura, pupa e adulto.*

2.2.1 Uovo

I costituenti principali dell'envelope (membrana vitellina e corion) delle uova di *T. molitor* sono le proteine strutturali ottenute come tre differenti frazioni proteiche. Il residuo insolubile è caratterizzato dalla frazione delle proteine che risulta insolubile in un solvente di guanidina tiocinato, mentre le proteine che si dissolvono nel solvente vengono convertite in derivati di S-carbossimetil e divise in due frazioni di proteine solubili, le frazioni CM I e II (Kawasaki, et al., 1975).

Anche le uova, così come le larve e gli adulti, hanno bisogno di protezione contro i nemici naturali, come i parassiti, i predatori e i microbi (Jacobs, et al., 2010). I meccanismi di difesa maggiormente conosciuti sono la scelta del sito di ovideposizione da parte della madre (Janz, 2002), le barriere fisiche che coprono le uova come il guscio (Stanley & Miller, 2006) e l'investimento parentale nella forma di secrezioni difensive applicate alle uova (Boos, et al., 2014). Recenti progressi, comunque, hanno messo in evidenza il fatto che le uova stesse sono molto lontane dall'essere prive di difese e, anzi, possono ospitare forti difese endogene (Jacobs & van der Zee, 2013). Uno di questi mezzi di difesa endogeni è la secrezione di cuticola sierosa, che le protegge dalla disidratazione (Jacobs, et al., 2013). Però, poiché c'è un'elevata espressione del fattore dorsale NF-kappa-B, che è noto per il suo ruolo nell'induzione del gene per l'immunità (Ferrandon, et al., 2007), è stato proposto che la cuticola sierosa potrebbe anche proteggere dalle infezioni.

L'attività del gene per l'immunità nelle uova non viene attivata solo dall'attacco da parte di un patogeno, ma può anche essere incrementata dall'innesco immunitario parentale. Questo innesco immunitario parentale aumenta l'attività immunitaria nelle uova deposte da genitori immunizzati, anche in assenza di infezione nell'uovo (Little & Kraaijeveld, 2004). L'innesco prepara le uova per l'imminente pericolo innescando l'espressione differenziale dei geni immuno-correlati nelle uova e/o attraverso la trasmissione diretta dei fattori immunitari nelle uova (Freitak, et al., 2014; Knorr, et al., 2015; Trauer-Kizilelma & Hilker, 2015; Trauer & Hilker, 2013; Zanchi, et al., 2011).

2.2.2 Larva

La larva matura è giallo-marrone chiaro, può essere lunga dai 20 ai 40 mm e può pesare tra i 130 e 160 mg.

Inizialmente le larve mangiano le germe del grano immagazzinato, poi possono alimentarsi su un gran numero di substrati come chicchi di grano macinati, farina, tabacco e derrate alimentari in generale.

Le larve sono molto voraci e estremamente resistenti alle basse temperature, possono infatti restare vive per 80 giorni a -50°C.

Nel processo di ecdisi larvale, gli ormoni della muta giocano un ruolo importante nel permettere alle larve di procedere fino allo stadio successivo (Delbecque, et al., 1978). Tuttavia, le caratteristiche dei differenti stadi larvali restano ancora poco chiare. Inoltre, il numero preciso di stadi alla temperatura ottimale di 25°C è ancora oggetto di dibattito. Park et al. hanno portato avanti uno studio per identificare le caratteristiche delle larve di *T. molitor* nei differenti stadi larvali e determinare il numero medio di stadi (Park, et al., 2014).

Lo studio ha dimostrato che la lunghezza del corpo di *T. molitor* aumenta gradualmente raggiungendo la lunghezza massima nel diciassettesimo stadio e decrescendo successivamente. È stato infatti osservato come le larve con più di 17 stadi fossero sottosviluppate e corte di quelle nel diciassettesimo. A causa dell'abbondante verificarsi sia dell'impupamento che della mortalità tra gli stadi 18 e 20, si è avuto un numero insufficiente di larve per determinare accuratamente la lunghezza delle larve dopo il diciassettesimo stadio.

Si è potuto anche osservare che le larve sono bianche nel primo stadio, ma diventano gradualmente marroni a partire dal secondo stadio. Fatta eccezione per la variazione di colore, non sono state rilevate differenze significative nelle caratteristiche morfologiche (Park, et al., 2014).



Figura 2-2 *Diversi stadi larvali delle larve di Tenebrio molitor*

Queste larve vengono usate come mangime per gli animali in molti paesi (Cotton, 1927) e poiché hanno un contenuto elevato di proteine e grassi e consumano una gran quantità di fibre, esse rappresentano una buona fonte alimentare anche per l'uomo (Finke, 2002). Inoltre, sono ricche di acido oleico, che ha la capacità di abbassare i livelli di colesterolo LDL e aumentare quelli dell'HDL nel sangue (Yoo, et al., 2013)

2.2.3 Pupa

La pupa appena formata appare bianca con una superficie brillante. La cuticola, in alcune regioni, incluso il protorace, è caratterizzata da una serie di ondulazioni poco profonde e presenta alcune setole. Fatta eccezione per queste caratteristiche, appare otticamente liscia. Durante la muta vi sono due depressioni prominenti sul protorace che scompaiono circa quattro ore dopo (nei campioni tenuti a 15°C).

Circa 10-12 ore dopo la cuticola si scurisce fino ad una colorazione paglierino chiaro. Ma la superficie resta brillante per circa 14 ore. Dopo 30 ore, diventa progressivamente più opaca e smette di essere lucida.

La bagnabilità (water contact angle) delle pupe recentemente mutate è risultata essere 112° (advancing) e 100° (retreating). Una piccola quantità di aria intrappolata è visibile quando la cuticola è immersa in acqua e questo, unito alla bassa isteresi dell'angolo di contatto, indica che la superficie è abbastanza liscia. I reali angoli di contatto della superficie sono sicuramente vicini a 90° e questo suggerisce che la superficie della cuticola è composta principalmente di gruppi idrofobici -CH₃ o altri con simili proprietà idrorepellenti.

Le pupe mutate di recente sono resistenti all'essiccazione. Il tasso medio di perdita d'acqua in aria secca a 25°C è circa 0.05mg/cm²/ora. Questa immagine è stata ottenuta utilizzando il metodo di Wigglesworth (1945), con il pentossido di fosforo come agente essiccante (Wigglesworth, 1945). La resistenza all'essiccamento può essere eliminata lavando le pupe con cloroformio o benzene per 2 minuti.

Andersen et al. hanno riportato che pezzi intatti di cuticola provenienti da larve e pupe di *T. molitor* presentavano una composizione amminoacidica quasi identica. Da questo è stato possibile dedurre che avessero set di proteine simili, diversi da quelli della cuticola degli adulti (Andersen, et al., 1973). La cuticola degli adulti è caratterizzata da un contenuto elevato di glicina, mentre la cuticola di larve e pupe ha elevate quantità di alanina (Andersen, et al., 1973; Andersen, et al., 1995).

2.2.4 Adulto

Gli adulti di *T. molitor* sono di colore nero brillante, lunghi dai 13 ai 20 mm e larghi dai 4,5 ai 6 mm. La sua conformazione ricorda un carabide, dai quali differisce, però, per il clipeo sporgente ai lati del capo. Quest'ultimo copre parzialmente le antenne, che sono filiformi e costituite da 11 antennomeri che si ingrossano verso la punta.

Il protorace è ampio e le elitre sono fortemente sclerificate.

2.3 Ciclo di sviluppo

Il ciclo di vita di *T. molitor* è di lunghezza variabile, dai 280 ai 630 giorni. Le larve emergono dopo 10-12 giorni (alla temperatura di 18-20°C) e maturano dopo un numero variabile di stadi (da 8 a 20), tipicamente dopo 3-4 mesi (a temperatura ambiente), ma lo stadio di larva può durare fino a 18 mesi. Come già detto, *T. molitor* presenta plasticità nel numero di stadi necessari per il suo sviluppo (Esperk, et al., 2007). Vi possono essere da 9 fino a più

di 20 stadi (Cotton & St George, 1929) in base a diversi fattori come la temperatura (Ludwig, 1956), l'umidità (Urs & Hopkins, 1973; Murray, 1968), il fotoperiodo (Tyshchenko & Sheyk Ba, 1987), la concentrazione di ossigeno (Loudon, 1988; Greenberg & Ar, 1996), densità di popolazione (Connat, et al., 1991), l'età parentale (Ludwig, 1956; Ludwig & Fiore, 1960) e la qualità del cibo (Steilwaag-Kiuler, 1954). Tuttavia, è stato osservato che il numero di stadi aumenta in condizioni avverse (Esperk, et al., 2007). È stato riportato che tempo di sviluppo larvale è influenzato da fattori ambientali in maniera simile al numero di stadi. A densità elevate, è stato osservato che le larve effettuano mute extralarvali (Weaver & McFarlane, 1990; Connat, et al., 1991; Kotaki & Fujii, 1995) e che c'è un aumento della mortalità e del cannibalismo (Savvidou & Bell, 1994). *T. molitor* è molto cannibale nel periodo successivo alle mute larvali e durante lo stadio di pupa.

È stato anche riportato che il nutrimento ha effetto sul numero di stadi e sul tempo totale di sviluppo (Steilwaag-Kiuler, 1954), ma gli effetti delle diverse diete sulle performance dello sviluppo larvale in *T. molitor* non sono mai state determinate statisticamente. Anche le informazioni sul tempo di sviluppo e sulla lunghezza degli stadi sono carenti.

Lo stadio di pupa, invece, dura 7-9 giorni alla temperatura di 25°C e fino a 20 giorni a temperature più basse. Gli adulti vivono per 2-3 mesi.

Le femmine possono deporre fino a 600 uova durante la loro vita. I maschi di *T. molitor* preferiscono le femmine mature a quelle immature. Infatti, l'accoppiamento avviene solitamente dopo un periodo di maturazione durante il quale gli oociti crescono (Ridley, 1989). Le femmine immature tendono ad avere oociti sottosviluppati e questo può limitare la loro fertilità. Le femmine appena emerse non raggiungono la maturità sessuale prima dei 5 giorni successivi all'emersione (Happ & Wheeler, 1969). Sebbene quindi le femmine immature siano in grado di accoppiarsi, sembrano essere meno ricettive di quelle mature.

2.4 Ecologia chimica

T. molitor produce diversi tipi di feromoni, inclusi entrambi i feromoni innescanti che stimolano la maturazione riproduttiva e feromoni di rilascio che mediano l'aggregazione (Weaver, et al., 1989), l'accoppiamento (Bryning, et al., 2005) e il comportamento epidittico (Weaver, et al., 1989).

Uno dei feromoni prodotti dalle femmine è stato identificato come (4R)-(+)-4-metyl-1-nonanol (Tanaka, et al., 1987; Tanaka, et al., 1989). Sono stati condotti diversi studi sul ruolo e sulla regolazione del feromone femminile in *T. molitor*. Nella maggior parte di questi

la produzione di feromone è stata quantificata mediante biosaggio con un'univoca interpretazione dei risultati.

Alcuni studi hanno proposto anche l'esistenza di un afrodisiaco volatile prodotta dai maschi che potrebbe agire come deterrente per gli altri maschi della specie nel tentare l'accoppiamento con una femmina recentemente accoppiata (Happ, 1969). Inoltre, questo afrodisiaco non è ancora stato isolato o identificato.

L'umidità relativa è correlata positivamente alla fertilità e all'attività dell'adulto.

2.5 *Tenebrio molitor* nelle derrate

T. molitor non è in grado di forare gli imballaggi, è un consumatore esterno ed è detriticolo su substrati già deteriorati, in particolare *Zea mays* (L.) (Poales: Poaceae), *Triticum aestivum* (L.) (Poales: Poaceae) e *Glycine max* (L.) (Fabales: Fabaceae) (Punzo & Mutchmor, 1980; Fazolin, et al., 2007; Cosimi, et al., 2009).

È una specie fortemente sinantropa, quindi è stata rinvenuta anche nelle dispense delle abitazioni e non solo in molini e magazzini di stoccaggio. Attacca soprattutto derrate come farina, pasta, pane e biscotti. La presenza di *T. molitor* può determinare la contaminazione delle derrate con frammenti di esoscheletro, feci e indirettamente con microrganismi saprofiti che determinano la riduzione della qualità dell'alimento (Barnes & Silva-Jothy, 1999; Loudon, 1988). *T. molitor* causa perdite fino al 15% nella produzione del grano e della farina in tutto il mondo (Dunkel, 1992; Flinn, et al., 2003; Neethirajan, et al., 2007)

Oltre ai danni economici, è stato dimostrato che l'inalazione di frammenti di esoscheletro di questo insetto possono attivare le immunoglobuline E (IgE), causando l'insorgere di allergie, anche in soggetti che non avevano mai mostrato nella loro storia clinica casi di allergie respiratorie di origine alimentare (Nebbia, et al., 2019). Questa allergia si è verificata di frequente tra coloro che lavorano a contatto con i cereali, tanto da venire classificata come malattia professionale (Schroeckenstein, et al., 1990).

2.5.1 Mezzi di controllo

T. molitor viene controllato principalmente con insetticidi chimici, ma questo metodo ha delle restrizioni se applicato ad insetti delle derrate (Shaaya, et al., 1997) a causa della tossicità e della resistenza da parte degli insetti (Isman, 2006). Il controllo chimico degli insetti può essere ottenuto con bromuro di metile e trattamento con fosfina, tuttavia i fumiganti non possono uccidere le uova degli insetti delle derrate e vi sono stati molte discussioni sull'impiego di insetticidi, in particolare riguardo a residui, impatto ambientale e tossicità per

l'uomo (Shaaya, et al., 1997; Arthur, 1996). Prodotti più selettivi e biodegradabili, compresi i “pesticidi verdi”, possono ridurre l'uso di prodotti chimici sintetici nei magazzini (Isman, 2000; Martínez, et al., 2015).

Gli olii essenziali delle piante hanno proprietà ecotossicologiche favorevoli (bassa tossicità per l'uomo, minore degradazione e impatto ambientale inferiore) che li rendono adatti alla gestione degli insetti nell'agricoltura organica (Chermenskaya, et al., 2010; Zanuccio, et al., 2016) e molti studi si sono focalizzati sulla possibilità di applicarli al controllo degli insetti del grano immagazzinato (Zapata & Smagghe, 2010; Stefanazzi, et al., 2011; Jemâa, et al., 2012). In particolare, Plata-Rueda et al. hanno analizzato l'attività insetticida dell'olio essenziale di aglio su *T. molitor* e hanno visto che questo provoca mortalità e repellenza negli stadi di larva, pupa e adulto (Plata-Rueda, et al., 2017).

Anche la pulizia dei locali vuoti e dei macchinari risulta fondamentale per evitare la proliferazione di questi insetti, così come la riparazione di crepe e fessure.

L'atmosfera controllata può essere un buon metodo per limitarne l'attività, in quanto è stato osservato come a bassi livelli di ossigeno la mortalità sia più alta e le anomalie nello sviluppo più comuni (Loudon, 1988). L'esposizione di *T. molitor*, pupe o larve con più di 60 giorni, a campi elettrici della radiofrequenza di 49 MHz comporta anomalie nell'appendice cefalica e in quella toracica. La mortalità delle larve e il manifestarsi di appendici anormali nell'adulto aumentano in maniera direttamente proporzionale con l'aumentare del livello di energia di radiofrequenza applicata. Modificazioni morfologiche simili negli adulti di *T. molitor* sono prodotte dall'applicazione diretta di calore alle appendici larvali. Le modificazioni morfologiche nelle appendici degli adulti sono quindi, probabilmente, il risultato di danni provocati dal calore durante il periodo di sviluppo larvale (Rai, et al., 1971).

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

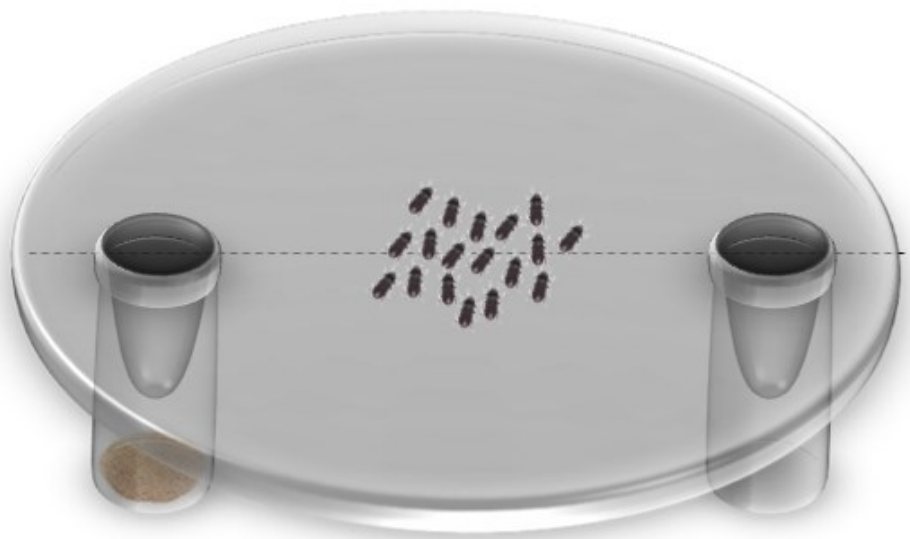
3.1 Insetti e substrato di crescita

Per l'esperimento sono stati utilizzati adulti di *Tenebrio molitor* di 3-4 giorni, divisi per sesso. *T. molitor* è stato acquistato presso un negozio di animali locale (PlanetFish&Co- Ancona) e allevato su farinaccio di frumento per diverse generazioni ad una temperatura di $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ di umidità relativa (UR) e un fotoperiodo 0:24 ore di buio. L'acqua è stata fornita due volte a settimana attraverso pezzi di carota sbucciati messi direttamente nel farinaccio. Il farinaccio è stato acquistato presso un molino locale ("Molino Agostini"-Itali cer Soc. Coop. Agr, San Biagio di Osimo, AN) ed è stato conservato a temperatura ambiente prima dell'uso.

3.2 Biosaggi in Pitfall

La risposta comportamentale degli adulti di *T. molitor* alle differenti dosi di farinaccio è stata misurata usando pitfall a doppia scelta, simili a quelle descritte nello studio di Phillips et al. (1993), e in quello di Germinara et al. (2008). Per effettuare il test sono stati utilizzati, come arene, dei contenitori in acciaio ($\varnothing = 32 \text{ cm} \times h = 7 \text{ cm}$) con due buchi diametralmente opposti ($\varnothing = 3 \text{ cm}$), situati a 3 cm dalla parete laterale. Il fondo dell'arena è stato coperto con carta filtrante (Whatman No.1) per garantire una superficie uniforme e per facilitare i movimenti degli insetti (Pike, 1994; Germinara, et al., 2008). Gli stimoli per il test, 1, 10, 50, 100 e 200g di farinaccio (Tab. 3.1) e aria come controllo, sono stati posti in beute di vetro da 500 ml posizionate sotto ogni buco (Fig. 3.1). La superficie interna della parte superiore di ogni collo di beuta è stata cosparsa di olio minerale per evitare che gli insetti catturati potessero arrampicarsi e tornare nell'arena. Per effettuare il biosaggio in pitfall sono stati utilizzati 20 insetti per ogni test, con maschi e femmine separati, e sono state effettuate 5 repliche per ogni test. Gli insetti sono stati tenuti a digiuno nelle quattro ore precedenti al test, dopodiché sono stati posizionati nel centro dell'arena, coperti da una piastra petri capovolta ($\varnothing = 3 \text{ cm}$, $h = 1,2 \text{ cm}$), e sono stati lasciati in acclimatamento per 30 minuti. Successivamente, sono stati liberati

e testati per 3 ore, al buio, con la temperatura di $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e l'umidità relativa di $60 \pm 5\%$. Gli esperimenti sono stati eseguiti tutti allo stesso orario, tra le 10:00 e le 16:00. Durante il saggio, l'arena è stata coperta con un coperchio d'acciaio per evitare la fuga degli insetti.



*Figura 3-1 Pitfall a doppia scelta utilizzata come arena per il test condotto. La pitfall reca due fori diametralmente opposti e sotto quello di sinistra è posizionata la beuta contenente il farinaccio di frumento, mentre sotto quello destra la beuta contenente aria come controllo. Al centro dell'arena sono presenti i venti adulti di *Tenebrio molitor*, liberi di andare verso l'una o l'altra sostanza. I colli delle beute sono cosparsi di olio minerale per evitare che gli insetti possano tornare nell'arena.*

3.3 Analisi statistica dei dati

In ogni prova è stato calcolato un indice di risposta (RI) utilizzando la seguente formula:

$$RI = [(T - C) / Tot] \times 100$$

Dove: T corrisponde al numero dei campioni che hanno risposto al trattamento, C è il numero di quelli che hanno risposto al controllo e Tot consiste nel numero totale di insetti che sono stati rilasciati all'inizio dell'esperimento (Phillips, et al., 1993). Valori positivi di RI indicano un'attrazione verso il trattamento, mentre valori negativi indicano repellenza. Il significato dell'RI medio in ogni prova con Pitfall a doppia scelta è stato valutato con il *test di Student* per campioni appaiati (Phillips, et al., 1993). I dati sono stati sottoposti ad un'analisi di regressione lineare per valutare gli effetti della dose sulla risposta degli insetti. I più significativi valori medi positivi e negativi del RI sono stati analizzati attraverso un'analisi della varianza e conseguentemente classificati utilizzando il least significant difference (LSD) multiple range test (P=0.05).

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 Indice di risposta in maschi e femmine

Il grafico di Figura 4-1 mostra gli indici di risposta ottenuti dalle femmine di *Tenebrio molitor*. In ascissa sono state poste le varie dosi di farinaccio testate (1g, 10g, 50g, 100g e 200g), mentre sull'asse delle ordinate gli indici di risposta in ordine crescente da 0 a 90. Si osserva che nelle femmine l'RI va da 46 nella dose di 1g a 72 nella dose di 200g. Per le prime dosi l'IR non aumenta all'aumentare della concentrazione, infatti, nella dose di 1g è di 46, si mantiene costante in quella di 10g e tende a diminuire leggermente nella dose da 50g, caratterizzata da un RI pari a 45. Aumenta, invece, all'aumentare della dose a partire dalla dose di 100g, dove si registra un RI di 47, e raggiunge il valore massimo, ovvero 72, nella concentrazione maggiore, quella da 200g. Quest'ultima è risultata significativamente maggiore rispetto alle altre ($df=24$; $F=13.07$; $p=0,00145$) (Tab. 4-1).

Nel grafico di Figura 4-2 sono rappresentati gli indici di risposta ottenuti dai maschi. Come nel precedente, in ascissa sono riportate le diverse concentrazioni di farinaccio utilizzate (1g, 10g, 50g, 100g, 200g) e in ordinata gli indici di risposta da 0 a 90. A differenza delle femmine, per i maschi l'RI aumenta sempre all'aumentare della dose. Infatti, per 1g l'RI è di 49, per 10g di 64, per 50g di 65, per 100g di 69 fino a raggiungere il valore più alto registrato, ovvero 77 per la dose da 200g.

I maschi, dunque, mostrano un RI medio, pari a 64.8, più alto di quello delle femmine, che, invece, è pari a 51.2, ma non c'è alcuna differenza significativa tra i sessi ($df=1$; $F=3.85$; $p=0.085$).

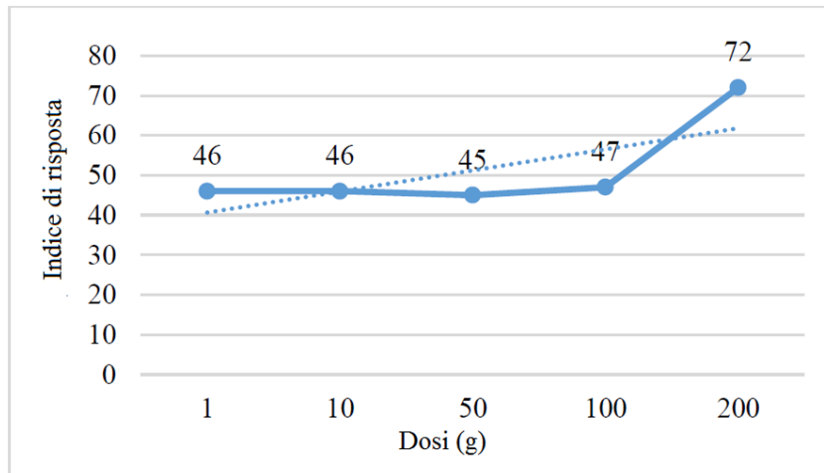


Figura 4-1 *Indice di risposta nelle femmine*

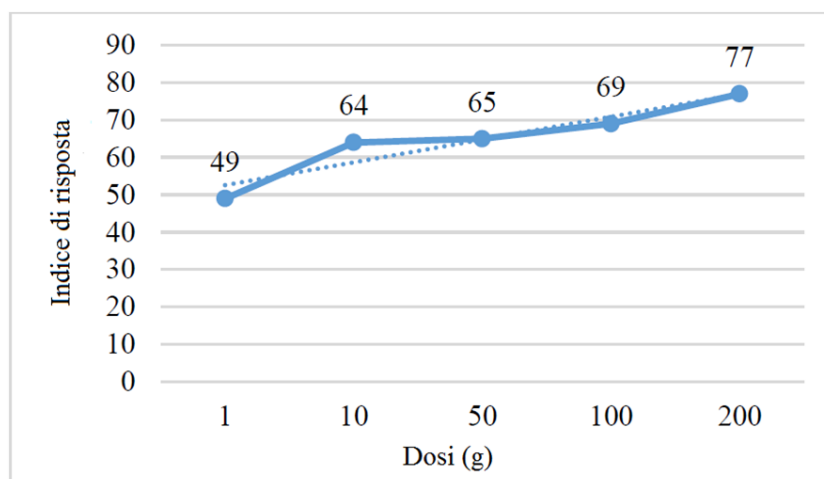


Figura 4-2 *Indice di risposta nei maschi*

Tabella 4-1 *Indice di risposta negli adulti a dosi crescenti di volatili del farinaccio in pitfall a doppia scelta, coefficiente di determinazione (R^2) dell'analisi di regressione lineare log-(dose) e la sua significatività (p)*

** $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ (risposta significativa allo stimolo; paired-sample t test); ^aN=5*

Sesso	Indice di risposta (Media±ES) ^a					R^2	p
	1g	10g	50g	100g	200g		
Maschi	49±18.50	64±27.92	65±18.37	69±9.61	77±7.58	0.14	0.035
Femmine	46±10.83	46±10.83	45±20.29	47±9.74	72±5.70	0.33	0.001

Capitolo 5

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano che molti volatili del farinaccio, noti per essere captati dai sensilli antennali di altri insetti dannosi per le derrate (Germinara et al., 2008), provocano una risposta comportamentale da parte degli adulti di *T. molitor* a tutte le dosi. Per la prima volta maschi e femmine sono stati testati separatamente e messi a confronto. È emerso che le femmine sono attratte da dosi più alte, mentre i maschi non mostrano alcuna correlazione significativa tra le dosi. Può essere dedotto che la scelta delle femmine dipende dalla necessità di trovare un sito adatto per l'ovideposizione. La dose di 200g di farinaccio è stata significativamente attrattiva per gli adulti di *T. molitor*, sia maschi che femmine. La quantità di substrato influenza chiaramente la scelta, poiché una quantità più elevata di composti volatili potrebbe essere associata ad una più alta qualità del substrato alimentare per lo sviluppo delle larve.

In letteratura è stato evidenziato come questo coleottero produca numerosi tipi di feromoni, compresi quelli che mediano l'aggregazione (Weaver, et al., 1989). La sinergia dell'attrazione di questi feromoni e l'attrattività della dieta, anche se lieve, potrebbe spiegare l'attrattività positiva anche di dosi più basse di farinaccio. I risultati riportati sono significativi dal punto di vista dello sviluppo di strategie per la gestione e il controllo delle infestazioni di *T. molitor* nelle derrate alimentari. Infatti, miscele specifiche di attrattivi sintetici potrebbero essere usate per monitorare e/o catturare gli adulti di questa specie. Questi potrebbero essere adoperati da soli o in combinazione con i feromoni di aggregazione come è stato riportato per numerose specie (Landolt & Thomas, 1997). Si è osservato infatti che in alcuni casi la presenza di un substrato alimentare di origine vegetale influenza il comportamento degli insetti in risposta ai feromoni sessuali, con meccanismi che determinano variazioni nell'accoppiamento e nell'attrazione sessuale. Per esempio, Shorey ha messo in evidenza il fatto che per un gran numero di insetti, le trappole innescate con feromoni femminili attirano i maschi solo quando queste sono poste vicino alla pianta ospitante (Shorey, 1973). Il materiale vegetale gioca un ruolo importante nell'origine dei feromoni sessuali di diversi insetti fitofagi, dovuto all'acquisizione di sostanze chimiche bioattive e precursori chimici, necessari per i feromoni, attraverso il consumo, l'assorbimento o l'inalazione di materiale vegetale del substrato.

Queste influenze sono spesso evidenziate da biosaggi comparativi che dimostrano risposte comportamentali a stimoli feromonali e a stimoli da parte del substrato vegetale, testati separatamente o insieme, che hanno evidenziato che spesso le sostanze chimiche del substrato vegetale lavorano in sinergia o migliorano in altro modo le risposte degli insetti ai feromoni sessuali.

Alla luce di quanto detto, una comprensione chiara dell'attività biologica dei diversi volatili del farinaccio sarà essenziale per lo sviluppo di trappole efficaci volte alla gestione delle strategie di controllo. Bisogna, però, anche tener conto del fatto che determinate sostanze singole o miscele potrebbero avere effetti anche su altri insetti e non è da escludere che composti che risultano essere repellenti per una specie non possano, invece, essere attrattivi per un'altra. Non considerando tutte le possibili interazioni, dunque, si potrebbe correre il rischio di sviluppare trappole che determinerebbero la diminuzione di una specie e, allo stesso tempo, l'aumento di un'altra. Tuttavia, risposte comportamentali così diverse determinate da uno stesso substrato alimentare potrebbero essere utili per comprendere l'ecosistema che popola quel determinato substrato.

BIBLIOGRAFIA

- Adam, B., Phillips, T. & Flinn, P., 2006. *The economics of IPM in stored grain: Why don't more grain handlers use IMP?*. Campinas, Sao Paulo, Brazil , I. Lorini et al., pp. 3-12.
- Alexander, P., Kitchener, J. & Briscoe, H., 1944. Inert dust insecticides. *Annals of Applied Biology*, 31(2), pp. 143-159.
- Andersen, S., Chase, A. & Willis, J., 1973. The amino-acid composition of cuticles from *Tenebrio molitor* with special reference to the action of juvenile hormone. *Insect Biochemistry*, 3(10), pp. 171-180.
- Andersen, S., Kafn, K., Krogh, T.N., Hojrup, P., Roepstorff, P., 1995. Comparison of Larval and Pupal Cuticular Proteins in *Tenebrio molitor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2), pp. 177-187.
- Arthur, F., 1996. Grain protectants: Current status and prospects for the future. *Journal of Stored Product Research*, 32(4), pp. 293-302.
- Bailey, S., 1962. The effects of percussion on insects pestsof grain. *Journal of Economic Entomology*, 55(3), pp. 301-304.
- Bailey, S. & Banks, H., 1980. A review of recent studies of the effects of controlled atmospheres on stored product pests. *Developments in Agricultural Engineering*, Volume 1, pp. 101-118.
- Barnes, A. & Silva-Jothy, M., 1999. Density–dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, Volume 267, pp. 177-182.
- Birch, M. & Haynes, K., 1984. *Introduzione ai feromoni*. Milano: Clesav.
- Boos, S., Meunier, J., Pichon, S. & Kolliker, M., 2014. Maternal care provides antifungal protection to eggs in the European earwig. *Behavioral Ecology*, 25(4), pp. 754-761.

- Bryning, G., Chambers, J. & Wakefield, M., 2005. Identification of a sex pheromone from male yellow mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. *Journal of chemical ecology*, 31(11), pp. 2721-2730.
- Burkholder, W., 1983. *Stored-product insects behaviour and pheromone studies: keys to successful monitoring and trapping*. Manhattan, US, Proceedings of third international Working Conference on Stored-Products Entomology .
- Cappelli, P. & Vannucchi, V., 2016. *Chimica degli alimenti conservazione e trasformazione*. III a cura di :Zanichelli Editore.
- Chermenskaya, T., Stepanycheva, E., Shchenikova, A. & Chakaeva, A., 2010. Insecto acaricidal and deterrent activities of extracts of Kyrgyzstan plants against three agricultural pests. *Industrial Crops and Products*, 32(2), pp. 157-163.
- Cogan, P. & Wakefield, M., 1987. *Further developments in traps used to detect low-level infestations of beetle pests in bulk stored grain*. Surrey, UK, British Crop Protection Council, Farnham, pp. 161-167.
- Connat, R., Delbeque, J., Glitho, I. & Delachambre, J., 1991. The onset of metamorphosis in *Tenebrio molitor* larvae (Insecta, Coleoptera) under grouped, isolated and starved conditions. *Journal of insect physiology*, 37(9), pp. 653-662.
- Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P. & Canale, A., 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-products pest: evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research*, 45(2), pp. 125-132.
- Cotton, R., 1927. Notes on the biology of the meal worms, *Tenebrio molitor* Linne and *T. obscurus* Fab. *Annals of the Entomological Society of America*, 20(1), pp. 81-86.
- Cotton, R. & St George, R., 1929. The mealworms. *Technical Bulletin of U.S. Department of Agriculture*, Volume 95, pp. 1-37.
- Council for Environmental Quality, 1972. *Integrated Pest Management*. Washington, DC, Council Environmental Quality, p. 41.
- Delbecque, J., Hirn, M., Delachambre, J. & Reggi, M., 1978. Cuticular cycle and molting hormone levels during the metamorphosis of *Tenebrio molitor*. *Developmental biology*, 64(1), pp. 11-30.

- Drnevich, J., 2003. Number of mating males and mating interval affect last-male sperm precedence in *Tenebrio molitor*. *Animal Behaviour*, 66(2), pp. 349-357.
- Drnevich, J. M., Papke, R. S., Rauser, C. L. & Rutowski, R. L., 2001. Material benefits from multiple mating in female mealworm beetles (*Tenebrio molitor* L.). *Journal of Insect Behavior*, 14(2), pp. 215-230.
- Dunkel, F., 1992. The stored grain ecosystem: a global perspective. *Journal of Stored Products Research*, 28(2), pp. 73-87.
- Ebeling, W., 1971. Sorptive dusts for pest control. *Annual Review of Entomology*, Volume 16, pp. 123-158.
- Esperk, T., Tammaru, T. & Nylin, S., 2007. Intraspecific variability in number of larval instars in insects. *Journal of Economic Entomology*, 100(3), pp. 627-645.
- Fazolin, M. et al., 2007. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L. 1758. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(1), pp. 113-120.
- Ferrandon, D., Imler, J., Hetru, C. & Hoffmann, J., 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 7(11), pp. 862-874.
- Fields, P., 1992. The control of stored-product insects and mites with extreme temperatures. *Journal of Stored Products Research*, 28(2), pp. 89-118.
- Finke, M., 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, 21(3), pp. 269-285.
- Fleurat-Lessard, F., Andrieu, A. & Wilkins, D., 1994. New trends in stored-grain infestation detection inside storage bins for permanent infestation risk monitoring. *Proceedings of the 6th International Working Conference on Store- Product Protection*, Volume 1, pp. 397-402.
- Flinn, P., Hagstrum, D. & Muir, W., 1997. Effects of Time and Aeration, Bin Size and Latitude on Insect Populations in Stored Wheat: A Simulation Study. *Journal of Economic Entomology*, 90(2), pp. 646-651.
- Flinn, P., Hagstrum, D., Reed, C. & Phillips, T., 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service stored-grain area-wide integrated pest management program. *Pest Management Science*, 59(6-7), pp. 614-618.

- Franco, J., Zada, A. & Mendel, Z., 2009. Novel approaches for the management of mealybug pests. *Biorational Control of Arthropod Pests; Springer*, pp. 233-278.
- Freitak, D. et al., 2014. The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. *Virulence*, 5(4), pp. 547-554.
- Germinara, G., De Cristofaro, A. & Rotundo, G., 2008. Behavioral responses of adult *Sitophilus granarius* to individual cereal volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 34(4), pp. 523-529.
- Germinara, G., Rotundo, G., De Cristofaro, A. & Giacometti, R., 2002. Risposte elettroantennografiche di *Sitophilus granarius* (L.) e *S. zeamais* Motschulsky a sostanze volatili dei cereali. *Tecnica Molitoria*, Volume 53, pp. 27-34.
- Greenberg, S. & Ar, A., 1996. Effects of chronic hypoxia, normoxia and hyperoxia on larval development in the beetle *Tenebrio molitor*. *Journal of Insect Physiology*, 42(11-12), pp. 991-996.
- Hagstrum, D., Vick, K. & Webb, J., 1990. Acoustical Monitoring of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) Populations in Stored Wheat. *Journal of Economic Entomology*, 83(2), pp. 625-628.
- Hallman, G., 2013. Control of stored product pests by ionizing radiation. *Journal of Stored Products Research*, Volume 52, pp. 36-41.
- Happ, G., 1969. Multiple sex pheromones of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L.. *Nature*, 222(5189), pp. 180-181.
- Happ, G. & Wheeler, J., 1969. Bioassay, preliminary purification, and effect of age, crowding, and mating on the release of sex pheromone by female *Tenebrio molitor*. *Annals of the Entomological Society of America*, 62(4), pp. 846-851.
- Hughes, A., 1976. *The mites of stored food and houses*. Londra: Her Majesty's Stationery Office.
- Hunter, W., 1912. Results of experiments to determine the effect of Roentgen rays upon insects. *Journal of Economic Entomology*, 5(2), pp. 188-193.
- Isman, M., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8), pp. 603-608.
- Isman, M., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, Volume 51, pp. 45-66.

- Jacobs, C., Gallagher, J.D., Evison S.E.F., Heckel, D.G., Vilcinskas, A., Vogel, H., 2010. Endogenous egg immune defenses in the yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *Developmental and Comparative Immunology*, pp. 1-8.
- Jacobs, C., Rezende, G., Lamers, G., Van der Zee, M., 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proceedings of the Royal Society B*, 280(1764).
- Jacobs, C. & van der Zee, M., 2013. Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(2), pp. 263-269.
- Janz, N., 2002. Evolutionary ecology of oviposition strategies. *Chemoecology of Insect Egg and Egg Deposition*, pp. 349-376.
- Jayas, D., White, N. & Muir, W., 1995. The stored grain ecosystems. In: *Stored-Grain Ecosystem*. New York: Marcel Dekker, pp. 15-48.
- Jemâa, J., Tersim, N., Toudert, K. & Khouja, M., 2012. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition.. *Journal of Stored Products Research*, Volume 48, pp. 97-104.
- Kawasaki, H., Sato, H. & Suzuki, M., 1975. Structural proteins in the egg envelopes of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochemistry*, 5(1), pp. 25-34.
- Khoury, C. & Bianchi, R., 2010. *Artopodi delle derrate alimentari: chiavi di identificazione e procedure operative per la determinazione dei principali infestanti entomatici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità.
- Knorr, E. et al., 2015. Translocation of bacteria from the gut to the eggs triggers maternal transgenerational immune priming in *Tribolium castaneum*. *Biology Letters*, 11(12).
- Kotaki, T. & Fujii, H., 1995. Crowding inhibits pupation in *Tribolium freemani*: contact chemical and mechanical stimuli are involved. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 74(2), pp. 145-149.
- Landolt, P. & Thomas, W., 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, Volume 42, pp. 371-391.
- Le Patourel, G., Shawir, M. & Moustafa, F., 1989. Accumulation of mineral dusts from wheat by *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera:Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 25(2), pp. 65-72.
- Little, T. & Kraaijeveld, A., 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(2), pp. 58-60.

- Loschiavo, S., 1975. Field tests of devices to detect insects in different kinds of grain storages. *The Canadian Entomologist*, 107(4), pp. 385-389.
- Loudon, C., 1988. Development of *Tenebrio molitor* in low oxygen levels. *Journal of Insect Physiology*, 34(2), pp. 97-103.
- Ludwig, D., 1956. Effects of temperature and parental age on the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera, Tenebrionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 49, pp. 12-14.
- Ludwig, D. & Fiore, C., 1960. Further studies on the relationship between parental age and the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Annals of the Entomological Society of America*, 53(5), pp. 595-600.
- Marceljski, M. & Korunic, Z., 1971. Trials of inert dusts in water suspension for controlling stored-product pests. *Zasista Bilja (English traslation)*, Volume 22, pp. 377-387.
- Marcos, K., 1998. Integrated Pest Management: Historical Prospectives and Contemporary Developments. *Annual Review of Entomology*, Volume 43, pp. 243-270.
- Maroli, M. & Houry, C., 1995. *Impurità solide negli sfarinati e nei prodotti di trasformazione: metodo ufficiale di analisi (filth-test) e aspetti normativi*, Roma: Istituto Superiore di Sanità.
- Martínez, L., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. & Serrão, J., 2015. Bioactivity of six plant extracts on adults of *Demotispa neivai* (Coleoptera: Chrysomelidae).. *Jornal of Insect Science*, 15(1), p. 34.
- Mason, L. J., Maier, D., Adams, W. & J.L., O., 1994. *Pest management of stored maize using chilled aeration- a mid-west United States perspective*. Wallingford, U.K., Proceedings of the 6th International Working Conference.
- Masutti, L. & Zangheri, S., 2001. *Entomologia generale e applicata*. Padova: CEDAM.
- Millar, J., 2012. Identification of the sex pheromone of the invasive scale *Acutaspis albopicta* (Hemiptera:Diaspididae), arriving in California on shipments of avocados from Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 105(2), pp. 497-504.
- Murdock, L. & Shade, R., 1991. Eradication of Cowpea Weevil (Coleoptera: Bruchidae) in Cowpeas by Solar Heating. *American Entomologist*, 37(4), pp. 228-231.
- Murray, D., 1968. The importance of water in the normal growth of larvae of *Tenebrio molitor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 11(2), pp. 149-168.

- Navarro, S., 2006. *Insect Management for Food Storage and Processing*. II a cura di Minnesota, USA: Jerry W. Heaps.
- Nebbia, S., Lamberti, C., Giorgis, V., Giuffrida, M.G., Manfredi, M., Marengo, E., Pessione, E., Schiavone, A., Boita, M., Brussino, L., Cavallarin, L., Rolla, G., 2019. The cockroach allergen-like protein is involved in primary respiratory and food allergy to yellow mealworm (*Tenebrio molitor*). *Clinical & Experimental Allergy*, 49(10), pp. 1379-1382.
- Neethirajan, S., Karunakaran, C., Jayas, D. & White, N., 2007. Detection techniques for stored-product insects in grain. *Food Control*, Volume 18, pp. 157-162.
- Norin, T., 2007. Semiochemicals for insect pest management. *Pure and Applied Chemistry*, 79(12), pp. 2129-2137.
- Park, J., Choi, W.H., Kim, S.H., Jin, H.J., Han, Y.S., Lee, Y.S., Kim, N.J., 2014. Developmental characteristics of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) in different instars. *International Journal of Industrial Entomology*, 28(1), pp. 5-9.
- Phillips, T., 1997. Semiochemicals of stored-product insects: Research and applications. *Journal of Stored Products Research*, 33(1), pp. 17-30.
- Phillips, T., Jiang, X.L., Burkholder, W.E., Phillips, J.K., Tran, H.Q., 1993. Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product coleoptera, *Sitophilus oryzae* (curculionidae) and *Tribolium castaneum* (tenebrionidae). *Journal of Chemical Ecology*, Volume 19, pp. 723-734.
- Pike, V., 1994. Laboratory assessment of the efficacy of phosphine and methyl bromide fumigation against all life stages of *Liposcelis entomophilus* (Enderlein). *Crop protection*, 13(2), pp. 141-145.
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Dos Santos, M.H., Fernandes, F.L., Wilcken, C.F.; Soares, M.A., Serrão, J.E., Zanucio, J.C., 2017. Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Reports*, Volume 7.
- Platè, M., 1983. Difesa antiparassitaria nell'industria alimentare e protezione degli alimenti. In: *Informatore Agricolo*.
- Punzo, F. & Mutchmor, J., 1980. Effects of Temperature, Relative Humidity and Period of Exposure on the Survival Capacity of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 53(2), pp. 260-270.

- Rai, P., Ball, H., Nelson, S. & Stetson, L., 1971. Morphological Changes in Adult *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Resulting from Radiofrequency or Heat Treatment of Larvae or Pupae. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(5), pp. 1116-1121.
- Reed, C. & Harner, J., 1998. Thermostatically controlled aeration for insect control in stored hard red winter wheat. *Applied Engineering in Agriculture*, 14(5), pp. 501-505.
- Rejendran, S., Parveen, H., Begum, K. & Chethana, R., 2004. Influence of phosphine on hatching of *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae), *Lasioderma serricorne* (Coleoptera:Anobidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera:Silvanidae). *Pest Management Science*, 60(11), pp. 1114-1118.
- Ridley, M., 1989. The timing and frequency of mating in insects. *Animal Behaviour*, Volume 37, pp. 535-545.
- Savvidou, N. & Bell, C., 1994. The effect of larval density, photoperiod and food change on the development of *Gnatocerus cornutus* (F.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 30(1), pp. 17-21.
- Scholler, M., Prozell, S., Al-Kirshi, A. & Reichmuth, C., 1997. Towards Biological Control as a Major Component of Integrated Pest Management in Stored Product Protection. *Pergamon*, Volume 33, pp. 81-97.
- Schroeckenstein, D., Meier-Davis, S. & Bush, R., 1990. Occupational sensitivity to *Tenebrio molitor* linnaeus (yellow mealworm). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86(2), pp. 182-188.
- Semple, R., 1992. Inspection procedures for grain handling facilities and methods for detecting stored grain insects.. In: *Towards integrated commodity and pest management in grain storage*. Rome: The Chief Editor, pp. 149-184.
- Shaaya, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J. & Sukprakarn, C., 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33(1), pp. 7-15.
- Shorey, H., 1973. Behavioral responses to insect pheromones. *Annual Review of Entomology*, Volume 18, pp. 349-380.
- Sinha, R., 1961. Insect and Mites Associated with Hot Spots in Farm Stored Grain. *The Canadian Entomologist*, 93(8), pp. 609-621.

- Stanley, D. & Miller, J., 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119(1), pp. 1-13.
- Stefanazzi, N., Stadler, T. & Ferrero, A., 2011. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 67(6), pp. 639-646.
- Steilwaag-Kiuler, E., 1954. Zur physiologie der kaferhautung untersuchungen am Mehlkafer *Tenebrio molitor*. *Biol. Zentralbl.*, Volume 73, pp. 35-46.
- Suma, P., Russo, A., Franco, J. & Mendel, Z., 2013. *L'impiego dei semiochimici di sintesi nei programmi di controllo integrato delle cocciniglie degli agrumi*. Firenze, Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia.
- Tanaka, Y., Honda, H. & Ohsawa, K., 1989. Absolute Configuration of 4-Methyl-1-nonanol, a Sex Attractant of the Yellow Mealworm, *Tenebrio molitor* L.. *Journal of Pesticide Science*, 14(2), pp. 197-202.
- Tanaka, Y., Honda, H., Ohsawa, K. & Yanamoto, I., 1987. A sex attractant of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L., and its role in the mating behavior. *Journal of Pesticide Science*, 11(1), pp. 49-55.
- Toderi, G. & D'Antuono, L., 2000. *Coltivazioni Erbacee*. Bologna: Patron Editore.
- Trauer-Kizilelma, U. & Hilker, M., 2015. Impact of transgenerational immune priming on the defence of insect eggs against parasitism. *Developmental & Comparative Immunology*, 51(1), pp. 126-133.
- Trauer, U. & Hilker, M., 2013. Parental Legacy in Insects: Variation of Transgenerational Immune Priming during Offspring Development. *Plos One*, 8(5).
- Tremblay, E., 1999. *Entomologia applicata*. Napoli: Liguori Editore.
- Tyshchenko, V. P. & Sheyk Ba, A., 1987. Photoperiodic regulation of larval growth and pupation of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Entomo. Rev.*, Volume 66, pp. 35-46.
- Tyshchenko, V. & Sheyk Ba, A., 1986. Photoreductive regulation of larval growth and pupation of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Entomologicheskoe Obozrenie*, 65(1), pp. 3-12.

- Urs, K. & Hopkins, T., 1973. Effect of moisture on growth rate and development of two strains of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 8(4), pp. 291-297.
- Vadivambal, R., Jayas, D. & White, N., 2008. Mortality of stored-grain insects exposed to microwave energy. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 51(2), pp. 641-647.
- Visser, J., 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.*, Volume 31, pp. 121-144.
- Warchalewski, J., Pradzynska, A., Gralik, A. & Nawrot, J., 2000. The effect of gamma and microwave irradiation of wheat grain on development parameters of some stored grain pests. *Molecular Nutrition & Food Research*, 44(6), pp. 411-414.
- Weaver, D. K. & McFarlane, J., 1990. The effect of larval density on growth and development of *Tenebrio molitor*. *Journal of Insect Physiology*, 36(7), pp. 531-536.
- Weaver, D., McFarlane, J. & Alli, I., 1989. Aggregation in yellow mealworms, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Journal of chemical ecology*, 15(5), pp. 1605-1615.
- Wigglesworth, V., 1945. Transpiration through the cuticles of insects. *Journal of Experimental Biology*, Volume 21, pp. 97-114.
- Wilkin, R. & Fleurat-Lessard, F., 1991. International working conference on stored-product protection. *Journal of Economic Entomology*, 104(4), pp. 1445-1454.
- Worley, J., 2002. Aerating grain in storage. *Georgia Cooperative Extension Service Bulletin*, p. 712.
- Yoo, J., Hwang, J., Goo, T. & Yun, E., 2013. Comparative Analysis of Nutritional and Harmful Components in Korean and Chinese Mealworms (*Tenebrio molitor*). *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, pp. 267-270.
- Zanchi, C., Troussard, J., Martinaud, G., Moreau, J., Moret, Y., 2011. Differential expression and costs between maternally and paternally derived immune priming for offspring in an insect. *Journal of Animal Ecology*, Volume 80, pp. 1174-1183.

Zanuccio, J., Mourão, S.A.; Martínez, L.C.; Wilken, C.F.; Ramalho, F.S.; Plata-Rueda, A.; Soares, M.A.; Serrão, J.E., 2016. Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific Reports*, Volume 6.

Zapata, N. & Smagghe, G., 2010. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products*, 32(3), pp. 405-410.