

### 3. METODOLOGIA ADOTTATA

#### 3.1 Descrizione delle aree di studio

Le prove si sono svolte negli anni 2004-2006, da giugno a dicembre, periodo in cui si concentrano le maggiori attività di controllo dei fitofagi.

Le aree di studio sono state individuate in due comuni della provincia di Cosenza, Terranova da Sibari e Mirto-Crosia.

##### Terranova da Sibari

Nel 2005 le prove si sono svolte nell'azienda Feraudo del comune di Terranova da Sibari (CS) (fig. 1). Sei tesi (TER1-6) sono state collocate in un oliveto di circa venti anni, irrigato a goccia ed arato, mentre una tesi (TER7) è stata collocata in un oliveto di circa ottanta anni, non irrigato e non arato. La vegetazione climax per TER7 è rappresentata dal querceto termofilo, mentre per il resto delle stazioni è la lecceta. Questo è dovuto alla diversa altitudine a cui TER7 si trova rispetto al resto delle stazioni. I principi attivi utilizzati contro la mosca dell'olivo nei campi sperimentali sono tutti prodotti ammessi in olivicoltura biologica, in particolare sono stati impiegati l'azadiractina (200ml/hl) (DIRACTIN), il rotenone (150ml/hl) (ROTENA) e l'ossicloruro di rame (500g/hl) (tab. 1), I trattamenti sono stati eseguiti alla fine di settembre e a metà ottobre.

Tab. 1. Principali attributi delle tesi campionate di Terranova.

Tesi	Quota (m s.l.m.)	Esposizione	Inclinazione (°)	Pesticida	Superficie trattata (ha)
TER1	75	SO	5	Nessuno	0
TER2	73	SO	10	Ossicloruro di rame	1,5
TER3	71	SO	10	Nessuno	0
TER4	60	S	10	Ossicloruro di rame	1,0
TER5	50	SSE	10	Rotenone	0,6
TER6	43	SSE	5	Azadiractina	0,6
TER7	167	-	0	Nessuno	0

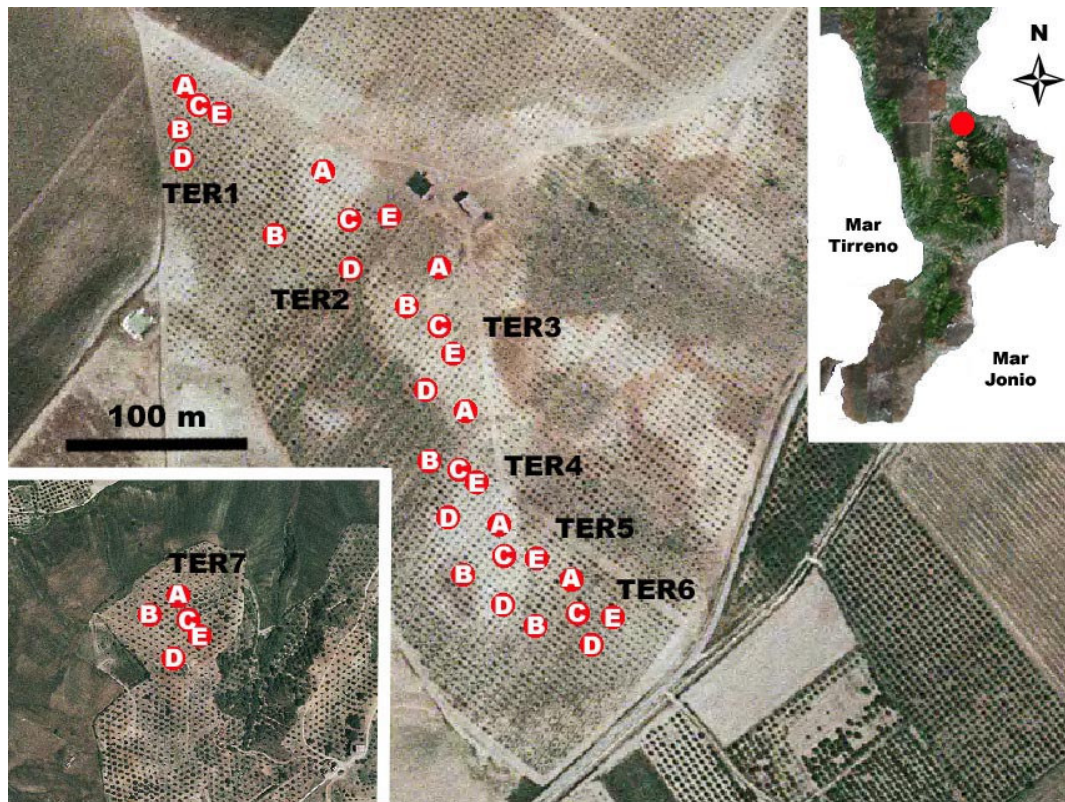


Fig.1. Posizionamento di area di studio, tesi sperimentali (sigle alfanumeriche) e trappole cromotropiche gialle (punti rossi e lettere bianche). Le pit-fall traps sono state collocate in corrispondenza delle trappole cromotropiche contrassegnate dalle lettere A, B C. D E.

### Mirto-Crosia

Nel 2006 l'area di studio interessata ha riguardato i campi sperimentali del C.R.A.- OLI (Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia), ubicati nel comune di Mirto-Crosia aventi una estensione di 12 ettari (Fig. 2), e posizionati a 5m s.l.m. Sono costituiti da piante di olivo di circa 15-18 anni appartenenti a diverse cultivar coltivate nelle medesime condizioni agronomiche ed ambientali. Gli oliveti sperimentali sono stati sottoposti ad inerbimento. Il clima è tipicamente mediterraneo, con una lunga stagione calda e secca e una corta fresca ed umida. Il suolo è alluvionale, composto principalmente da sabbie e argille siltose.

Sono state individuate sei tesi sperimentali composte da 200 piante. Una tesi è stata trattata il 25 agosto e il 28 settembre con rotenone (300 ml/hl di Rotena<sup>®</sup> Serbios, Rovigo) (MIR5), un pesticida ammesso in olivicoltura biologica. Un'altra tesi è stata

trattata il 21 agosto e il 28 settembre con caolino (5 kg/hl di Surround<sup>®</sup> WP Crop Protectant, Engelhard Corporation, Iselin, NJ, USA) (MIR7), un repellente promettente nel controllo dei principali fitofagi di molte colture, compreso l'olivo. Un'altra ancora è stata trattata il 25 agosto e il 28 settembre con una miscela di ossicloruro di rame (250 g/hl di Cupravit Blu WG<sup>®</sup> Bayer Cropscience, Milano) e propoli (150 ml/hl di Propoli+<sup>®</sup> Progetto Geovita Div. Agricom, Torino) (MIR8), utilizzati sia contro patogeni fungini e batterici che contro la mosca delle olive. Altre due sono state trattate il 2 agosto, l'1 settembre e il 2 ottobre con dimetoato (150ml/hl di Rogor 40<sup>®</sup> Isagro s.p.a., Milano) (MIR1, MIR2), il pesticida più frequentemente utilizzato in olivicoltura convenzionale. Infine l'ultima non trattata è stata utilizzata come controllo (MIR6) (Tab. 2).

Tab. 2. Principali attributi delle tesi campionate di Mirto Crosia

Tesi	Quota (m s.l.m.)	Esposizione	Inclinazione (°)	Pesticida	Superficie trattata (ha)
MIR1	5	-	0	Dimetoato	2
MIR2	5	-	0	Dimetoato	2
MIR5	5	-	0	Rotenone	1
MIR6	5	-	0	Nessuno	1
MIR7	5	-	0	Caolino	1
MIR8	5	-	0	Rame+Propoli	1

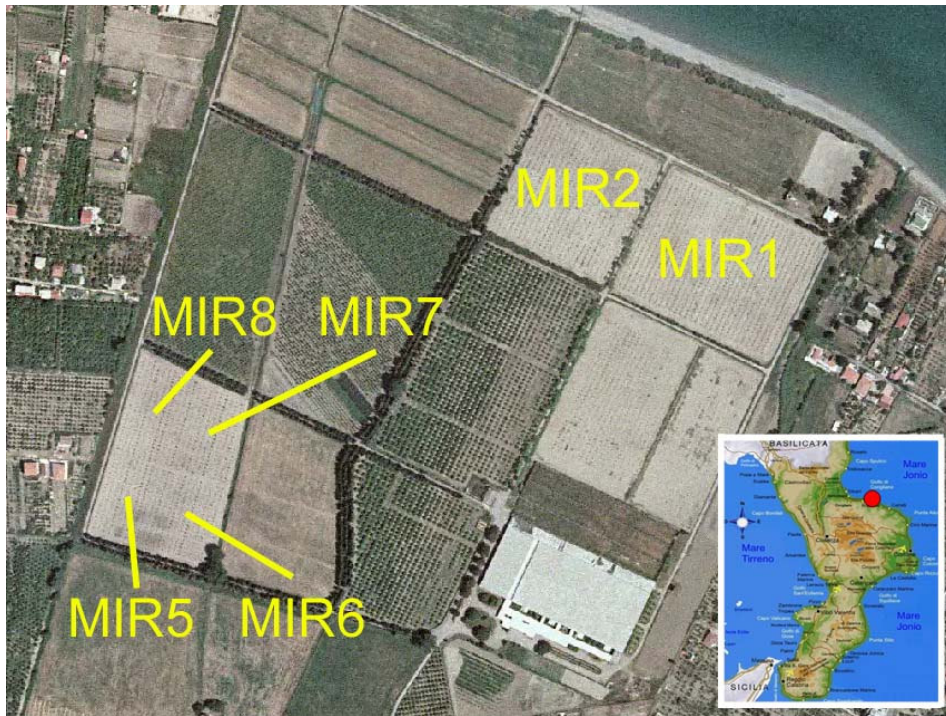


Fig. 2. Posizionamento dell'area di studio di Mirto-Crosia. Le tesi sperimentali sono indicate da sigle alfanumeriche.

### 3.2 Monitoraggio dell'artropodofauna

Gli artropodi sono stati campionati sia al suolo che sulla chioma, da una parte per valutare i differenti meccanismi di azione dei principi attivi utilizzati, dall'altra per studiare il comportamento delle comunità degli artropodi ai due differenti livelli in quanto esplicano funzioni differenti (ad es.: detritivori presenti solo al suolo).

I taxa campionati sono noti per la loro sensibilità alle perturbazioni ambientali. I gruppi sistematici selezionati danno la possibilità di esaminare l'intera cenosi e le relazioni che intercorrono tra le principali categorie trofiche (Bohac, 1999; Downie *et al.*, 1999; Lobry de Bruyn, 1999; Paletti *et al.*, 1999; Rainio & Niemelä, 2003).

Sulla chioma sono state registrate la presenza e l'abbondanza di nove taxa (Arachnida: Araneae e Opiliones; Insecta: Hymenoptera Ichneuomonoidea, altri Hymenoptera, Coleoptera Coccinellidae, Macrolepidoptera, Neuroptera, Mecoptera, Diptera Syrphidae) utilizzando in ogni tesi cinque trappole cromotropiche gialle solitamente impiegate per il monitoraggio delle popolazioni della mosca delle olive (Raspi e Malfatti, 1985). Al suolo sono state registrate la presenza e l'abbondanza di sette taxa

(Arachnida: Araneae e Opiliones; Crustacea: Isopoda; Insecta: Coleoptera Carabidae, Coleoptera Staphylinidae, altri Coleoptera, Hymenoptera Formicidae) impiegando cinque trappole a caduta spesso utilizzate per il campionamento delle comunità di Coleoptera Carabidae (Brandmayr *et al.*, 2005).

Al fine di individuare degli utili bioindicatori del tipo di gestione, lo studio si è concentrato maggiormente sulla comunità dei Coleotteri Carabidi analizzandoli a livello di specie. Le comunità di Carabidae sono state campionate nei campi sperimentali di Mirto-Crosia per tre anni consecutivi (2004-2005), anche per valutare l'impatto in anni successivi degli agrofarmaci e delle pratiche agronomiche utilizzate, in particolare l'effetto dell'inerbimento come pratica agronomica che favorisce la resilienza delle comunità.

### **3.3 Tecniche di campionamento**

#### **Suolo**

Il monitoraggio degli artropodi del suolo è avvenuto tramite le pit-fall traps, ovvero trappole a caduta. Le pit-fall traps sono costituite da bicchieri di plastica di circa 9 cm di diametro all'imboccatura e 7 cm alla base, alti circa 11 cm. Queste misure sono diventate quasi uno standard per quanto riguarda il territorio italiano in quanto utilizzate a partire dal 1971 da Brandmayr e collaboratori in numerose campagne di campionamento lungo tutta la penisola italiana, e anche da altri autori per ricerche più localizzate.

Ogni trappola presenta un foro (0,5 cm di diametro) che si trova a circa 4 cm dal bordo superiore ed ha la funzione di evitare eventuali tracimazioni del contenuto (Fig. 3). I bicchieri vengono inseriti nel suolo, avendo l'accortezza di posizionare il bordo superiore perfettamente coincidente con il livello del terreno. Ciò serve ad evitare che eventuali ostacoli possano impedire l'ingresso degli artropodi. In ciascuna trappola viene introdotta una soluzione di aceto commerciale di vino e acido ascorbico, in ragione di 5-10 gr/litro di aceto. Questa soluzione assolve contemporaneamente a due funzioni: attrattiva nei confronti della fauna del suolo e conservante della stessa fino al momento della raccolta.



La sede di ogni trappola, consiste in un foro che accoglie perfettamente ogni bicchiere. Questa può essere realizzata tramite l'utilizzo di vanghe, trivelle manuali o dissodatore manuale; ovviamente la scelta dipende dalla compattezza del terreno. Per ogni stazione sono state posizionate cinque trappole.

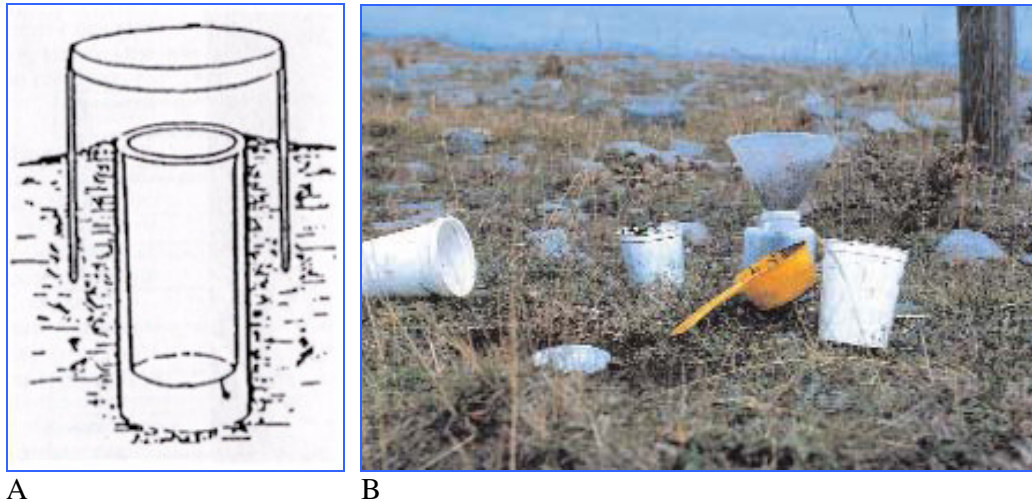


Fig. 3. A: Esempio di pit-fall traps con struttura di protezione. B: Strumenti utilizzati per la raccolta degli artropodi catturati

Il contenuto delle pit-fall traps è stato prelevato in media ogni venti giorni e per questa operazione viene utilizzato un colino, un imbuto e vari contenitori pari al numero di stazioni presenti (Fig. 3B). Tutto il materiale prelevato è stato trasportato in laboratorio. Il materiale è stato in un primo momento separato dai residui di vegetazione e dalle particelle di terra, filtrato e lavato in un colino. Successivamente gli artropodi sono stati posti all'interno di una vaschetta e con l'aiuto di una pinzetta dopo che il materiale è stato accuratamente ripulito si sono separati i vari taxa. Per ogni taxon è stato riportato il numero di individui. I dati ricavati sono stati segnati su un apposito registro che riporta i taxa, il numero di individui per taxon, la data e la stazione del prelievo.

Gli individui di ogni taxon sono stati conservati in alcol denaturato e diluito al 60% accompagnati da una etichetta che ne indica il taxon, la stazione di provenienza, la data di prelievo e il numero di individui.

Per i Coleotteri Carabidi, oltre al dato quantitativo si è proceduti alla identificazione delle specie tramite l'utilizzo di un microscopio e di chiavi dicotomiche (Brandmayr *et*

al., 2005). Le chiavi dicotomiche utilizzate per l'identificazione delle specie di Carabidi sono state quelle di Porta (1923-1959) e Trautner & Geigenmüller (1987). La nomenclatura segue la checklist delle specie della fauna italiana (Vigna Taglianti, 1993).

### **Chioma**

Il campionamento degli insetti volatori è avvenuto mediante trappole cromotropiche gialle, generalmente utilizzate per il monitoraggio della *Bactrocera oleae*.

Le trappole cromotropiche non sono selettive, vengono utilizzate soprattutto per catturare insetti volatori in modo più o meno casuale e consentono di fotografare bene la presenza degli insetti nell'agroecosistema. Vari autori hanno utilizzato questo tipo di trappola nell'agroecosistema oliveto con buoni risultati rispetto agli obiettivi preposti (Duelli *et al.*, 1999; Raspi & Malfatti, 1985). Alcuni autori (Belcari e Dagnino, 1995) riportano che questo tipo di trappola, collocata sotto la chioma degli alberi d'olivo, può essere utilizzata per la stima dell'impatto ecologico in corrispondenza dei trattamenti.

Consistono in tavolette di plexiglas gialle, di cm 21×15, ricoperte di colla su entrambi i lati. In ogni azienda sono state poste in numero cinque, posizionate nella parte medio-alta dell'albero, in direzione nord-sud e tangenti alla chioma. Le tavolette cromotropiche sono state tenute attive da giugno fino a dicembre, e sono state sostituite ogni 10 giorni circa. Le trappole, una volta raccolte sono state trasportate in laboratorio, dove è stata eseguita, con l'aiuto dello stereomicroscopio, la separazione e il conteggio visivo dei taxa prescelti per ottenere un dato quantitativo. I dati ricavati sono stati segnati su un apposito registro che riporta i taxa, il numero di individui per taxon, la data e la stazione del prelievo. Le trappole lette sono state lavate con etere di petrolio e rincollate prima di riportarle in campo.

### 3.4 Analisi dei dati

I dati raccolti sono stati sottoposti a diverse analisi statistiche in modo da cogliere le differenze fra le strutture di comunità, le risposte dei taxa campionati ai vari trattamenti e gli effetti dei composti testati sull'efficienza dei livelli trofici.

I dati di abbondanza sono stati normalizzati utilizzando la densità di attività (DA) che è una misura di abbondanza che tiene conto del numero di trappole utilizzate e del numero di giorni di esposizione delle trappole (Brandmayr *et al.*, 2005).

Il calcolo della densità di attività per ogni specie, consiste nel dividere il numero di individui catturati durante ogni periodo di raccolta per il numero di trappole trovate ancora funzionanti ed i giorni di permanenza delle stesse quindi, moltiplicare il risultato per 10, ottenendo così il valore che più probabilmente indica il numero attivo di individui che nell'arco di dieci giorni cadono in una trappola durante quel periodo dell'anno:

$$DA = [n^{\circ} \text{ individui} / (\text{trap} * \text{gg})] * 10$$

Per ottenere una stima del numero di individui attivi in dieci giorni in relazione al periodo totale di campionamento, non si calcola la media delle singole DA, ma si ricorre al calcolo della unità di sforzo (us) che rappresenta le decadi di attività di tutti i gruppi di trappole utilizzati nei diversi periodi di campionamento. In questo modo la Densità di Attività annua (DAa) per ogni singola specie si ottiene dividendo il numero di individui catturati durante tutto il periodo di campionamento per le unità di sforzo impiegate in quel sito di campionamento.

$$us = \text{trap} * (\text{gg}/10)$$

$$US = \sum us$$

$$US = \sum_{j=1}^m \frac{(\text{N. trappole} \times \text{N. giorni})}{10}$$

$$DAa = n^{\circ} \text{ tot individui} / US$$

La DA viene utilizzata per l'analisi delle fenologie, cioè l'andamento dell'attività all'interno del sito di campionamento durante il periodo di raccolta, mentre la DAa viene utilizzata per la compilazione della tabella zoosociologica.

Le risposte ai trattamenti dei singoli taxon sono state valutate attraverso l'utilizzo di un indice di dinamica fenologica che si traduce nel rapporto dopo trattamento/prima



trattamento dell'abbondanza dei taxa campionati ( $A/B_{\text{ratio}}$ ) (Iannotta *et al.*, 2006a). Questa analisi è stata condotta sia a livello di chioma sia a livello di suolo:

$$A/B_{\text{ratio}} = n^{\circ} \text{ individui post-trattamento} / n^{\circ} \text{ individui pre-trattamento}$$

Negli ecosistemi naturali gli antagonisti sono meno abbondanti degli insetti indifferenti che rappresentano la preda dei primi (Altieri *et al.*, 2003). In questo lavoro assumiamo che l'uso dei pesticidi alteri questo rapporto di abbondanza causando, nell'immediato, un decremento più elevato degli insetti indifferenti rispetto agli antagonisti. Per valutare le conseguenze dell'uso dei pesticidi sulla proporzione di queste categorie trofiche è stato codificato un indice di Equilibrio Cenotico ( $EC_{I/A}$ ) (Iannotta *et al.*, 2006a):

$$EC_{I/A} = n_I/n_A$$

$n_I$  = numero di individui di individui Indifferenti

$n_A$  = numero di individui di individui Antagonisti

La presenza nell'ordine degli imenotteri di gruppi appartenenti ad entrambe le categorie trofiche individuate come utili in questo lavoro, ci ha portati a supporre che questo ordine possa essere utilizzato come surrogato dell'intera entomocenosi. Gli Ichneumonoidea sono stati scelti come rappresentativi degli antagonisti in quanto le specie appartenenti a questa superfamiglia sono relativamente semplici da individuare. In conseguenza di ciò, l'indice surrogato che ne deriva ( $EC_{hym/ichn}$ ) diventa:

$$EC_{hym/ichn} = n_{hym}/n_{ichn}$$

$n_{hym}$  = numero di individui appartenenti agli altri Hymenoptera

$n_{ichn}$  = numero di individui appartenenti agli Ichneumonoidea.

Nella categoria antagonisti a livello della chioma sono stati inseriti i seguenti taxa: Araneae, Opiliones, Ichneumonoidea, Coccinellidae, Neuroptera e Syrphidae. Nella categoria Indifferenti sono stati inseriti i seguenti taxa: altri Hymenoptera, Lepidoptera e Mecoptera. A livello di suolo gli antagonisti sono stati Carabidae, Staphylinidae e Araneae, mentre gli indifferenti sono stati Isopoda, altri Coleoptera e Formicidae. Maggiore è il valore di questo rapporto, migliore è l'equilibrio della comunità.

La variazione della popolazione di insetti in risposta ai trattamenti è stata calcolata mediante la formula di Abbott (1925):

$$\text{Abbott's formula} = 1 - (n_{\text{tratt}} / n_{\text{contr}}) * 100$$

$n_{\text{tratt}}$  = numero di individui rinvenuti dopo il trattamento in una tesi sperimentale

$n_{\text{contr}}$  = numero di individui rinvenuti nello stesso periodo nella tesi controllo

I dati di abbondanza (numero di individui) sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) seguita da LSD post hoc tests per separare le medie utilizzando STATISTICA 5.5.

La similarità interstazionale è stata analizzata attraverso l'analisi dei gruppi tramite raggruppamento gerarchico (StatSoft Italia, 1999), utilizzando la media pesata dei gruppi come metodo di legame e la correlazione (1-r Pearson) come misura di distanza; inoltre è stata misurata anche utilizzando il metodo di Ward come metodo di legame, e la percentuale delle differenze come misura di distanza.

La significatività delle differenze, è stata valutata con il test di Wilcoxon.

Le correlazioni sono state calcolate mediante l'indice di Spearman.

Per la comunità dei Coleotteri Carabidi, i quali sono stati identificati a livello di specie, sono state studiate le principali caratteristiche biologiche quali: il potere di dispersione; la distribuzione geografica più o meno ristretta, l'importanza dell'endemismo, la posizione al limite dell'areale; la scelta e la specializzazione alimentare (specie onnivore o generaliste si addensano in ambienti antropizzati), e la diversità per i raggruppamenti di specie. Le caratteristiche biologiche sono utili per la valutazione dello stato di conservazione di un ecosistema, sia per una migliore conoscenza dell'ambiente naturale che per la valutazione dell'impatto.

La diversità di specie è stata stimata mediante l'indice di Shannon ( $H'$ ), il quale esprime il contenuto di informazione, basato sulla quantificazione del numero di specie presenti (ricchezza specifica). L'indice di Evenness o Equiripartizione ( $E$ ) per calcolare l'abbondanza specifica; questo indice è espressione dell'indice di Shannon.

$$H' = - \sum p \ln p$$

$$E = I / \ln(sp)$$

Dove la sommatoria viene fatta per le specie,  $p$  è il rapporto tra individui di una specie ed individui totali nel sito,  $sp$  è il numero di specie catturate nel sito.