

# Un semplice metodo di estrazione per il campionamento degli acari eriofidi (*Eriophyoidea*)

Enrico de Lillo(\*) - Antonio Guarino(\*\*) - Vito Lasorella(\*\*\*)

## RIASSUNTO

È descritto un metodo di laboratorio di semplice e rapida applicazione per l'estrazione degli acari con particolare interesse verso quelli della vite e i piccolissimi eriofidi tra cui il *Calepitrimerus vitis* (Nalepa), agente dell'acariosi della vite, e il *Colomerus vitis* (Pagenstecher), agente dell'erinosi della vite. Il protocollo utilizzato prevede il lavaggio del materiale vegetale, successiva filtrazione della sospensione mediante setacci a maglie di varie misure e conteggio degli individui allo stereomicroscopio. I composti chimici impiegati per il lavaggio (detergente per piatti e stoviglie, candeggina, acqua di rubinetto) sono facilmente reperibili, economici, semplici da conservare e da eliminare e possono essere manipolati senza particolari rischi per la salute umana. Questo metodo appare efficace per l'estrazione di acari viventi liberi sulla superficie delle piante o in deformazioni vegetali di vario tipo; non è, purtroppo, applicabile per gli individui strettamente "galligeni".

## PAROLE CHIAVE:

Vite, *Calepitrimerus vitis*, *Colomerus vitis*, Phytoseiidae, Tetranychidae, Tarsonemidae, Tydeidae, campionamento, monitoraggio, stima diretta, metodo del lavaggio, metodo dei setacci.

## SUMMARY

A simple method of the extraction for eriophyoid sampling. The authors describe each step of an extraction method applied to grapevine mites, especially the tiny Eriophyoidea among which *Calepitrimerus vitis* (Nalepa) and *Colomerus vitis* (Pagenstecher). The fine details for immediate application in the laboratory are detailed explained. The plant material is washed in tap water added with 2% of sodium hypochlorite and 0.2% of a dish detergent. Next, the suspension is filtered by means of sieves having different sizes; finally the filtered material is ready for a direct observation under a stereomicroscope. The chemi-

cal substances (a dish detergent, a bleaching liquid, tap water) applied in the present protocol can be easily got, are cheap, simple to be stored and discharged, and do not have any hazards for health. The present method seems to be interesting to extract mites free living on plant surface, buds or in several plant deformations, but it doesn't work for strictly "gall-making" populations whose specimens live in tight space.

## KEY WORDS:

Acari, *Colomerus vitis*, *Calepitrimerus vitis*, Phytoseiidae, Tetranychidae, Tarsonemidae, Tydeidae, non-destructive sampling method, monitoring, direct estimates, washing and sieving method.

## Introduzione

L'importanza economica degli acari eriofioidei nell'ambiente forestale e agrario è ampiamente riconosciuta da pubblicazioni (Lindquist *et al.*, 1996) e disposizioni di legge (DM 31.1.1996: misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nel territorio della Repubblica Italiana di organismi "da quarantena" nocivi ai vegetali e ai prodotti vegetali; DPR 697 del 21.12.1996: normative sulla qualità ai fini della commercializzazione del materiale di propagazione). Purtroppo la ridotta dimensione di questi individui (100-200 micrometri) rappresenta un evidente limite per la loro osservazione diretta. Questa può essere necessaria semplicemente per accertare la presenza del fitofago oppure quando si affrontano indagini sulla sua dinamica di popolazione o si intenda procedere all'acquisizione di dati per l'esecuzione del controllo integrato (Perring *et al.*, 1996). Solitamente si procede, invece, al rilievo della sola sintomatologia (Antonacci *et al.*, 2000). I ricercatori e i

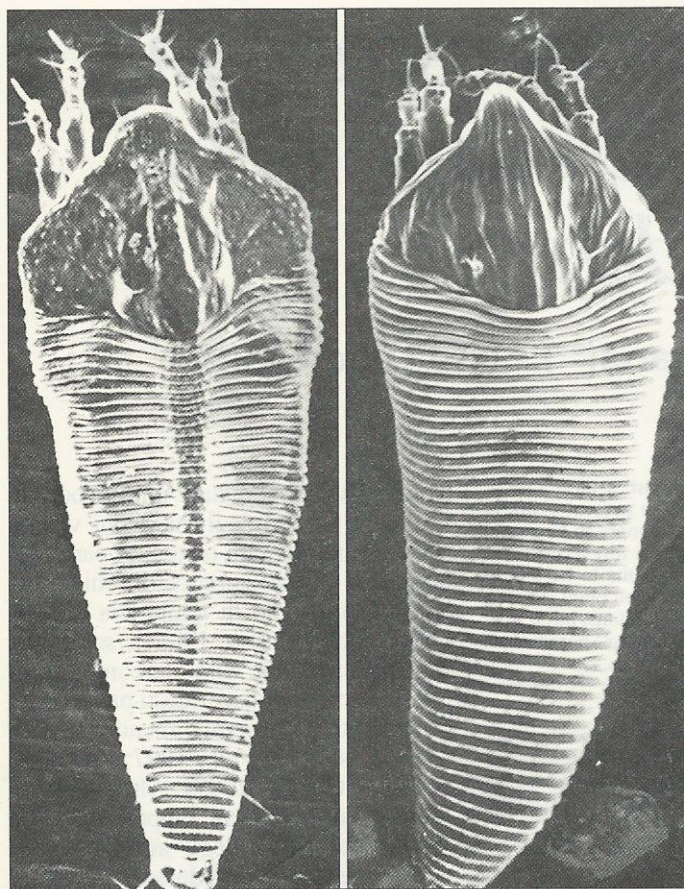
tecnici spesso adottano un metodo di conteggio diretto degli individui viventi sulla lamina fogliare o su altre parti della pianta. Questo approccio richiede un notevole impegno di tempo sia per osservare attentamente l'intera superficie vegetale mediante uno stereomicroscopio sia per individuare questi piccoli acari mediante forti ingrandimenti (Liguori, 1987; Castagnoli *et al.*, 1997; Zandigiacomo & Coiutti, 1997). Altri inconvenienti possono essere rappresentati dal movimento attivo degli acari vivi che può essere di disturbo durante il conteggio, oppure dalla morfologia delle strutture vegetali (complessità e pelosità) che possono nascondere o confondere gli individui all'osservatore. Talvolta si rende necessario separare gli acari dal vegetale prima di eseguire il conteggio e si adottano, spesso, metodi complessi oppure che richiedono composti chimici distruttivi (etanolo, propanolo, metanolo, acetone) (Vial & Monterrat, 1971; Martin, 1977; Perring *et al.*, 1996; Pérez & Moraza, 1998). Al contrario, i ricercatori possono aver bisogno di conoscere la composizione della popolazione, distinta per individui vivi e morti per valutare l'efficacia di alcuni principi attivi e le tecniche su indicate non si prestano propriamente a questo scopo. Infine, alcuni di questi composti chimici possono incidere sul costo dell'esame e sono caratterizzati da restrizioni per il rischio alla salute umana e per le normative relative alla conservazione e allo smaltimento.

Con il presente contributo si vuole riportare in dettaglio la procedura messa a punto per estrarre e stimare una popolazione di acari, con particolare attenzione verso gli eriofioidei della vite (fig. 1).

(\*) Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale e Ambientale, Facoltà di Agraria - Università degli Studi di Bari - via Amendola, 165/a - 70126 Bari (e-mail: delillo@agr.uniba.it).

(\*\*) Osservatorio Regionale delle Malattie delle Piante - Regione Puglia - Lungomare N. Sauro, 47 - 70121 Bari (e-mail: aguario@intranet.agripuglia.it).

(\*\*\*) Coop. Agrolab - via A. Diaz, 9 - 70121 Bari.



**Fig. 1 - Micrografia al microscopio elettronico a scansione della forma estiva (a sinistra) e della forma invernale (a destra) di *Calepitrimerus vitis* (*Nalepa*) visto dal dorso. Scala = 50  $\mu$ m.**

## Materiali

La procedura è stata messa a punto utilizzando (fig. 2):

- un bicchiere da 2 l o un altro contenitore di varia forma e dimensione;
- setacci di acciaio inossidabile: n. 20, maglia da 850  $\mu$ m; n. 80, maglia da 180  $\mu$ m; n. 270, maglia da 53  $\mu$ m; n. 500, maglia da 25  $\mu$ m;
- fondi di piastre Petri in polistirene, dal diametro di 95 mm, fornite di una griglia a maglia da 5 mm di lato (fig. 2);
- un agitatore magnetico del tipo ARE;
- un'ancoretta magnetica o una barra agitatrice;
- una spruzzetta;
- una minuzia a estremità ricurva e una a estremità a punta;
- un microscopio stereoscopico equipaggiato con lente obiettivo DF plan 0.5\* e oculari 10\* il complesso delle lenti permette un ingrandimento compreso tra 3,5 e 35\* lo stereomicroscopio consente l'osservazione con luce incidente e luce trasmessa.

- una soluzione di lavaggio preparata con acqua di rubinetto, 0,2% di detergente per usi domestici e 2% di candeggina per bucato. La densità della soluzione a base di ipoclorito di sodio è stata stabilita sulla base di precedenti esperienze su altri acari (de Lillo, 1996 e 1997) e la sua applicazione è stata suggerita dai metodi comunemente adottati per l'estrazione di nematodi (Southey, 1986).

Questo metodo è stato applicato su campioni di gemme e foglie di vite delle cultivar Centennial Seedless, Italia, Montepulciano, Red Globe, Sangiovese, Trebbiano e Victoria. I campioni sono stati sottoposti a estrazione immediatamente dopo la raccolta oppure dopo una breve conservazione (al massimo 3-4 giorni) in frigorifero a 4-8°C.

## Descrizione del metodo di estrazione

Nel bicchiere (fig. 2) vengono introdotte le foglie (o le scaglie e le perule delle gemme) e l'ancoretta magnetica.

Le foglie più grandi possono essere tagliate in più pezzi.

Si versa la soluzione di lavaggio coprendo completamente il materiale vegetale. Bisogna aver cura di versare quantità sufficiente di liquido per consentire che il movimento dell'ancoretta magnetica non subisca alcun impedimento od ostacolo che ne riduca l'efficacia del mescolamento.

Si lascia agitare per 5-10 minuti. Nel caso la massa delle foglie sia eccessiva, si preferisce agitare a mano la massa con una barra.

Si filtra la sospensione e l'acqua di lavaggio del bicchiere con i setacci impilati e disposti secondo l'ordine decrescente di dimensione delle maglie (850  $\mu$ m, 180  $\mu$ m, 53  $\mu$ m e 25  $\mu$ m). I setacci vengono sciacquati con acqua di rubinetto e il filtrato viene concentrato su una parte del setaccio mediante l'acqua di una spruzzetta.

Si scarta il materiale trattenuto dal setaccio da 850  $\mu$ m e composto da foglie, perule, brattee, insetti più grandi, aggregati di peli, impurità grossolane. Il filtrato (acari, insetti, peli, impurità) degli altri setacci viene raccolto, mediante l'acqua di una spruzzetta, su tre distinte capsule Petri. A questa sospensione vengono aggiunte poche gocce di detergente e il liquido viene mescolato evitando la formazione di schiuma. L'aggiunta del detergente riduce la tensione superficiale e favorisce la decantazione degli acari e degli altri materiali sul fondo della capsula Petri. Questa viene sottoposta all'osservazione con il microscopio stereoscopico per eseguire il conteggio degli individui contenuti nelle singole celle sul fondo della capsula. Bisogna aver cura di spostare delicatamente la capsula sul piano dello stativo il quale deve risultare perfettamente in orizzontale e non deve possedere impedimenti ad uno spostamento sull'intero campo visivo. Nelle nostre osservazioni abbiamo efficacemente adottato un ingrandimento di 25\*. Nel caso in cui gli acari presenti nella piastra siano molto numerosi, si è proceduto all'asportazione degli individui contati mediante una micropipetta o una minuzia oppure si è provveduto al loro conteggio in un numero campione di celle, calcolando l'intera popolazione in modo proporzionale. In tal caso, le celle nelle quali eseguire il conteggio

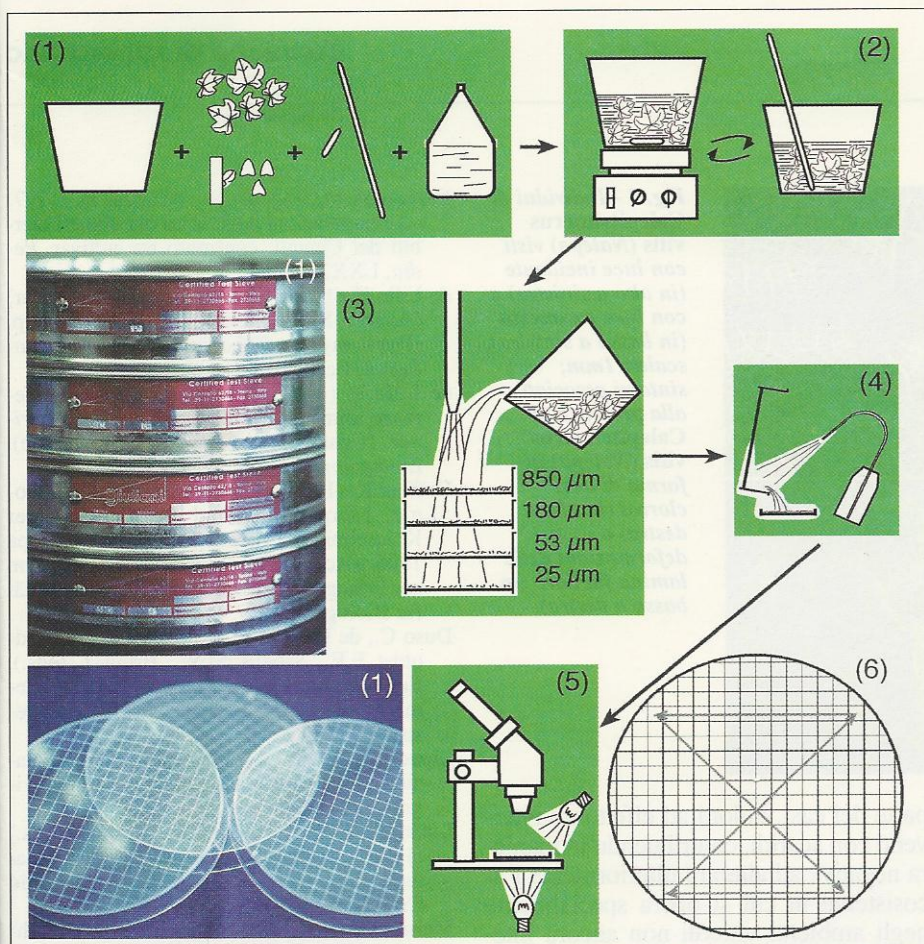


Fig. 2 - Quadro semistematico illustrante il protocollo applicato : 1) strumenti adottati: bicchiere, foglie o gemme, ancorretta magnetica o barra agitatrice, soluzione di lavaggio, setacci, piastre Petri; 2) lavaggio del materiale vegetale con l'ausilio di una ancorretta o di una barra agitatrice; 3) filtrazione della sospensione mediante serie di setacci e lavaggio con acqua da rubinetto; 4) raccolta del filtrato su una capsula Petri utilizzando una spruzzetta; 5) osservazione e conteggio allo stereomicroscopio; 6) percorso suggerito per un conteggio a campione delle celle.

possono essere scelte in modo randomizzato oppure possono disegnare un 8 o un 7 stilizzato come in figura 2. Per le cultivar a foglie provviste di numerosi tricomi può verificarsi un'eccessiva aggregazione di peli che possono nascondere alcuni individui. Pertanto si raccomanda l'utilizzo di una minuzia per disperdere i peli. Eventualmente è possibile osservare gli eriofidi confusi nella massa pelosa mediante luce trasmessa (fig. 3).

Dal filtrato delle varie frazioni è possibile ottenere i seguenti organismi:

- dal setaccio a 180 µm: adulti e forme giovanili di ticidei, fitoseidi, tetranichidi e insetti (p.e. tisanotteri);
- dal setaccio a 53 µm: tarsonemidi, eriofidi di maggiori dimensioni (*Calepitrimerus vitis* prevalentemente), forme giovanili di ticidei, tetranichidi e fitoseidi, uova di tetranichidi e fitoseidi;
- dal setaccio a 25 µm: uova, forme giovanili e adulti di eriofidi (*Calepitrimerus vitis* e *Colomerus vitis*).

### Discussione e conclusioni

Questo metodo modifica e semplifica quelli applicati da Vial e Monterrat (1971), Castagnoli e Liguori (1986), Pérez e Moraza (1998) e Duffner (1999). Recentemente Pérez e Moraza (1998) hanno descritto un metodo simile, con il lavaggio del campione utilizzando una soluzione di alcool etilico al 70% e successiva filtrazione della sospensione ottenuta con un setaccio da 25 µm. Il filtrato veniva raccolto in una soluzione di alcool etilico al 70% e glicerolo al 5% e lasciato ad infiltrare per evaporazione dell'alcool. Pur favorendo un conteggio efficace, questo metodo produce la morte immediata degli individui presenti e richiede l'utilizzazione di alcool etilico che ha maggiore costo rispetto a candeggina e detergente.

Il metodo descritto nel presente contributo offre alcuni vantaggi.

L'utilizzazione di più setacci consente la diluizione dei residui vegetali su una

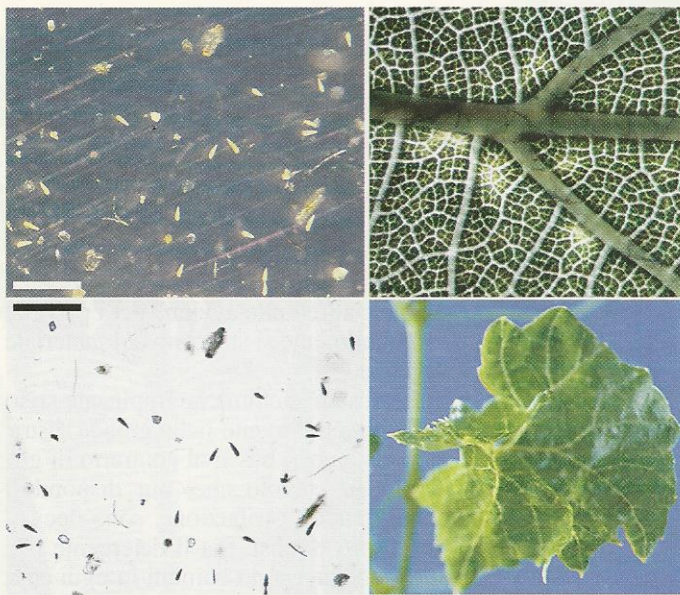
superficie maggiore trattenendo la maggior parte dei peli nel filtrato a 180 µm; la frazione ottenuta a 25 µm è praticamente priva di questi tricomi, mentre la frazione ottenuta a 53 µm presenta una moderata concentrazione di peli. Si è preferito non mescolare tra loro le frazioni ottenute dai vari setacci per motivi di comodità in quanto popolazioni abbondanti possono essere maggiormente diluite e altrettanto avviene per i peli che inevitabilmente si staccano dal materiale vegetale.

Le sostanze chimiche impiegate sono di facile reperimento nella grande distribuzione a costi bassi, al contrario di glicerolo ed etanolo che, pur disponibili nella grande distribuzione, sono decisamente più costosi. Sia il detergente che la candeggina sono comuni in ogni casa e non presentano problemi per il loro smaltimento. In particolare, l'ipoclorito di sodio contenuto nella candeggina dissolve sostanze gelatinose e collanti che possono trattenere uova e individui presenti sulle parti vegetali. Pertanto, associato a un'agitazione regolare della sospensione, è in grado di favorire l'estrazione di individui anche dagli ammassi di peli tipici delle erinosi.

Gli acari raccolti nella capsula Petri si mantengono vivi nella soluzione acquosa per 20-60 minuti e tempi più lunghi si verificano proprio per gli eriofidi. Si agitano notevolmente ma non riescono a spostarsi sulla superficie della piastra non trovando adeguata presa per le zampe. Anzi, gli individui possono essere così concentrati ed eventualmente utilizzati per una reinfestazione o per altre indagini. Metodi in parte simili sono stati adottati nelle procedure di allevamento massale di tetranichidi (Scriven & McMurty, 1971; Megevand, 1997) e fitoseidi (Bakker *et al.*, 1992).

Il presente metodo è risultato sempre più preciso rispetto alla stima diretta sulle foglie ed è stato ancora più apprezzato quando si è operato su foglie molto pelose.

L'adozione di un ingrandimento di almeno 25x favorisce la distinzione delle due specie di eriofidi della vite sulla base della morfologia grossolana e permette anche la distinzione della vitalità dell'individuo le cui appendici appaiono chiaramente in movimento sia utilizzando la luce trasmessa che quella incidente



**Fig. 3 - Individui di *Calepitrimerus vitis* (*Nalepa*) visti con luce incidente (in alto a sinistra) e con luce trasmessa (in basso a sinistra), scala= 1mm; sintomi associati alla presenza di *Calepitrimerus vitis* (*Nalepa*) in forma di lievi clorosi (in alto a destra) o deformazioni della lamina fogliare (in basso a destra).**

(fig. 3). Questo aspetto appare molto utile per verificare l'efficacia di applicazioni acaricide e, proprio nel caso del *Calepitrimerus vitis* (fig. 1), può permettere di valutare la vitalità della popolazione invernale al fine di stabilire le condizioni di allarme per il più temuto e dannoso attacco precoce (Duso & de Lillo, 1996).

Le nostre applicazioni hanno evidenziato anche una buona possibilità di estrazione per tutti gli altri acari e pertanto riteniamo che questo metodo si presti efficacemente allo studio delle acarofaune di specifiche entità vegetali favorendo approfondimento sulla biologia ed ecologia di molte specie.

Si ritiene, inoltre, che questa procedura possa efficacemente sostituire altri sistemi di filtrazione che prevedono su carta da filtro per lo studio degli eriofidi dispersi dal vento (Zhao & Amrine, 1997). Infatti, individui biancastri e giallini possono confondersi facilmente sul filtro e richiedere molto tempo per essere individuati, soprattutto dopo il disseccamento del filtro e del suo contenuto.

La possibilità di poter monitorare la presenza degli eriofidi sulla vite riveste, nello specifico caso, una considerevole importanza al fine di evitare inutili interventi chimici. Sono infatti note le difficoltà da parte dei viticoltori e dei tecnici impegnati nell'assistenza tecnica, nel valutare attraverso la manifestazione dei sintomi, che non sempre sono specifici, un'infestazione di eriofidi nel vigneto (fig. 3). Nel dubbio si è, nella maggior

parte dei casi, indotti ad effettuare interventi con acaridi, contribuendo in maniera negativa ad alterare ulteriormente l'ecosistema in cui si opera specialmente negli ambienti viticoli non ancora interessati da elevate infestazioni di acari.

Va, inoltre, considerato un ulteriore vantaggio nella applicazione di questo metodo di campionamento, che consiste nella possibilità di poter ottenere una curva temporale della presenza degli eriofidi nel vigneto, consentendo di poter suggerire, in caso di necessità, specifici interventi nel periodo di massima presenza di individui.

#### Ringraziamenti

Il primo autore ha curato principalmente l'impostazione della metodica; tutti gli autori hanno collaborato alla verifica dell'efficacia del metodo e all'elaborazione del manoscritto. Ricerca parzialmente finanziata col contributo di Ateneo (es. fin. 2000).

#### LAVORI CITATI

Antonacci D., Tarricone L., Guerra G.B. (2000) - Controllo di *Calepitrimerus* (sic) *vitis* (*Nalepa*) su vitigni di uva da tavola. *Inf. Fitol.*, 50 (6), 27-33.  
 Bakker F., Grove A., Blümel S., Calis J., Oomen P. (1992) - Side-effect tests for Phytoseiids and their rearing methods. In: Hassan S.A. (ed.), Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: description of test methods. *IOBC/WPRS Bull.*, 15 (3), 62-81.  
 Castagnoli M., Liguori M. (1986) - Ulteriori indagini sull'acarofauna della vite in Toscana. *Redia*, LXIX, 257-265.

Castagnoli M., Liguori M., Nannelli R. (1997) - Le popolazioni degli acari nei vigneti inerbati del Chianti: confronto tra cultivar. *Redia*, LXXX, 15-31.  
 de Lillo E. (1996) - *Siteroptes avenae* (Müller) (Acari Siteroptidae) e *Fusarium* spp. (Hyphomycetes Tuberculariaceae). *Entomologica*, Bari, 30, 7-18.  
 de Lillo E. (1997) - Osservazioni sulle preferenze alimentari di *Pediculaster mesembriinae* (Canestrini) (Acari: Pygmephoridae). *Entomologica*, Bari, 31, 7-12.  
 Duffner K. (1999) - Untersuchungen zur Biologie, Morphologie und Bekämpfung der Kräuselmilbe *Calepitrimerus vitis* Nalepa 1905 (Acari, Eriophyoidea). Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Biologie.  
 Duso C., de Lillo E. (1996) - Grape. In: Lindquist E.E., Sabelis M.W., Bruin J. (eds.), Eriophyoid mites their biology, natural enemies and control. Elsevier. World Crop Pests, 6, 571-582.  
 Liguori M. (1987) - Andamento delle popolazioni di Acari fitofagi e predatori in due vigneti del Chianti. *Redia*, LXX, 141-150.  
 Lindquist E.E., Sabelis M.W., Bruin J. (eds.) (1996) - Eriophyoid mites their biology, natural enemies and control. Elsevier. World Crop Pests, 6, 755 pp.  
 Martin J.E.H. (1977) - The insects and arachnids of Canada. Part 1. Collecting, preparing and preserving insects, mites, and spiders. Biosystematics Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada, 1643, 182 pp.  
 Mégevand B. (1997) - Some factors affecting the establishment of exotic Phytoseiids in a new environment. Dissertation for Doctor of Technical Sciences.  
 Pérez-Moreno I., Moraza Zorilla M.L. (1998) - Population dynamics and hibernation shelters of *Calepitrimerus vitis* in the vineyards of Rioja, Spain, with a description of a new eriophyoid extraction technique (Acari, Eriophyidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 22 (4), 215-226.  
 Perring T.M., Farrar C.A., Oldfield G.N. (1996) - Chapter 1.6 Techniques; 1.6.1 sampling techniques. In: Lindquist E.E., Sabelis M.W., Bruin J. (eds.), Eriophyoid Mites - Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier Science B.V., vol. 6, 367-376.  
 Scriven, G.T., McMurtry J.A. (1971) - Quantitative production and processing of Tetranychid Mites for large-scale testing or predator production. *J. Econ. Entomol.*, 64 (5), 1255-1257.  
 Southey J.F. (1986) - Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Reference Book 402, 202 pp.  
 Vial J., Monterrat G. (1971) - Méthode de dénombrement des Acariens par lavage. *Phytiatre-Phytopharmacie*, 20, 128-189.  
 Zandigiacomo P., Coiutti C. (1997) - Indagine sull'acarofauna della vite nel Triestino. *Riv. Vit. Enol.*, L (1), 17-25.  
 Zhao S., Amrine J.W.Jr. (1997) - A new method for studying aerial dispersal behaviour of eriophyoid mites (Acari: Eriophyoidea). *Syst. & Appl. Acarol.*, 2 (1), 107-110.