



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XXVII. RECENTI ACQUISIZIONI PER IL CONTROLLO SOSTENIBILE DI *BACTROCERA OLEAE*



Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXIV - 2016



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia

XXVII.

**RECENTI ACQUISIZIONI PER IL CONTROLLO
SOSTENIBILE DI *BACTROCERA OLEAE***

Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXIV - 2016

© 2017 Accademia Nazionale Italiana di Entomologia
50125 Firenze - Via Lanciola 12/a

ISBN 978-88-96493-11-3

PRESENTAZIONE

La Tavola Rotonda promossa dall'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia è dedicata ad uno degli insetti più importanti per l'agricoltura italiana. Bactrocera oleae è, infatti, il dittero Tephritidae più dannoso all'olivo nell'area mediterranea. Una conoscenza approfondita della mosca delle olive, allo scopo di individuare le strategie più idonee per il suo contenimento, è dunque fortemente sentita sia da parte degli operatori del settore agrario che degli entomologi.

I vari interventi previsti nella riunione odierna, dopo una opportuna introduzione sulle dinamiche di popolazione dell'insetto, spaziano dagli studi sugli aspetti fisiologici relativi alla presenza di chemio-cettori in grado di identificare sia il feromone sessuale, che composti emessi dalla pianta ospite; alla

conoscenza del feromone sessuale della femmina, da utilizzare per il monitoraggio e il mass-trapping dell'insetto; ai meccanismi di difesa attivati dalla pianta ospite attraverso la modifica dell'espressione dei geni per il controllo della biosintesi dei componenti presenti nelle drupe; alla identificazione dei parassitoidi specifici del dittero e particolarmente attivi; agli aspetti relativi alla simbiosi di Bactrocera oleae con Erwinia daciicola, importante per il successo dell'allevamento dell'insetto. Al termine della seduta, la serie di interventi sui diversi temi trattati, ha completato il quadro relativo alla biologia ed al controllo dell'insetto.

ROMANO DALLAI

Presidente Accademia Nazionale Italiana di Entomologia

INDICE

Tavola Rotonda su:

RECENTI ACQUISIZIONI PER IL CONTROLLO SOSTENIBILE DI *BACTROCERA OLEAE*

GAVINO DELRIO, ANDREA LENTINI – <i>Dinamica e fattori di regolazione delle popolazioni della mosca delle olive</i>	Pag. 55
ANGELO CANALE, GIOVANNI BENELLI, GIACINTO SALVATORE GERMINARA, ADRIANO CARPITA, ALFIO RASPI, GIUSEPPE ROTUNDO – <i>Shedding light on the sexual chemoecology of olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae)</i>	» 63
GIACINTO S. GERMINARA, ANTONIO DE CRISTOFARO, GIUSEPPE ROTUNDO – <i>Semiochimici coinvolti nelle interazioni Bactrocera oleae - olivo</i>	» 67
ANTONIO DE CRISTOFARO, GIACINTO S. GERMINARA, GIUSEPPE ROTUNDO – <i>Neuroni sensoriali di Bactrocera oleae (Rossi) coinvolti nella percezione di semiochimici</i>	» 73
ANTONIO PIETRO GARONNA, FILOMENA GRASSO, GIANDOMENICO CORRADO, ROSA RAO – <i>La mosca delle olive Bactrocera oleae (Rossi) e il suo rapporto con la drupa</i>	» 79
LUCA MAZZON, ISABEL MARTINEZ-SAÑUDO, MAURO SIMONATO, VINCENZO GIROLAMI – <i>Considerazioni filogenetiche e biogeografiche su “Candidatus Erwinia dacicola” e prospettive per l’allevamento di Bactrocera oleae (Rossi)</i>	» 85
PATRIZIA SACCHETTI, ANNA LISCIA, ROBERTA PASTORELLI, GAIA BIGIOTTI, ROBERTO GUIDI, ANTONIO BELCARI – <i>Le simbiosi batteriche nella mosca delle olive, Bactrocera oleae: dalla ricerca di base allo sviluppo di nuove strategie di controllo</i>	» 93
VIRGILIO CALECA, CHRISTIAN GIACALONE, MATTEO MALTESE, FRANCESCO TORTORICI – <i>Contenimento naturale di Bactrocera oleae (Rossi): clima o parassitoidi? Confronto tra Western Cape (Sud Africa) e Sicilia</i>	» 99

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 19 FEBBRAIO 2016

Tavola Rotonda su:

RECENTI ACQUISIZIONI PER IL CONTROLLO SOSTENIBILE
DI *BACTROCERA OLEAE*

Coordinatori:

GAVINO DELRIO e GIUSEPPE ROTUNDO, Accademici

DINAMICA E FATTORI DI REGOLAZIONE DELLE POPOLAZIONI DELLA MOSCA DELLE OLIVE

GAVINO DELRIO (*) - ANDREA LENTINI (*)

(*) *Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italia; email: gdelrio@uniss.it*
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

Dynamics and regulation factors of olive fruit fly populations

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Dipt. Tephritidae), is a multivoltine pest species that can complete up to five generations per year in Italy, depending on latitude, altitude, climatic conditions and fruit availability in spring. In coastal areas, olive fly adults are observed all year round, with the highest densities in spring and autumn. Females have immature ovaries in winter, due to low temperatures, and in late spring-early summer, due to unavailability of fruits suitable for oviposition. In spring, *B. oleae* can complete 1-2 generations on unharvested olives, especially in high yield years, and 3-4 generations in summer-autumn. In olive orchards at higher altitudes and in Central Italy, adults emerge in spring from overwintering pupae and oviposit on olives in summer, completing 1-3 generations per year depending on climatic conditions. Population density and intensity of fruit infestation greatly vary depending on biotic and abiotic factors, of which the most important are the climate, yearly meteorological conditions, plant cultivar, crop load, and natural enemies. In a temperate olive-growing area in north-western Sardinia, the crop yield, adult population dynamics, and fruit infestation have been studied for 10 years, as well as mortality rates of immatures inside olives and of overwintering pupae in the soil. The major mortality factors were high summer temperature in July-August, lethal for eggs and newly-hatched larvae, parasitism by *Pnigalio mediterraneus* on larvae, and low temperature and predation on overwintering pupae. However, the key regulation factor of *B. oleae* population density was natality (number of oviposited eggs), which in turn depended on the number of adults produced from previous generations. In particular, the crop yield fluctuations severely affected population abundance and degree of infestation of the olive fruit fly. Overall, the infestation rate was very higher (up to 100%) in years of low-medium crop load than in high yield years.

KEY WORDS: *Bactrocera oleae*, population dynamics, regulation factors.

INTRODUZIONE

La mosca delle olive, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Dipt., Tephritidae) è l'insetto più dannoso all'olivo nell'area mediterranea. La sua distribuzione interessa tutte le aree olivicole italiane, ma l'intensità degli attacchi alle olive varia nelle diverse zone e dipende in generale dalla localizzazione dell'oliveto (posizione geografica, altitudine) e dai fattori climatici associati che determinano il numero di generazioni e che possono limitare l'abbondanza delle popolazioni. Infatti, le basse temperature costituiscono un fattore limitante per la sopravvivenza invernale dell'insetto e rallentano le infestazioni autunnali negli oliveti delle aree settentrionali e di quelli delle aree centrali situati alle quote più elevate, mentre le elevate temperature estive contribuiscono a ridurre gli attacchi nel Meridione. L'entità delle popolazioni della mosca e il livello d'infestazione delle olive subiscono nella stessa località ampie variazioni negli anni in dipendenza di svariati fattori abiotici e biotici, fra cui assumono grande importanza l'andamento meteorologico, la cultivar, la densità di adulti in estate (= massa attaccante dei vecchi autori), l'inizio e la

durata dell'attacco, la produzione di olive e i nemici naturali (LUPO, 1943). Nelle annate favorevoli allo sviluppo dell'insetto e nelle zone litoranee gli attacchi possono essere così gravi da compromettere l'intero raccolto delle olive.

In questa relazione vengono riportati i risultati di alcune ricerche condotte negli ultimi cinquant'anni, soprattutto in Italia e in Grecia, sulla dinamica di popolazione di *B. oleae* e sui fattori che regolano le popolazioni e determinano il grado d'infestazione delle olive. La trattazione di questi argomenti è stata sollecitata dalle notizie riportate dai media nazionali che incolpavano la mosca delle olive come responsabile della forte riduzione di produzione di olive e di olio in tutta Italia nel 2014 (in media del 35% rispetto all'anno precedente) e nel 2016. L'infestazione della mosca delle olive determina certamente una riduzione della quantità e qualità dell'olio, ma non è possibile inferire le cause della scarsa produzione dalla semplice associazione forte attacco-bassa quantità di olive prodotte (fallacia logica: *post hoc vel cum hoc ergo propter hoc*). Infatti, potrebbe verificarsi il contrario e cioè che i forti attacchi siano causati dalle basse produzioni di olive, come si può determinare con ade-

guati studi di dinamica di popolazione condotti durante molti anni (DELRIO, 1978)

FENOLOGIA E DINAMICA DI POPOLAZIONE

Bactrocera oleae è una specie polivoltina che, in funzione della latitudine e dell'altitudine, dell'andamento climatico e della disponibilità di olive sulla pianta anche nel corso dell'inverno e della primavera, può svolgere in Italia da 2-3 fino a 4-5 generazioni all'anno (SILVESTRI, 1907).

Nelle aree olivicole litoranee a clima mite (ad esempio, Liguria, Sardegna, Campania) (RUSSO, 1968; DELRIO e PROTA, 1976; DELRIO e CAVALLORO, 1977; PETACCHI, 1989) gli adulti si riscontrano durante tutto l'anno con una maggiore abbondanza nei mesi autunnali e presentano due periodi di stasi riproduttiva (assenza di uova mature negli ovari) causati, in dicembre-marzo, dalle basse temperature e, in giugno-luglio, dall'assenza di frutti suscettibili per l'ovideposizione (FLETCHER *et al.*, 1978; FLETCHER e KAPATOS, 1983b; GIROLAMI *et al.*, 1989). Tuttavia, l'assenza di maturazione ovarica a fine primavera-inizio estate è stata anche interpretata come una diapausa riproduttiva facoltativa indotta dai cambiamenti del fotoperiodo (RASPI *et al.*, 2002; TZANAKAKIS, 2006). In queste aree, al completamento del processo di lignificazione del nocciolo, le olive da olio diventano ricettive all'attacco nella seconda quindicina di luglio e, nel periodo estivo-invernale, la mosca sviluppa 3 generazioni, che in parte si accavallano. Se nella stessa zona sono coltivate anche varietà precoci a drupa grossa (da mensa), che vengono attaccate a partire dall'inizio di luglio, l'insetto riesce a completare su queste e su quelle da olio fino a 4 generazioni estivo-invernali. La seconda generazione determina l'infestazione più grave in ottobre, mentre gli stadi preimmaginali della terza generazione (novembre-dicembre) vengono decimati dalla raccolta precoce delle olive, sempre più diffusa in Italia. Oltre che allo stadio di adulto, lo svernamento avviene soprattutto a quello di pupa nel terreno e, se sulle piante sono presenti olive ancora pendenti, queste vengono attaccate a partire da fine aprile dando origine a 1-2 generazioni primaverili (DELRIO e PROTA, 1976). L'abbondanza di queste generazioni primaverili è particolarmente elevata nelle piante di grandi dimensioni e negli anni di alta produzione in cui il processo di maturazione delle olive è rallentato e la raccolta integrale con mezzi meccanici è praticamente impossibile. Almeno due generazioni primaverili possono svilupparsi anche sull'olivastro (BLANDO e MINEO, 2006).

Negli oliveti disposti a quote più elevate, come ad esempio in Centro Italia (Alto Lazio, Toscana, Umbria), e in cui le piante hanno minori dimensioni, la raccolta

è integrale e non rimangono olive pendenti sulla pianta in primavera. In questi ambienti, *B. oleae* sverna allo stadio di pupa nel terreno e le femmine attaccano le olive da olio a fine luglio-agosto, dando origine di norma a 2 generazioni nel periodo estivo-autunnale. Tuttavia, il numero delle generazioni, determinato mediante l'analisi della struttura di popolazione (PUCCI e FORCINA, 1981; BELCARI *et al.*, 1983; RASPI *et al.*, 1983; PAPARATTI, 1991) e con l'applicazione di modelli di sviluppo basati sulle somme termiche (CROVETTI *et al.*, 1982; PIZALIS, 1985; BELCARI *et al.*, 1989), può variare da 0 a 3 a seconda delle condizioni climatiche della zona olivicola. Anche in queste aree, i danni maggiori sono causati dalla seconda generazione.

FATTORI DI REGOLAZIONE DELLE POPOLAZIONI

Clima e andamento meteorologico

La temperatura influisce direttamente sulle popolazioni di *B. oleae* agendo come fattore di mortalità, limitando il periodo riproduttivo e determinando la durata del ciclo di sviluppo e, indirettamente, influenzando la fenologia della pianta.

Le possibilità di sopravvivenza dell'insetto e lo stadio di svernamento in ogni ambiente sono influenzati dalle basse temperature invernali. Gli adulti possono tollerare brevi esposizioni a basse temperature (fino a -6°C per 2 ore) e sono in grado di sopravvivere senza nutrirsi per circa due settimane a cicli di temperature costanti di 6 e -3°C con un'alternanza di 12 ore (GIROLAMI, 1979; KOVEOS, 2001). Questa resistenza al freddo potrebbe spiegare lo svernamento allo stadio di adulto (e non di pupa) in alcuni oliveti del Nord Italia (Garda) (ZANGHERI *et al.*, 1973). Nelle zone litoranee con inverni miti gli adulti sfarfallati in dicembre possono sopravvivere fino al 20% sino alla fine di aprile (DELRIO e PROTA, 1976) e attorno all'1% fino a luglio (ARAMBOURG e PRALAVORIO, 1972). Le pupe manifestano una capacità di resistenza alle basse temperature simile a quella degli adulti e possono sopportare temperature di -7°C per 6 ore e temperature da 0 a -3°C anche per numerosi giorni (LA FACE, 1954; GIROLAMI, 1979). Tuttavia, il freddo invernale è considerato il fattore principale di mortalità delle pupe svernanti, che può arrivare a oltre l'80% in alcuni ambienti e addirittura a circa il 99% in inverni particolarmente rigidi (MELIS, 1954; MELIS, 1956; SIGWALT *et al.*, 1967).

Le alte temperature estive (medie mensili superiori a 26°C e punte massime superiori a 34°C) spesso collegate a una bassa umidità relativa dell'aria possono avere un effetto diretto sugli adulti, aumentando la mortalità, limitando la maturazione delle uova e favorendo il riassorbimento dei follicoli ovarici (AVIDOV,

1957; FLETCHER *et al.*, 1978; BROUFAS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009). Le alte temperature giornaliere superiori per qualche ora a 34°C costituiscono inoltre uno dei più importanti fattori di mortalità di uova e larve, mentre le pupe risultano più tolleranti (PUCCI *et al.*, 1985; PAPPAS *et al.*, 2011). In coincidenza con questi estremi termici sono state osservate mortalità di oltre il 90% di uova e larve neonate su olive da olio, soprattutto all'inizio dell'attacco estivo durante la fase di lignificazione del nocciolo (DELRIO, 1978). La persistenza di massimi termici (34-40 °C) per 11 giorni ha annullato quasi del tutto le prime due generazioni estive nel 1999 in Sardegna (DELRIO *et al.*, 2005).

La relazione fra temperature, costanti e/o variabili, e durata di sviluppo degli stadi preimmaginali di *B. oleae* è stata studiata da diversi autori in laboratorio e in campo (GIROLAMI, 1979; NEUENSCHWANDER e MICHELAKIS, 1979; CROVETTI *et al.*, 1982; FLETCHER e KAPATOS, 1983a) e consente di stimare, sulla base delle somme termiche, il numero di generazioni che l'insetto può compiere in ogni determinata area climatica (BELCARI *et al.*, 1989). Sono stati anche realizzati modelli demografici basati sugli effetti della temperatura su durata di sviluppo, mortalità, longevità e fecondità delle femmine, che consentono di simulare la dinamica di popolazione dell'insetto (NEUENSCHWANDER e COMINS, 1985; COSSU *et al.*, 1999; GILIOLI e COSSU, 2002). Con questi modelli è stato possibile simulare anche gli effetti del riscaldamento globale in Italia sull'olivo e su *B. oleae*, le cui infestazioni potrebbero manifestare un aumento nelle zone oleicole più elevate e attorno al Lago di Garda (GUTIERREZ *et al.*, 2009).

La piovosità invernale potrebbe avere un effetto importante sulla mortalità delle pupe svernanti in terreni pesanti (NEUENSCHWANDER *et al.*, 1981), mentre quella nel periodo estivo è stata considerata da tempo un fattore predisponente le infestazioni nell'Italia meridionale, perché rende le olive più succose e quindi più recettive all'ovideposizione, accelerando anche lo sviluppo delle larve della prima generazione (BUA, 1934; ROCCHI, 1936; LUPO, 1943; RUSSO e SANTORO, 1952). D'altra parte gli oliveti irrigui sono i primi a subire l'attacco della mosca e le infestazioni sono anche maggiori rispetto a quelli condotti in asciutto. Tuttavia, in Sicilia e Sardegna con osservazioni condotte per una lunga serie di anni, non è stato possibile trovare netti rapporti di interdipendenza fra le precipitazioni estive e le infestazioni (MONASTERO, 1954; DELRIO, 1978).

Pianta ospite

L'olivo è una pianta con un ciclo biennale di produzione dei frutti geneticamente determinato, che dà luogo ad un anno di elevata produzione (carica) a cui

succede un anno di basso raccolto (scarica) (LAVEE, 2007). Tuttavia, il grado di produzione alternata è influenzato dalle condizioni ambientali (ed è per questo spesso sincronizzato nella stessa area olivicola) e può variare a seconda del clima di ogni singola regione, dell'età delle piante e di alcune pratiche agronomiche (in particolare la potatura).

Negli oliveti soggetti a una forte alternanza di produzione, la quantità di olive presenti influisce direttamente sull'infestazione dell'annata e indirettamente su quella dell'anno successivo. L'abbondanza degli adulti e l'infestazione delle olive sono state studiate per 5 anni consecutivi in un oliveto da olio della Sardegna in cui l'alternanza era molto pronunciata. La percentuale di olive infestate alla raccolta è stata del 35-50% nei 3 anni di medio-alta produzione (24-45 Kg di olive/pianta) e quasi totale nei 2 anni di scarica (5-6 Kg/pianta) in cui ha determinato una cascola completa. Il numero di adulti presenti in estate prima dell'inizio dell'attacco è risultato basso nelle annate di alta produzione, perché derivante dalle pupe svernanti prodotte da infestazioni totali ma su un basso numero di olive dell'anno precedente, e alto nelle annate di scarica, perché derivato da una infestazione media su un altissimo numero di olive. Inoltre, negli anni di carica, a causa della maturazione rallentata e disforme delle olive che limita la raccolta integrale con mezzi meccanici, molte drupe rimangono sulla pianta e consentono lo sviluppo di generazioni primaverili della mosca che vanno ad incrementare l'abbondanza della massa attaccante (Fig. 1) (DELRIO *et al.*, 1978). Lo stesso tipo di regolazione delle popolazioni è stato osservato negli oliveti alternanti di Creta (MICHELAKIS e NEUENSCHWANDER, 1985). Il ruolo fondamentale del ciclo biennale di produzione dei frutti nel determinare i livelli di infestazione e di abbondanza degli adulti è stato anche documentato con ricerche durate 10 anni nel territorio di Canino (Lazio), in cui la percentuale di infestazione delle olive è risultata alternante con picchi massimi nelle annate di scarsa produzione (CIRIO *et al.*, 1994).

Predazione e parassitismo

Le pupe svernanti permangono nel terreno per alcuni mesi e possono andare incontro ad una forte mortalità causata, oltre che dai fattori abiotici, anche dall'azione di predatori terricoli (Ragni, Carabidi, Stafilinidi, Formicidi, etc.). Il ruolo dei predatori è stato studiato solo in pochi ambienti e sembra maggiore nelle aree olivicole con clima invernale mite (CAVALLORO e DELRIO, 1975; GONCALVES *et al.*, 2012).

In Italia, le larve di *B. oleae* sono attaccate da alcuni Calcidoidei ectofagi [*Pnigalio mediterraneus* Ferrière et Delucchi, *Eurytoma martellii* Domenichini e *Cyrtoptyx latipes* (Rondani)] e le pupe da *Eupelmus urozonus* s.l., che però sull'olivo si comporta essen-

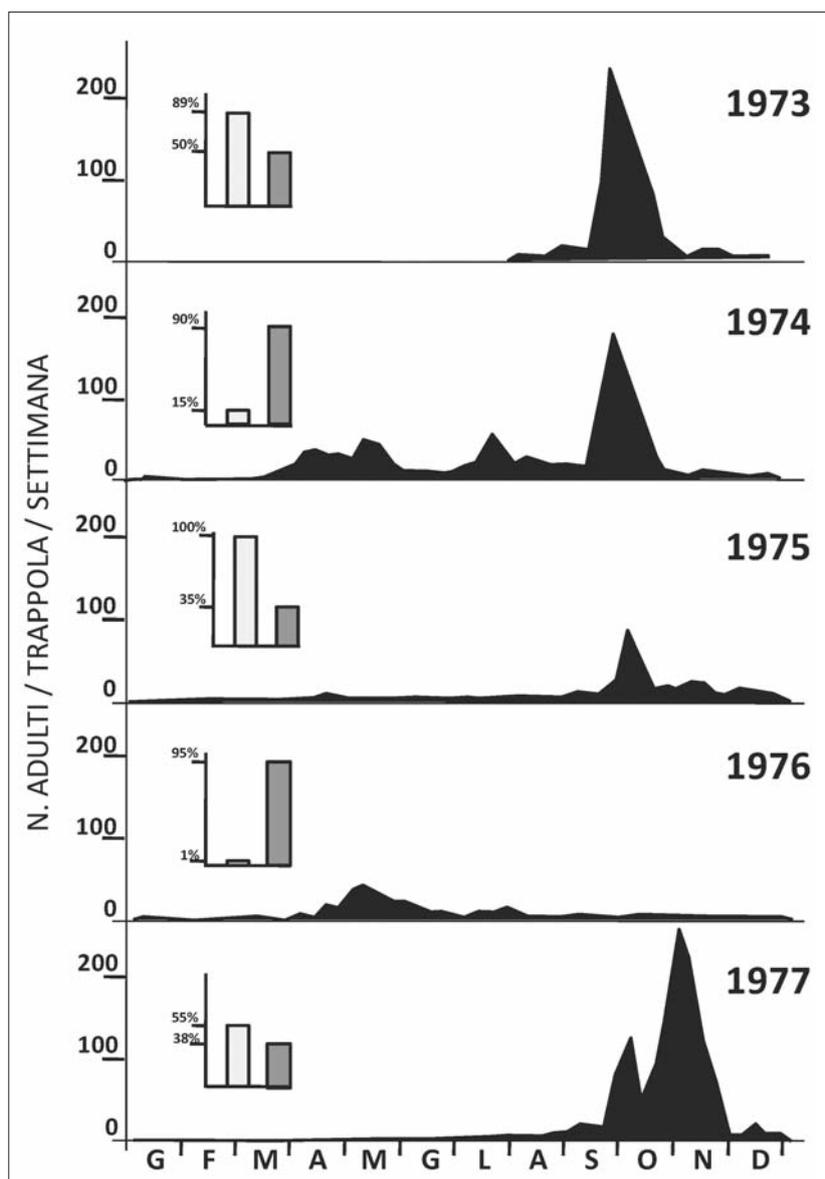


Fig. 1 – Catture di adulti di *Bactrocera oleae* a trappole gialle in un oliveto della Sardegna nord-occidentale (SORSO, 1973-1977). Negli istogrammi la colonna chiara rappresenta la produzione di olive (100% = 45 kg/pianta) mentre quella grigio scura l'infestazione alla raccolta (da DELRIO *et al.*, 1978).

zialmente da iperparassita (RUSSO L., 1967; ROBERTI e MONACO, 1967; ARAMBOURG e PRALAVORIO, 1974; DELRIO *et al.*, 2007). Questi Calcidoidei sono specie polifaghe di cui sono conosciuti soltanto pochi ospiti oltre a *B. oleae*, ad esclusione di *E. urozonus* che attacca moltissime specie di insetti di diversi Ordini. La frequenza di questi parassitoidi varia nelle diverse località e dipende fortemente dalla presenza di convittime, che si sviluppano su altre piante (BOCCACCIO e PETACCHI, 2009). Solamente *P. mediterraneus* ed *E. urozonus* trovano altri ospiti sull'olivo o nell'oliveto e, infatti, risultano i parassitoidi più frequenti. In alcune aree meridionali le larve della mosca delle olive sono attaccate anche da un Braconide endofago, *Psytalia concolor* (Szepliget), che però esplica

la sua massima attività parassitaria a fine stagione. Il tasso di parassitismo raggiunto nei mesi estivi dal complesso di questi entomofagi può raggiungere in alcuni casi il 60-70%, apportando un notevole contributo al controllo delle popolazioni della mosca, che però non è mai sufficiente a bloccare le infestazioni (ARAMBOURG e PRALAVORIO, 1974; DELRIO e PROTA, 1976).

FATTORI DETERMINANTI L'ABBONDANZA DI POPOLAZIONE

Nella stessa area olivicola, l'abbondanza di popolazione e l'intensità degli attacchi sono molto varia-

bili negli anni e sono influenzate da diversi fattori abiotici e biotici, fra cui assumono grande importanza l'andamento meteorologico, la produzione di olive e i nemici naturali (LUPO, 1943). Per determinare i fattori chiave di regolazione delle popolazioni è necessario però compiere studi di dinamica di popolazione prolungati negli anni, costruendo tavole della vita e identificando il contributo dei fattori che agiscono sulla mortalità e sulla natalità (n. di uova deposte) delle diverse generazioni (KAPATOS e FLETCHER, 1986; KAPATOS, 1989).

In un oliveto collinare (350 m s.l.m) della Sardegna nord-occidentale sono state rilevate durante 10 anni consecutivi le produzioni di olive, le popolazioni di adulti, le infestazioni e sono state stimate le mortalità degli stadi preimmaginali nelle olive e delle pupae svernanti nel terreno (DELRIO e PROTA, 1990). La fruttificazione è stata molto variabile, ma non alterante, con 2 annate consecutive di medio-alta pro-

duzione (39-71 Kg/pianta) seguite da un anno di scarica (13-27 Kg). Gli adulti di *B. oleae* sono stati catturati con trappole gialle durante tutto l'anno e le loro popolazioni sono variate irregolarmente negli anni. Sono state rilevate 3 generazioni estivo-autunnali e, solamente in 3 anni, una quarta generazione primaverile perché non si era potuto procedere alla raccolta integrale delle olive, che veniva fatta manualmente. Sono state costruite tavole della vita, stimando le mortalità di tutti gli stadi preimmaginali e il numero di uova deposto (natalità) per ognuna delle 30 generazioni estivo-autunnali utilizzando il metodo sviluppato da KAPATOS e FLETCHER (1986). Recentemente questi dati sono stati elaborati utilizzando il metodo dell'analisi dei fattori chiave (VARLEY e GRADWELL, 1960) modificato da SOUTWOOD (1978) per le specie con generazioni che si accavallano (KAPATOS e FLETCHER, 1986) (Fig. 2). I fattori di mortalità più rilevanti sugli stadi preimmaginali sono

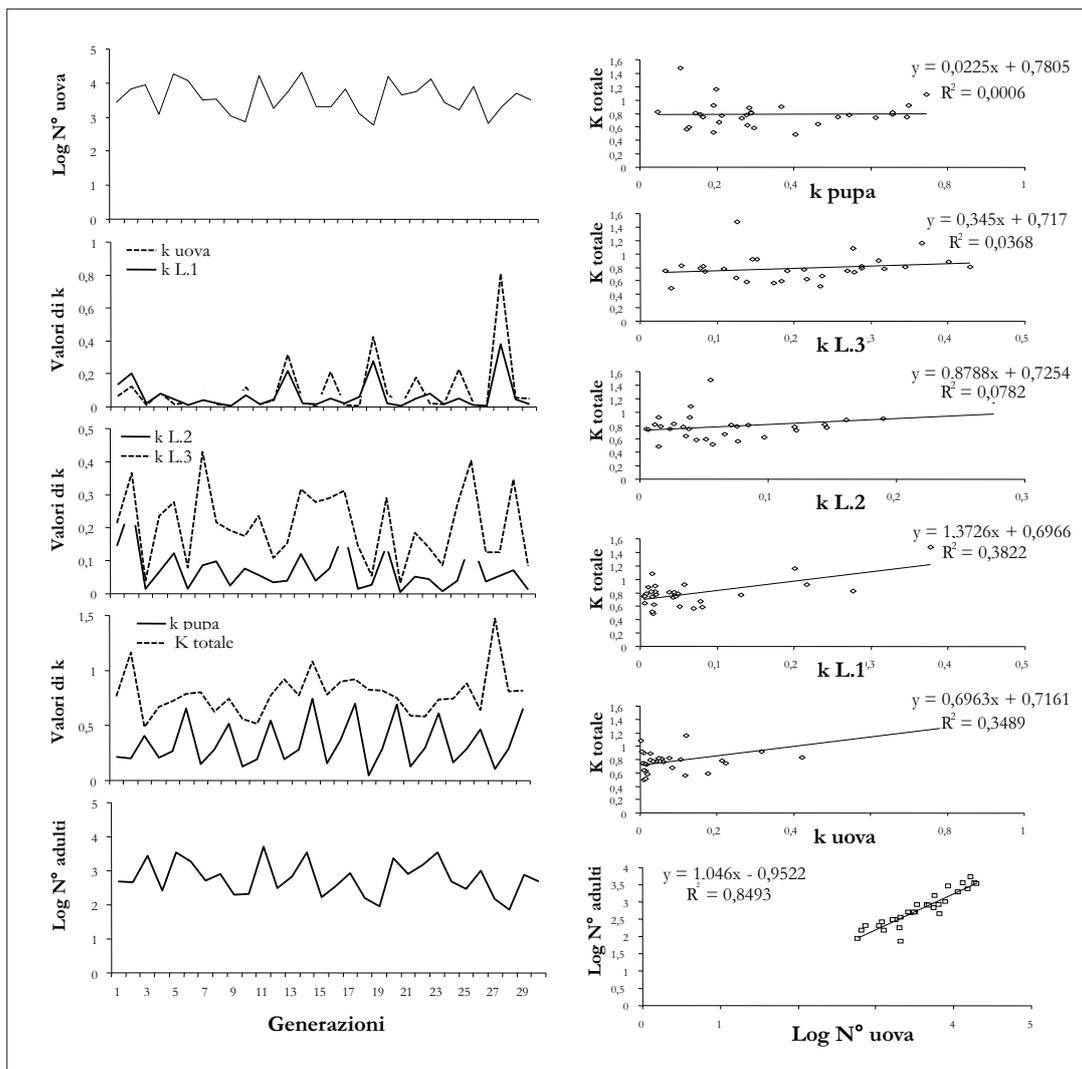


Fig. 2 - Analisi dei fattori chiave di una popolazione di *Bactrocera oleae* in Sardegna (Ossi, 1974-1983). Natalità (numero uova deposte) e mortalità di 30 generazioni estivo-autunnali (grafici a sinistra). Relazione tra mortalità totale (K) e mortalità dei singoli stadi (k) e fra numero di uova deposte e numero di adulti sfarfallati per ogni generazione (grafici a destra).

stati: le alte temperature di luglio-agosto che agiscono su uova e larve neonate della prima generazione, il parassitismo di *P. mediterraneus* ed *E. urozonus* su larve e pupe della seconda generazione e le basse temperature e la predazione sulle pupe svernanti nel terreno della terza generazione. La mortalità totale (K), da uovo ad adulto, è risultata correlata solo con la mortalità parziale (k) delle uova e delle larve di 1 età ($R^2 = 0,34-0,38$) Tuttavia, il numero di adulti prodotto da ogni generazione sembra essere più correlato con il numero di uova deposte dagli adulti della generazione precedente ($R^2 = 0,85$) piuttosto che con la mortalità totale. Dall'analisi dei fattori chiave si può quindi dedurre che il fattore che ha influito maggiormente sulle variazioni delle popolazioni studiate sia stato la natalità (n. di uova deposte), a sua volta dipendente dal numero di adulti prodotti dalle generazioni precedenti e dai fattori che influenzano la fecondità (andamento climatico, quantità di olive e nutrimento degli adulti). In particolare, le variazioni di produzione di olive negli anni hanno influenzato l'abbondanza delle popolazioni di *B. oleae* e il livello di infestazione. In generale, le infestazioni sono state molto alte (fino al 100%) negli anni di bassa e media produzione di olive e più limitate in quelli di alta produzione. Una simile conclusione, basata sullo studio delle tavole della vita, è stata raggiunta a Corfù in uno studio durato 2 anni (KAPATOS e FLETCHER, 1986).

CONCLUSIONI

La mosca delle olive è una specie r strategista le cui popolazioni sono limitate dalla quantità di frutti disponibili (SOUTHWOOD, 1977). Nelle aree olivicole a clima mite, in cui l'insetto può compiere 4-5 generazioni all'anno ed è meno soggetto ai fattori climatici, l'abbondanza di adulti di ogni generazione è variabile e dipende essenzialmente dal numero di uova deposte dagli adulti della generazione precedente e dalla disponibilità di frutti. Le popolazioni della mosca delle olive e le infestazioni sono pertanto determinate non dai fattori che agiscono sulla mortalità (temperature ed entomofagi), ma dalla produzione delle piante. L'andamento biennale della produzione delle olive tipico dell'olivicoltura tradizionale determina maggiori infestazioni nelle annate di scarica e minori in quelle di carica.

Nelle zone climatiche meno favorevoli all'insetto, come quelle caratterizzate da inverni rigidi oppure da elevate temperature estive, anche i fattori meteorologici potrebbero avere un ruolo importante nel determinare le variazioni di abbondanza delle popolazioni e le infestazioni sulle drupe.

RIASSUNTO

La mosca delle olive, *Bactrocera oleae* (Rossi), è una specie polivoltina che, in funzione della latitudine e dell'altitudine, dell'andamento climatico e della disponibilità di olive sulla pianta anche in primavera, può svolgere in Italia fino a 5 generazioni. Nelle aree litoranee con clima mite l'adulto si riscontra durante tutto l'anno, con massima densità in primavera ed autunno. Le femmine hanno gli ovari immaturi in inverno, a causa delle basse temperature e, a fine primavera-inizio estate, probabilmente per l'assenza di olive ricettive per l'ovideposizione. In primavera *B. oleae* può sviluppare 1-2 generazioni sulle olive rimaste sulla pianta, particolarmente nelle annate di alta produzione, e 3-4 generazioni in estate-autunno. Negli oliveti situati ad altitudine più elevata e nell'Italia centrale, gli adulti nascono in primavera dalle pupe svernanti e attaccano le olive in estate dando origine a 1-3 generazioni autunnali a seconda delle condizioni climatiche. L'abbondanza di popolazione e l'intensità degli attacchi alle olive sono molto variabili negli anni e sono influenzate da diversi fattori abiotici e biotici, fra cui assumono grande importanza il clima, l'andamento meteorologico, la cultivar, la quantità di olive e i nemici naturali. In un'area olivicola a clima mite (Sardegna nord-occidentale) sono state rilevate durante 10 anni le produzioni di olive, le popolazioni di adulti, le infestazioni e sono stati stimate le mortalità degli stadi preimmaginali nelle olive e delle pupe svernanti nel terreno. I fattori di mortalità più rilevanti sono stati: le alte temperature di luglio-agosto che agiscono su uova e larve neonate, il parassitismo di *Pnigalio mediterraneus* sulle larve e le basse temperature e la predazione sulle pupe svernanti nel terreno. Tuttavia, il fattore che ha influito maggiormente sulle variazioni di popolazione è risultato la natalità (n. di uova deposte), a sua volta dipendente dal numero di adulti prodotti dalle generazioni precedenti. In particolare, le variazioni di produzione di olive negli anni hanno influenzato l'abbondanza delle popolazioni di *B. oleae* e il livello di infestazione. In generale, le infestazioni sono state molto alte (fino al 100%) negli anni di bassa e media produzione di olive e più limitate in quelli di alta produzione.

BIBLIOGRAFIA

- ARAMBOURG Y., PRALAVORIO R., 1972 – *Survie hivernale de Dacus oleae Gmel.* - Anns. Zool.- Ecol. Anim., 2 (4): 659-662.
- ARAMBOURG Y., PRALAVORIO R., 1974 – *Les chalcidiens ectophages (Hym. Chalcidoidea) parasites de Dacus oleae Gmel. (Dipt. Trypetidae).* - Ann. Inst. phytopath. Benaki. N.S. 11 (1): 30-46.
- AVIDOV Z., 1957 – *Phenology of the olive fruit fly (Dacus oleae Gmel.) in the coastal plain of Israel.* - Ktavim, Rehovot, 8 (1-2): 105-116.
- BELCARI A., LOI G., PAPERATI B., RASPI A., BAGNOLI B., 1983 – *Indagini preliminari condotte negli anni 1977-79 in differenti aree olivicole della Toscana sullo sviluppo del Dacus oleae (Gmel.).* - L'agric. Ital. 5/6: 3-13.
- BELCARI A., RASPI A., CROVETTI A., 1989 – *Studies for the realisation of a regional chart of dacic risk, based on climatic, phenological and biological parameters.* In: R. Cavalloro (Ed), Proc. CEC/IOBC Int. Symp. Fruit Flies of Economic Importance 87, Rome, 7-10 April 1987: 49-60. A.A. Balkema, Rotterdam.
- BLANDO S., MINEO G., 2006 – *Generazioni primaverili della mosca delle olive sull'olivastro (Olea europaea var.*

- sylvestris Brot.) in Sicilia. - Boll. Zool. agr. Bachic., Ser. II, 38 (2): 173-178.
- BOCCACCIO L., PETACCHI R., 2009 - *Landscape effects on the complex of Bactrocera oleae parasitoids and implications for conservation biological control.* - BioControl, 54: 607-616.
- BROUFAS G. D., PAPPAS M. L., KOVEOS D.S., 2009 - *Effect of relative humidity on longevity, ovarian maturation, and egg production in the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae).* - Ann. Entomol. Soc. Am., 102 (1): 70-75.
- BUA G., 1934 - *I fattori meteorologici e la mosca dell'olivo.* - La Meteorologia Pratica, XV (3): 3-12.
- CAVALLORO R., DELRIO G., 1975 - *Osservazioni sulla distribuzione e sopravvivenza delle pupe di Dacus oleae Gmelin nel terreno.* - Redia, LXI: 167-175.
- CIRIO U., GAZZIANO S., LIPIZZI F., MENNA C., 1994 - *Distribuzione spazio-temporale di Bactrocera oleae (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) nel territorio di Canino (Prov. Di Viterbo).* - Atti XVII Congresso nazionale italiano di Entomologia, Udine 13-18 giugno 1994: 581-584.
- CROVETTI A., QUAGLIA F., LOI G., ROSSI E., MALFATTI P., CHESI F., CONTI B., BELCARI A., RASPI A., PAPANATTI B., 1982 - *Influenza di temperatura e umidità sullo sviluppo degli stadi preimmaginali di Dacus oleae (Gmel.).* - Frustula Entomologica, n.s. V: 155-136.
- COSSU A., DELRIO G., DI COLA G., GILIOLI G., 1999 - *Modelli matematici nella protezione integrata delle colture in Sardegna.* Collana di Agrometeorologia per la Sardegna, Nota Tecnica SAR 3 - 1999
- DELRIO G., 1978 - *Fattori di regolazione delle popolazioni di Dacus oleae Gmelin nella Sardegna nord-occidentale.* - Notiziario sulle Malattie delle piante, 98-99: 27-45.
- DELRIO G., CAVALLORO R., 1977 - *Reperti sul ciclo biologico e sulla dinamica di popolazione del Dacus oleae Gmelin in Liguria.* - Redia, LX; 221-253
- DELRIO G., PROTA R., 1976 - *Osservazioni eco-etologiche sul Dacus oleae Gmelin nella Sardegna nord-occidentale.* - Boll. Zool. agr. Bachic., Ser. II, 13:
- DELRIO G., PROTA R., 1990 - *Determinants of abundance in a population of the olive fruitfly.* - Frustula Entomologica, n.s. XI: 47-55.
- DELRIO G., LENTINI A., SATTÀ A., 2005 - *Biological control of olive fruit fly through inoculative releases of Opius concolor Szépl.* - IOBC/wprs Bulletin., 28 (9): 53-58.
- DELRIO G., LENTINI A., SATTÀ A., 2007 - *Augmentative releases of Eupelmus urozonus Dalm. against the olive fruit fly and observations on its facultative hyperparasitism.* - IOBC wprs Bull., 30 (9).
- DELRIO G., LUCIANO P., ORTU S., PROTA R., 1978 - *Variazioni delle popolazioni di Dacus oleae Gmel. e programmazione della lotta nell'olivicoltura sarda.* - Atti Giornate Fitopatologiche 1978: 269-276.
- FLETCHER B.S., KAPATOS E.T., 1983a - *An evaluation of different temperature-development rate models for predicting the phenology of the olive fly Dacus oleae.* - In: R. Cavalloro (Ed.) Proc. CEC/IOBC Int. Symposium Athens/Greece/ 16-19 November 1982: 321-329.
- FLETCHER B.S., KAPATOS E.T., 1983b - *The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year.* - Ent. exp. & appl., 33: 244-252.
- FLETCHER B.S., PAPPAS S., KAPATOS E., 1978 - *Changes in the ovaries of olive flies (Dacus oleae (Gmelin)) during the summer and their relationship to temperature, humidity and fruit availability.* - Ecol. Entomol., 3: 99-107.
- GILIOLI G., COSSU A., 2002 - *Prime validazioni di un Individual-based Model per la simulazione della dinamica di popolazioni di Bactrocera oleae (Gmelin).* - Atti XIX Congresso nazionale italiano di Entomologia, Catania 10-12 giugno 2002: 685-691.
- GIROLAMI V., 1979 - *Studi biologici e demoeologici sul Dacus oleae (Gmelin). 1. Influenza dei fattori ambientali abiotici sull'adulto e sugli stadi preimmaginali.* - Redia LXII: 147-191.
- GIROLAMI V., RENSI F., PAVAN F., STRAPAZZON A., BRIAN E., 1989 - *Host plant stimulation of oogenesis in Dacus oleae Gmel.* - In: R. Cavalloro (Ed), Proc. CEC/IOBC Int. Symp. Fruit Flies of Economic Importance 87, Rome, 7-10 April 1987: 159-167. A.A. Balkema, Rotterdam.
- GONCALVES F.M., RODRIGUES M.C., PEREIRA J.A., THISTLEWOOD H., TORRES L.M., 2012 - *Natural mortality of immature stages of Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae) in traditional olive groves from north-eastern Portugal.* - Biocontrol Science and Technology, 22 (7): 837-854.
- GUTIERREZ A.P., PONTI L., COSSU Q.A., 2009 - *Effects of climate warming on Olive and olive fly (Bactrocera oleae (Gmelin) in California and Italy.* - Climatic Change, DOI 10.1007/s10584-008-9528-4
- KAPATOS E.T., 1989 - *Demography and life tables of fruit flies.* In: Fruit Flies of Economic Importance 87. Proc. CEC/IOBC Int. Symp. Rome/Italy/ 7-10 April 1987: 15-23.
- KAPATOS E. T., FLETCHER B. S., 1984 - *The phenology of the olive fly, Dacus oleae (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu.* - Z. ang. Ent., 97: 360-370.
- KAPATOS E. T., FLETCHER B. S., 1986 - *Mortality factors and life-budgets for immature stages of the olive fly, Dacus oleae (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu.* - J. Appl. Ent., 102: 326-342.
- KOVEOS D.S., 2001 - *Rapid cold hardening in the olive fruit fly Bactrocera oleae under laboratory and field conditions.* - Ent. Exp. & appl., 101: 257-263.
- LA FACE L., 1954 - *Sul comportamento invernale e primaverile della mosca delle olive (Dacus oleae) in provincia di Latina ed alcune norme di lotta contro l'insetto.* Rc. Ist. Sup. Sanità, XVII (VII): 521-529.
- LAVEE S., 2007 - *Biennial bearing in olive (Olea europaea).* - Annales - Ser. hist. nat., 17: 101-112.
- LUPO V., 1943 - *L'andamento climatico, la mosca delle olive e sua migrazione.* - Boll. Lab. Zool. Gen. agr. Portici, 31: 135-177.
- MELIS A., 1954 - *Il peso esercitato sul comportamento del Dacus oleae Gmel. dal fattore termico.* - Redia, XXXIX: 1-28.
- MELIS A., 1956 - *Ancora il fattore termico causa determinante dell'entità degli sfarfallamenti invernali e primaverili del Dacus nel 1954-55.* - Redia, XLI: 1-22.
- MICHELAKIS S.E., NEUENSCHWANDER P., 1985 - *Bio-ecological data on Dacus oleae (Gmel.) for selective control in Crete, Greece.* In: R. Cavalloro & A. Crovetti (Eds.). Proc. CEC/FAO/IOBC Int. Joint Meeting Integrated Pest Control in Olive-groves, Pisa, 3-6 April 1984: 94-103. A.A. Balkema, Rotterdam.
- MONASTERO S., 1954 - *Sui rapporti tra fattori climatici e infestazione dacica.* - Boll. Ist. Ent. Agr. Oss. Fitopat. Palermo, 1: 9-54
- NEUENSCHWANDER P., COMINS H., 1985 - *The development and use of a computer simulation model to study the population dynamics of Dacus oleae and other fruit flies.* - Atti XIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Palermo, Erice, Bagheria 1989: 561-575.

- NEUENSCHWANDER P., MICHELAKIS S., 1979 – *Determination of the lower thermal thresholds and day-degree requirements for eggs and larvae of Dacus oleae (Gmel.) (Diptera: Tephritidae) under field conditions in Crete, Greece.* - Bull. Soc. Entomol. Suisse, 52: 57-74.
- NEUENSCHWANDER P., MICHELAKIS S., BIGLER F., 1981 – *Abiotic factors affecting mortality of Dacus oleae larvae and pupae in the soil.* - Ent. Exp. & appl., 30: 1-9.
- PAPARATTI B., 1991 – *Dacus oleae (Gmel.): Dinamica di popolazione degli adulti, sex ratio e analisi dell'infestazione delle drupe nel triennio 1988-90, in un oliveto della cultivar "Canino" in Provincia di Viterbo.* - Frustula Entomologica, n.s. XIV: 55-69.
- PAPPAS M.L., BROUFAS G.D., KOUFALI N., PIERI P., KOVEOS D.S., 2011 – *Effect of heat stress on survival and reproduction of the olive fruit fly Bactocera (Dacus) oleae.* - J. Appl. Entomol., 135: 359-366.
- PETACCHI R., 1989 – *Dacus oleae (Gmelin): primi risultati di uno studio poliennale sulla dinamica dell'infestazione in due biotopi della Liguria di Levante.* - Frustula Entomologica, n.s. XII: 71-90.
- PITZALIS M., 1985 – *Bioclimatology and insect development forecast: Degree days and phenophases of Dacus oleae (Gmel.).* In: R. Cavalloro & A. Crovetto (Eds.). Proc. CEC/FAO/IOBC Int. Joint Meeting Integrated Pest Control in Olive-groves, Pisa, 3-6 April 1984: 84-93. A.A. Balkema, Rotterdam.
- PUCCI C., FORCINA A., 1981 – *Dinamica di popolazione degli stadi preimmaginali del Dacus oleae (Gmel.) nelle drupe.* - Frustula Entomologica, n.s. 4: 3-43.
- PUCCI C., MONTANARI G.M., BAGNOLI B., 1985 – *Influence of some climatic factors on mortality of eggs and larvae of Dacus oleae (Gmel.).* In: R. Cavalloro & A. Crovetto (Eds.). Proc. CEC/FAO/IOBC Int. Joint Meeting Integrated Pest Control in Olive-groves, Pisa, 3-6 April 1984: 78-83. A.A. Balkema, Rotterdam.
- RASPI A., IACOMO E., CANALE A., 2002 – *Variable photoperiod and presence of mature eggs in olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera, Tephritidae).* - Redia, 85: 111-119.
- RASPI A., MALFATTI P., ANTONELLI R., 1983 – *Ricerche per l'applicazione di metodologie statistiche nella lotta integrata in olivicoltura. Analisi dei dati ottenuti con la sperimentazione eseguita ad Asciano (Pisa) nel 1983.* - Frustula Entomologica, n.s. VII: 395-412.
- ROBERTI D., MONACO R., 1967 – *Osservazioni eseguite in Puglia nel 1966 sui parassiti ectofagi delle larve della mosca delle olive (Dacus oleae Gmel.) in relazione anche ai trattamenti con esteri fosforici.* - Entomologica, III: 237-275.
- ROCCHI M., 1936 – *Effetto dei fattori meteorologici sullo sviluppo e la diffusione della mosca dell'olivo.* - La Meteorologia Pratica, XVII (3): 3-11.
- RUSSO G., 1968 – *Osservazioni bio-ecologiche sul Dacus oleae GMEL. e prove di lotta chimica antidacica in Ascea Marina.* - Boll. Lab. Ent. Agr. Portici, XXVI: 63-98.
- RUSSO G., SANTORO R., 1952 – *Esperimenti di lotta antidacica in Ascea Marina (Salerno) nel 1951.* - Boll. Lab. Ent. Agr. « Filippo Silvestri », XI: 256-311.
- RUSSO L., 1967 – *Studio sugli Imenotteri parassiti della Mosca delle olive (Dacus oleae Gmel.) in Campania.* - Boll. Lab. Ent. Agr. Portici, 25: 177-228.
- SIGWALT B., MICHELAKIS S., ALEXANDRAKIS V., 1977 – *L'hivernation de Dacus oleae Gmel. (Dipt., Tephritidae) à l'état de pupe.* - Ann. Zool. Ecol. Anim., 9 (2): 287-297.
- SILVESTRI F., 1907 – *Generazioni della mosca delle olive.* - Boll. Lab. Zool. Gen. Agr., Portici, 2: 13-17.
- SOUTHWOOD T.R.E., 1977 – *Habitat, the templet for ecological strategies?* - J. Anim Ecol., 46: 337-365.
- SOUTHWOOD T.R.E., 1978 – *Ecological methods with particular reference to the study of insect populations.* - London, Chapman and Hall.
- TZANAKAKIS M.E., 2006 – *Insect and mites feeding on olive. Distribution, importance, habits, seasonal development, and dormancy.* Brill. Leiden, pp. 1-182.
- VARLEY G.C., GRADWELL G.R., 1960 – *Key factors in population studies.* - J. Anim. Ecol., 29: 399-401.
- WANG X-G., JOHNSON M.W., DAANE K.M., NADEL H., 2009 – *High summer temperatures affect the survival and reproduction of olive fruit fly (Diptera: Tephritidae).* - Environ. Entomol., 38: 1496-1504.
- ZANGHERI S., MASUTTI L., CAVALLORO R., GIROLAMI V., 1973 – *Nuovi orientamenti nella lotta contro il Dacus oleae Gmelin: saggi preliminari e prospettive di studio biologico e demoeologico nell'Italia settentrionale.* - Redia, LIV: 73-82.

SHEDDING LIGHT ON THE SEXUAL CHEMOECOLOGY OF OLIVE FRUIT FLY, *BACTROCERA OLEAE* (ROSSI) (DIPTERA: TEPHTRITIDAE)

ANGELO CANALE (*) - GIOVANNI BENELLI (*) - GIACINTO SALVATORE GERMINARA (**)
ADRIANO CARPITA (***) - ALFIO RASPI (*) - GIUSEPPE ROTUNDO (****)

(*) *Università di Pisa, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, via del Borghetto 80, 56124 Pisa, Italy; correspondence: angelo.canale@unipi.it*

(**) *Università di Foggia, Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, via Napoli 25, 71122 Foggia, Italy*

(***) *Università di Pisa, Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, via Moruzzi, 13, 56124 Pisa, Italy*

(****) *Università del Molise, Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti, via De Sanctis, 86100 Campobasso, Italy*

Letture tenuta durante la Tavola Rotonda "Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

Shedding light on the sexual chemoecology of olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae)

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, has a peculiar sexual chemical ecology, guided by both male- and female-borne olfactory cues, mostly produced in glands associated to the rectal ampulla. Despite the research on *B. oleae* female pheromones has a long history, only few components (mainly 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane) have been investigated in-depth. Recently it has been outlined that young *B. oleae* males also produce 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane in the rectal glands. Then, when males become sexually mature, they increase the production of (Z)-9-tricosene, which attracts females. Furthermore, *B. oleae* females produce a multi-component sex pheromone containing 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane, methyl dodecanoate, alpha-pinene, nonanal, and several C6-C18 fatty acid esters. Two of the latter group (i.e. methyl hexadecanoate and ethyl decanoate) attracted males and females, respectively. To the best of our knowledge, this is the first report on a female-borne compound attracting conspecific females in tephritid flies.

KEY WORDS: courtship; Integrated Pest Management; oleon; rectal glands; (Z)-9-tricosene

INTRODUCTION

The family Tephritidae (Diptera), also known as "true fruit flies", contains over 4,000 species, many of which constitute enormous threats to fruit and vegetable production throughout the world (BENELLI *et al.*, 2014a, b). The olive fruit fly is a tephritid carpophagous on fruits of a few *Olea* species, including *Olea europaea* L. Nowadays, it is considered the major pest of commercial olives world-wide, affecting almost all the world olive production with few exceptions in isolated areas where low temperatures limit its occurrence (DAANE & JOHNSON, 2010).

The control of *B. oleae* is based mainly on the use of chemical insecticides, posing serious threats to human health and environmental safety (STARK *et al.*, 2004; THOMAS & MANGAN, 2005). Some plant-borne compounds have been proposed as potentially useful chemicals against *B. oleae* (CANALE *et al.*, 2013a). However, they are toxic against non-target arthropods, such as olive fruit fly parasitoids (BENELLI *et al.*, 2013a). Concerning natural enemies, several braconid species were proposed to improve IPM programs against the

olive fruit fly (WANG *et al.*, 2011), but no consistent results were obtained in the control of *B. oleae* populations (YOKOYAMA *et al.*, 2008; CANALE & BENELLI, 2012). Concerning the use of semiochemicals in *B. oleae* IPM approaches, to date the control programs rely only to the major component of the female sex pheromone, while in both sexes the *B. oleae* sexual chemoecology is driven by a higher number of compounds, largely unknown (CANALE *et al.* 2013b).

B. OLEAE SEXUAL CHEMOECOLOGY: WHAT WE REALLY KNOW?

Regarding the use of semiochemicals in Integrated Pest Management programs against *B. oleae*, the major known component of the female sex pheromone, 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane (DSU), has been extensively used for monitoring and mass-trapping (HANIOTAKIS *et al.*, 1977). Also lure and kill strategies have been proposed in different olive-grove countries by formulating food baits plus DSU, with patchy results (DAANE & JOHNSON, 2010). However, these semiochemicals-

based control approaches rely only to the major component of the female sex pheromone (DSU) (GIL-ORTIZ, 2012), while the *B. oleae* sexual chemoecology is driven by a higher number of compounds, largely unknown (CANALE *et al.*, 2013b, 2015). Indeed, in the olive fruit fly the perception of sex-specific olfactory cues from both sexes is important during courtship and mating (BENELLI, 2014, 2015a, b; BENELLI *et al.*, 2012, 2015).

ADVANCES ON MALE CHEMOECOLOGY

The role of sex attractants produced by males has been recently investigated. Young *B. oleae* males produce DSU in the rectal glands (LEVI-ZADA *et al.*, 2012). The presence of DSU in young males cannot be considered a case of chemical mimicry (*sensu* RUTHER & STEINER 2008), since the mating performance of young males is not superior to that of adults (BENELLI *et al.*, 2013b).

When olive fruit fly males become sexually mature, they significantly increase the production of (Z)-9-tricosene, a compound unique to males, which is able to selectively attract females during the close-range phase only (CARPITA *et al.*, 2012; CANALE *et al.*, 2013a).

ADVANCES ON FEMALE CHEMOECOLOGY

On the other hand, knowledge about sex-specific chemicals produced by *B. oleae* females has a long research history. Virgin females produce a multi-component sex pheromone containing four major constituents with a synergistic action: DSU and methyl dodecanoate are produced in the rectal glands, while alpha-pinene and nonanal are produced elsewhere in the body (BAKER *et al.*, 1980; MAZOMENOS & HANIOTAKIS 1981, 1985). Among these compounds, DSU is described as the most abundant component and exhibits the highest biological activity towards males (MAZOMENOS & HANIOTAKIS 1981, 1985). Recently, GEROFOTIS *et al.*, (2013) highlighted that the exposure of sexually mature male and female olive flies to the aroma of alpha-pinene increases subsequent mating success compared to non-exposed individuals.

Olive fruit fly female sexual chemoecology is far from a full understanding. In addition to the four well-known pheromone components, several researches claimed that other compounds are produced in the female rectal glands (ROSSI *et al.*, 1978; GARIBOLDI *et al.*, 1982, 1983). Among them, there are a number of C6-C18 fatty acid esters

identified by GARIBOLDI *et al.*, (1983), but no data were available on sex-specificity and bioactivity of such molecules. Later on, CARPITA *et al.*, (2011) provided preliminary results about the presence of at least eight sex-specific compounds (C10-18 fatty acid esters) produced by *B. oleae* females in their rectal glands.

Recently, GC and GC/EI-MS, identified nine sex-specific chemicals and an additional compound [ethyl(Z)-9-octadecenoate], less abundant in females over males. Age-related production of all compounds raised over time. In 21-day-old females, it reached amounts from a minimum of 8.08 ng/fly (n-butyl dodecanoate) to a maximum of 87.19 ng/fly (ethyl hexadecanoate). In EAG experiments, all chemicals were perceived by both sexes. Methyl hexadecanoate and ethyl decanoate attracted males and females, respectively (CANALE *et al.*, 2015).

CONCLUSIONS

Overall, *B. oleae* has a peculiar sexual chemical ecology, guided by both male- and female-borne olfactory cues, mostly produced by rectal glands. Recently it has been outlined that young *B. oleae* males also produce DSU in the rectal glands. Then, when males become sexually mature, they increase the production of (Z)-9-tricosene, which attracts females. Furthermore, *B. oleae* females produce a multi-component sex pheromone containing DSU, methyl dodecanoate, alpha-pinene, nonanal, and several C6-C18 fatty acid esters. Two of the latter group (i.e. methyl hexadecanoate and ethyl decanoate) attracted males and females, respectively.

To the best of our knowledge, this is the first female-borne compound attracting conspecific females in tephritid flies. Further research is ongoing to test blends of DSU, methyl hexadecanoate and ethyl decanoate as lures to enhance sex pheromone blends used in IPM programmes against *B. oleae*, in order to improve current control tools in the fight against this key pest.

RIASSUNTO

RECENTI ACQUISIZIONI SULLA COMUNICAZIONE CHIMICA INTRASPECIFICA IN *BACTROCERA OLEAE* (ROSSI) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Nella mosca delle olive, *Bactrocera oleae*, le ghiandole associate alla ampolla rettale di entrambi i sessi sono coinvolte nella produzione di sostanze ad azione semiochimica. Nonostante la ricerca sui feromoni sessuali in questa specie abbia una lunga storia, solo pochi loro componenti (princi-

palmente 1,7-dioxaspiro[5.5]undecano prodotto dalle femmine) sono stati indagati in maniera approfondita. Recentemente, è stato dimostrato che anche il maschio giovane produce 1,7-dioxaspiro[5.5]undecano nelle ghiandole associate alla ampolla rettale e che quando esso raggiunge la maturità sessuale sintetizza, nelle stesse ghiandole, (Z)-9-tricosene, un componente in grado di attrarre le femmine. Relativamente a queste ultime, indagini analitiche hanno inoltre evidenziato che esse producono un feromone sessuale multi-componente contenente, oltre al noto 1,7-dioxaspiro[5.5]undecano, anche metil dodecanoato, alpha-pinene, nonanale e differenti esteri di acidi grassi C6–C18. Due di questi componenti, metil esadecanoato ed etil decanoato, sono in grado di attirare i maschi e le femmine, rispettivamente. Questa rappresenta la prima evidenza nei tefritidi di un composto prodotto dalle femmine in grado di attirare femmine conspecifiche.

REFERENCES

- BAKER R., HERBERT, R.H., HOWSE P.E., JONES O.T., FRANCKE W., REITH W., 1980 – *Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly, Dacus oleae*. - J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1: 52–54.
- BENELLI G., 2014 – *Aggressive behavior and territoriality in the olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae): role of residence and time of day*. - J. Insect Behav., 27: 145-161.
- BENELLI G., 2015a – *Aggression in Tephritidae flies: where, when, why? Future directions for research in Integrated Pest Management*. - Insects, 6: 38-53.
- BENELLI G., 2015b – *Should I fight or should I flight? How studying insect aggression can help Integrated Pest Management*. - Pest. Manag. Sci., doi: 10.1002/ps.3974
- BENELLI G., CANALE A., BONSIGNORI G., RAGNI G., STEFANINI C., RASPI A., 2012 – *Male wing vibration in the mating behavior of the olive fruit fly Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae)*. - J. Insect Behav., 25: 590-603.
- BENELLI G., CANALE A., FLAMINI G., CIONI P.L., DEMI F., CECCARINI L., MACCHIA M., CONTI B., 2013a – *Biototoxicity of Melaleuca alternifolia (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid Psytalia concolor (Hymenoptera: Braconidae)*. - Ind. Crops Prod., 50: 596-603.
- BENELLI G., BONSIGNORI G., STEFANINI C., RASPI A., CANALE A., 2013a – *The production of female sex pheromone in Bactrocera oleae (Rossi) young males does not influence their mating chances*. Entomol. Sci., 16: 47-53.
- BENELLI G., DAANE K.M., CANALE A., NIU C.Y., MESSING R.H., VARGAS R.I., 2014a - *Sexual communication and related behaviours in Tephritidae: current knowledge and potential applications for Integrated Pest Management*. - J. Pest Sci., 87: 385-405.
- BENELLI G., GIUNTI G., CANALE A., MESSING R.H., 2014b – *Lek dynamics and cues evoking mating behavior in tephritid flies infesting soft fruits: implications for behavior-based control tools*. - Appl. Entomol. Zool., 49: 363-373.
- BENELLI G., DESNEUX N., ROMANO D., CONTE G., MESSING R.H., CANALE A., 2015 – *Contest experience enhances aggressive behaviour in a fly: when losers learn to win*. - Sci. Rep., 5: 9347, <http://dx.doi.org/10.1038/srep09347>.
- CANALE A., BENELLI G., 2012 – *Impact of mass-rearing on the host-seeking behaviour and parasitism by the fruit fly parasitoid Psytalia concolor (Szepligetii) (Hymenoptera: Braconidae)*. - J. Pest Sci., 85: 65-74.
- CANALE A., BENELLI G., CONTI B., LENZI G., FLAMINI G., FRANCINI A., CIONI P.L., 2013a – *Ingestion toxicity of three Lamiaceae essential oils incorporated in protein baits against the olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera Tephritidae)*. - Nat. Prod. Res., 27: 2091-2099.
- CANALE A., GERMINARA S.G., CARPITA A., BENELLI G., BONSIGNORI G., STEFANINI C., RASPI A., ROTUNDO G., 2013b – *Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae), to male- and female-borne sex attractants*. Chemoecology, 23: 155-164.
- CANALE A., BENELLI G., GERMINARA G.S., FUSINI G., ROMANO D., RAPALINI F., DESNEUX N., ROTUNDO G., RASPI A., CARPITA A., 2015 – *Behavioural and electrophysiological responses to overlooked female pheromone components in the olive fruit fly, Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae)*. - Chemoecology, 25: 147-157.
- CARPITA A., CANALE A., BENELLI G., CONTI B., RASPI A., 2011 – *Componenti secondari presenti nelle ghiandole associate all'ampolla rettale delle femmine di Bactrocera oleae (Rossi)*. XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Genova, Italy, 13-16 Giugno 2011, Atti. p. 169.
- CARPITA A., CANALE A., RAFFAELLI A., SABA A., BENELLI G., RASPI A., 2012 – *(Z)-9-tricosene identified in rectal gland extracts of Bactrocera oleae males: first evidence of a male-produced female attractant in olive fruit fly*. - Naturwissenschaften, 99: 77-81.
- DAANE K.M., JOHNSON M.W., 2010 – *Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times*. - Annu. Rev. Entomol., 55: 151-169.
- GARIBOLDI P., JOMMI G., ROSSI R., VITA G., 1982 – *Studies on the chemical constitution and sex pheromone activity of volatile substances emitted by Dacus oleae*. - Experientia, 38: 441-444.
- GARIBOLDI P., VEROTTA L., FANELLI R., 1983 – *Studies on the sex pheromone of Dacus oleae. Analysis of the substances contained in the rectal glands*. - Experientia, 39: 502-505.
- GEROFOTIS C.D., IOANNOU C.S., PAPADOPOULOS N.T., 2013 – *Aromatized to find mates: a-pinene aroma boosts the mating success of adult olive fruit flies*. - PLoS One, 8: e81336.
- GIL-ORTIZ R., 2012 – *Development of new ecological long-lasting dispensers of semiochemicals for the control of Bactrocera oleae (Rossi)*. - Pest Manag. Sci., doi: 10.1002/ps.3415.
- HANIOTAKIS G.E., MAZOMENOS B.E., TUMLINSON I.H., 1977 – *A sex attractant of the olive fruit fly, Dacus oleae, and its biological activity under laboratory and field conditions*. - Entomol. Exp. Appl. 21: 81-87.
- LEVI-ZADA A., NESTEL D., FEFER D., NEMNI-LAVY E., DELOYA-KAHANE I., DAVID M., 2012 – *Analyzing diurnal and age-related pheromone emission of the olive fruit fly, Bactrocera oleae by sequential SPME-GCMS analysis*. - J. Chem. Ecol., 38: 1036-1041.
- MAZOMENOS B.E., HANIOTAKIS G.E., 1981 – *A multicomponent female sex pheromone of Dacus oleae Gmelin: isolation and bioassay*. - J. Chem. Ecol., 7: 1561-1573.
- MAZOMENOS B.E., HANIOTAKIS G.E., 1985 – *Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests*. - J. Chem. Ecol., 11: 397-405.

- ROSSI R., CARPITA A., VITA G., 1978 – *(Z)-6-Nonen-1-ol and related compounds as attractants of the olive fruit fly, Dacus oleae (Gmelin) (Diptera: Tephritidae)*. - Gazz. Chim. Ital., 108: 709-712.
- RUTHER J., STEINER S., 2008 – *Costs of female odour in males of the parasitic wasp Lariophagus distinguendus (Hymenoptera: Pteromalidae)*. - Naturwissenschaften, 95: 547-552.
- STARK J.D., VARGAS R., MILLER N., 2004 – *Toxicity of spinosad in protein bait to three economically important tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae) and their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae)*. - J. Econ. Entomol. 97: 911-915.
- THOMAS D.B., MANGAN R.L., 2005 – *Nontarget impact of spinosad GF- 120 bait sprays for control of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Texas citrus*. - J. Econ. Entomol., 98: 1950-1956.
- WANG X.G., JOHNSON M.W., YOKOYAMA V.Y., PICKETT C.H., DAANE K.M., 2011 – *Comparative evaluation of two olive fruit fly parasitoids under varying abiotic conditions*. - Biocontrol, 56: 283-293.
- YOKOYAMA V.Y., RENDON P.A., SIVINSKI J., 2008 – *Psytalia cf. concolor (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) in California*. - Environ. Entomol. 37: 764-773.

SEMIOCHIMICI COINVOLTI NELLE INTERAZIONI *BACTROCERA OLEAE* - OLIVO

GIACINTO S. GERMINARA (*) - ANTONIO DE CRISTOFARO (**) - GIUSEPPE ROTUNDO (**)

(*) Dipartimento di Scienze Agrarie degli Alimenti e dell'Ambiente - Università degli Studi di Foggia - Via Napoli 25, 71122 Foggia; giacinto.germinara@unifg.it

(**) Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti - Università degli Studi del Molise - Via De Sanctis, 86100 Campobasso
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

Semiochemicals involved in Bactrocera oleae-olive tree interactions

The Olive Fruit Fly (OFF), *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae), is the most damaging pest of olives worldwide. The frequent use of synthetic insecticides to control this pest poses serious human health and environmental concerns. Semiochemicals that influence OFF behaviour such as feeding, mating and oviposition could provide better management options. Volatiles emitted by olive fruits and leaves and their epiphytic microflora have been shown to play a role in the OFF host plant location and oviposition behaviour. Chemical, electrophysiological, and behavioural investigations aiming to clarify the biological activity of different extracts, their fractions and individual components has been carried out in the last decades. Attraction of gravid females has been recorded in response to some plant-derived aliphatic (nonen-1-ol, hexan-1-ol, octanal, nonanal), aromatic (toluene, ethylbenzene) and terpenoid [(+)- α -pinene, (-)- β -pinene, D-(+)-limonene, L-(-)-limonene] compounds as well as to volatiles produced by microbial flora (ammonia, styrene) present on the olive and leaf surface. On the contrary, significant repellent/deterrent effects have been shown for some aliphatic aldehydes [hexanal, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-heptenal, high doses of octanal] and some nonvolatile compounds. Some substances, such as (+)- α -copaene and styrene were found to act as oviposition stimulants whereas some components of olive surface waxes (oleanolic acid, maslinic acid) showed inhibiting effects. Proper formulations of these insect-behaviour modifying compounds are needed to develop semiochemical-based control strategies for this pest.

KEY WORDS: Olive fruit fly, plant volatiles, kairomones, allomones, Integrated Pest Management.

INTRODUZIONE

La mosca delle olive, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae), è una specie monofaga che oltre ai frutti di *Olea europaea* ssp. *europaea*, comprendente le varietà coltivate e l'oleastro, attacca anche quelli di *O. europaea* ssp. *cuspidata* (Wall ex G. Don) Cif. [= *O. africana* Mill., *chrysophylla* Lam. o *verrucosa* (Willd.)] diffusa principalmente in Africa e Asia (DAANE e JOHNSON, 2010; HOELMER *et al.*, 2011). Vi sono evidenze, inoltre, che le larve dell'insetto possono svilupparsi anche nei frutti di *O. europaea* ssp. *guanchica* P. Vargas *et al.* e di *O. europaea* ssp. *maroccana* (Greuter e Burdet) (HOELMER *et al.*, 2011).

Il ruolo di fitofago chiave, svolto da *B. oleae* in molti contesti di coltivazione dell'olivo, costringe ad adottare ogni anno opportune misure di controllo basate essenzialmente sull'uso di insetticidi di sintesi. I problemi ambientali ed i rischi per la salute umana derivanti dal ripetuto impiego di tali mezzi di lotta stimolano da anni la ricerca di nuove molecole biologicamente attive per la messa a punto di strategie di lotta integrata, tra l'altro previste dal Decreto Legislativo n. 150 del 14/08/12 che ha recepito la Direttiva UE 128/2009 relativa all'uso sostenibile degli agrofarmaci.

I semiochimici (Gk. *semeon* = segnale) sono sostanze naturali a basso peso molecolare coinvolte nella comunicazione chimica tra gli organismi viventi. Semiochimici intraspecifici (feromoni) ed interspecifici (allelochimici) che agiscono come modificatori del comportamento degli insetti, possono essere utilizzati come mezzi ecosostenibili di lotta indiretta (catture spia) e diretta (cattura massale, lotta attratticida, confusione sessuale) (TREMBLAY e ROTUNDO, 1980; ROTUNDO e GERMINARA, 2015).

Diverse ricerche indicano che gli adulti di *B. oleae* utilizzano composti volatili emessi da foglie e frutti di *O. europaea* e dalla microflora batterica epifitica ad essi associata per la localizzazione della pianta ospite. Stimoli chimici attivi nell'immediata prossimità del frutto, percepiti mediante sensilli chemiorecettori di contatto o anche olfattivi, sono coinvolti nell'attrazione degli adulti e nell'induzione, o quantomeno nella regolazione, dell'oogenesi e dell'ovideposizione come dimostrato dal fatto che le femmine prima del ritorno negli oliveti non hanno uova già differenziate e che queste si sviluppano poco prima dell'ovideposizione anche in assenza di punture sterili sul frutto (GIROLAMI *et al.*, 1989).

È noto che le femmine di *B. oleae* depongono un solo uovo per drupa, almeno fino a quando sono dis-

ponibili olive sane. Tale capacità di distinguere un frutto sano da uno attaccato dipende molto probabilmente dalla percezione di segnali chimici. La femmina, dopo aver ovideposto, distribuisce sulla superficie dell'oliva il succo che fuoriesce dalla ferita provocata dall'ovipositore; tale succo, in parte anche assunto e poi rigurgitato attraverso il "bacio" della ferita, svolgerebbe azione deterrente per successive ovideposizioni (CIRIO, 1971).

È evidente che lo studio dei semiochimici coinvolti nelle interazioni *B. oleae*-olivo costituisce un promettente campo d'indagine per l'identificazione di nuove molecole bioattive potenzialmente utili per migliorare le attuali strategie di controllo del fitofago. Le ricerche finora condotte hanno riguardato la valutazione dell'attività biologica di diversi tipi di estratti ottenuti da frutti e foglie, l'identificazione dei composti presenti e lo studio dell'attività biologica di singoli componenti mediante indagini chimiche, elettrofisiologiche e comportamentali.

ATTIVITÀ BIOLOGICA DI ESTRATTI E FRAZIONI

Nei ditteri tefritidi, l'approccio comunemente utilizzato per la ricerca di attrattivi è stato di saggiare, in laboratorio e campo, un'ampia varietà di estratti vegetali e loro frazioni e di singoli composti, in considerazione dell'elevata polifagia di molte di queste specie (BEROZA e GREEN, 1963; KEISER *et al.*, 1975). Tuttavia, nel caso di *B. oleae*, la monofagia della specie ha indotto a valutare, principalmente verso le femmine, l'attività biologica (attrazione, repellenza, effetti sull'ovideposizione) di diverse tipologie di estratti ottenuti da frutti e foglie della pianta ospite.

SCARPATI *et al.* (1996) hanno evidenziato che estratti acquosi ottenuti per macerazione delle drupe o per lavaggio delle foglie sono attrattivi per le femmine ovideponenti di *B. oleae* e che tale attività è inibita dall'aggiunta di un antibiotico (streptomycina) durante la preparazione degli estratti. Tale osservazione ha dimostrato che le sostanze emesse dalla microflora batterica presente sulla superficie di frutti e foglie svolgono un ruolo fondamentale nel processo di localizzazione dell'ospite. GIROLAMI *et al.* (1981) riportano che estratti esanici dell'epicarpo favoriscono la maturazione delle gonadi e l'ovideposizione.

In biosaggi di doppia scelta, il numero di punture e uova deposte dalle femmine in drupe artificiali trattate con la frazione esanica di un estratto ottenuto, mediante idrodistillazione, da drupe della varietà Gentile di Larino è risultato significativamente maggiore di quello riscontrato in drupe artificiali trattate con il solo solvente, indicando la presenza di composti ad azione attrattiva verso le femmine e stimolante l'ovideposizione (ROTUNDO *et al.*, 2001).

Il succo naturale di olive è risultato fortemente deterrente nei confronti delle femmine ovideponenti, come anche le acque di vegetazione e i loro estratti fenolici ad alta concentrazione (CAPASSO *et al.*, 1994). Gli estratti di olive acerbe, inoltre, hanno mostrato una più elevata azione deterrente sull'ovideposizione rispetto a quelli ottenuti da olive mature (GIROLAMI *et al.*, 1981).

CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEGLI ESTRATTI

Il profilo dei composti volatili presenti in estratti ottenuti da drupe in diverse fasi fenologiche ha mostrato differenze quali-quantitative sia tra le cultivar che tra le fasi fenologiche del frutto della stessa cultivar. Gli estratti, ottenuti per idrodistillazione, da drupe di tre cultivar italiane (Leccino, Gentile di Larino e Ascolana) contengono principalmente idrocarburi alifatici, aldeidi alifatici e pochi altri composti a struttura complessa, se provenienti da drupe verdi in fase di ingrossamento, e idrocarburi alifatici, alcoli alifatici, aldeidi alifatiche e un numero e quantità maggiori di composti a struttura complessa se preparati da drupe in fase di invaiatura (ROTUNDO *et al.*, 2001). In quasi tutti gli estratti, le sostanze maggiormente presenti sono state 2-esenale e 2-decenale seguite da esenale, 2-eptenale, nonanale, α -farnesene (ROTUNDO *et al.*, 2001). I suddetti composti, insieme ad alcuni terpeni (limonene, pinene, mentolo) sono stati identificati negli estratti ottenuti mediante microestrazione in fase solida (SPME) da drupe di tre cultivar portoghesi (Cobrançosa, Madural, Verdeal Transmontana) in diverse momenti del processo di maturazione (MALHEIRO *et al.*, 2015a). Anche quest'ultimo lavoro ha evidenziato una riduzione dei composti volatili a basso peso molecolare ed un aumento di quelli a più alto peso molecolare, tra cui toluene e α -copaene, durante la maturazione dei frutti. Oltre a composti volatili della pianta, nello spazio di testa di estratti acquosi ottenuti per macerazione delle drupe o per lavaggio delle foglie di olivo sono stati identificati ammoniac e stirene, originati dal metabolismo della microflora batterica epifitica (SCARPATI *et al.*, 1996).

ATTIVITÀ ELETTROFISIOLOGICA DI ESTRATTI E COMPOSTI

Gli estratti ottenuti dalle drupe delle cultivar Leccino, Gentile di Larino e Ascolana hanno indotto risposte elettroantennografiche (EAG) elevate nelle femmine accoppiate di *B. oleae* ma senza differenze significative tra le tre cultivar. Per ciascuna cultivar, inoltre, le risposte EAG sono risultate in media maggiori per gli estratti da drupe verdi in fase di ingrossamento

del frutto rispetto a quelle registrate per gli estratti da drupe in fase di invaiatura, probabilmente per la maggiore presenza di composti volatili a basso peso molecolare (ROTUNDO *et al.*, 2001). L'analisi degli estratti mediante gascromatografia abbinata ad elettroantennografia (GC-EAD) ha evidenziato un'elevata attività elettrofisiologica per alcune aldeidi alifatiche (2-esanale, 2-eptanale, nonanale, 2-decenale) (ROTUNDO *et al.*, 2001). Più recentemente, è stata studiata la sensibilità olfattiva di maschi e femmine di diversa età ad estratti di tre cultivar portoghesi e ad alcuni dei componenti principali, confermando l'elevata attività elettrofisiologica delle aldeidi (*E*)-2-esanale e nonanale (MALHEIRO *et al.*, 2015b). In uno studio EAG, che ha valutato la risposta delle antenne di maschi e femmine di *B. oleae*, di diversa età e stato fisiologico (vergine, accoppiato), verso composti volatili identificati da foglie e frutti di olivo è emerso che a differenza degli individui vergini, la sensibilità olfattiva delle femmine accop-

piate rimane pressoché invariata fino al terzo mese di età, probabilmente per la necessità di localizzare il sito di ovideposizione (DE CRISTOFARO *et al.*, 2007). Registrazioni elettrofisiologiche da sensilli tarsali di femmine di *B. oleae* hanno evidenziato la presenza di cellule nervose stimulate dall'oleuropeina, glucoside responsabile del sapore amaro delle olive, e dalla pirocatechina, uno dei suoi prodotti di degradazione (SOLINAS *et al.*, 2001).

ATTIVITÀ BIOLOGICA DI SINGOLI COMPOSTI

In studi che hanno valutato l'attività biologica di composti volatili emessi da diverse piante, entrambi i sessi di *B. oleae* sono stati attratti da sei isomeri geometrici del nonen-1-olo, in saggi olfattometrici (ROSSI, 1978), e da esan-1-olo, ottanale, nonanale e nonen-1-olo in campo (GUERIN *et al.*, 1983) (Tabella 1). Tra i composti volatili identificati dallo spazio di testa di

Tabella 1 – Attività biologica di composti identificati in estratti da foglie e drupe di olivo verso adulti di *B. oleae*.

Composto	Attività biologica				
	Attrattivo	Repellente	Deterrente	Antiovideponente	Ovideponente
Nonen-1-olo	+				
Esan-1-olo	+				
Ottanale	+	+	+		
Nonanale	+				
Etilbenzene	+				
Toluene	+				
(+)- α -Pinene	+				+
(-)- β -Pinene	+				
D-(+)-Limonene	+				
L-(-)-Limonene	+				
Ammoniaca	+				
Stirene	+				+
<i>p</i> -Xilene					+
Mircenone					+
Etilbenzene					+
<i>n</i> -Ottano					+
<i>o</i> -Xilene					+
(+)- α -Copaene					+
Esanale		+	+		
(<i>E</i>)-2-Esanale		+	+		
(<i>E</i>)-2-Eptanale		+	+		
Pirocatecolo		+	+		
Oleuropeina		+	+		+
3,4-Diidrossifenietanolo		+	+		
Acido oleanolico				+	
Acido maslinico				+	

foglie e frutti di olivo, etilbenzene e toluene sono risultati attrattivi verso le femmine di *B. oleae* in saggi di laboratorio, mentre α -pinene, pur non mostrando una significativa azione attrattiva, ha stimolato l'ovideposizione (SCARPATI *et al.*, 1993; SCARPATI *et al.*, 1996). Quest'ultimo composto è stato identificato anche tra i componenti secondari del feromone sessuale della femmina ma la sua aggiunta al componente principale non ne ha migliorato significativamente il potere attrattivo (MAZOMENOS e HANIOTAKIS, 1981; 1985). Recentemente è stato osservato che α -pinene migliora la "mating readiness" ovvero accelera la predisposizione all'accoppiamento di entrambi i sessi (GEROFOTIS *et al.*, 2013).

In tunnel del vento, (+)- α -pinene, (-)- β -pinene, D-(+)-limonene e L-(-)-limonene hanno attratto individui di entrambi i sessi di *B. oleae*; in campo, pannelli collati innescati con erogatori di gomma contenenti 0,1 - 10 mg di D-(+)-limonene hanno catturato un elevato numero di maschi e femmine nel rapporto 1:1 (DE CRISTOFARO *et al.*, 2007).

Deboli stimolanti l'ovideposizione sono risultati *p*-xilene, mircenone, etilbenzene, *n*-ottano e *o*-xilene (SCARPATI *et al.*, 1993; SCARPATI *et al.*, 1996). Tra i composti di origine batterica associati a foglie e frutti, ammoniacca e stirene hanno mostrato una marcata attrattività verso le femmine ovideponenti di *B. oleae*. Lo stirene, inoltre, ha evidenziato anche azione stimolatrice dell'ovideposizione (SCARPATI *et al.*, 1996). Un'analoga attività è stata dimostrata in saggi di laboratorio per l'enantiomero (+)- α -copaene in presenza del quale il numero di olive attaccate dalla mosca è quasi raddoppiato (ALFONSO *et al.*, 2014). Una correlazione positiva è stata riscontrata tra l'incremento di toluene e α -copaene durante la maturazione delle drupe di cultivar suscettibili (Madural, Verdeal Transmontana) e l'entità degli attacchi di mosca in campo (MALHEIRO *et al.*, 2015a), a conferma dell'azione stimolante sull'ovideposizione. Effetti repellenti e deterrenti verso le femmine fecondate sono riportati per le aldeidi volatili (*E*)-2-esenale, esanale, (*E*)-2-eptenale e dosi elevate di ottanale, identificate in vari estratti di drupe, e per alcuni composti non volatili tra cui pirocatecolo, oleuropeina, 3,4-diidrossifenietanolo (SCARPATI *et al.*, 1993; LO SCALZO *et al.*, 1994). L'attività biologica di tali composti potrebbe spiegare gli effetti repellenti e deterrenti riportati da CAPASSO *et al.* (1994) per il succo naturale di olive, le acque di vegetazione e i loro estratti fenolici ad alta concentrazione. Tuttavia, occorre evidenziare che in altri saggi di laboratorio, l'oleuropeina ha mostrato attività stimolante l'ovideposizione (GIROLAMI e STRAPAZZON, 1982; SOLINAS *et al.*, 2001). Appare probabile, pertanto, che l'attività biologica di tale composto possa variare in funzione della dose utilizzata. Azione inibitrice l'ovideposizione è

esercitata anche dagli acidi triterpenici pentaciclici, acido oleanolico e maslinico in particolare, presenti in alta percentuale nella cera superficiale che riveste le drupe (KOMBARGI *et al.*, 1998) (Tabella 1).

CONCLUSIONI

Segnali chimici emessi dalla pianta ospite sono coinvolti nelle complesse interazioni tra *B. oleae* e olivo. Numerose sostanze, volatili e non, prodotte da foglie e frutti, in diverse condizioni fisiologiche, sono state identificate e per alcune di esse è stata chiarita l'attività biologica, soprattutto verso le femmine e in biosaggi di laboratorio. Molto limitate sono ancora le conoscenze sulla possibilità di applicazione pratica delle molecole bioattive. Ulteriori studi sono necessari per la messa a punto di opportune formulazioni delle sostanze attrattive e repellenti in grado di assicurare il mantenimento dell'attività biologica nelle condizioni di campo e per periodi di tempo adeguati.

RIASSUNTO

La mosca delle olive, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae), è il principale fitofago dell'olivo coltivato in diverse aree del mondo. L'uso frequente di insetticidi di sintesi per il controllo del fitofago determina gravi rischi per la salute umana e l'ambiente. Semiochimici che regolano vari aspetti del comportamento dell'insetto, come l'alimentazione, l'accoppiamento e l'ovideposizione, possono essere utilizzati per migliorare la sostenibilità delle strategie di controllo. Composti volatili emessi da frutti e foglie di olivo e dalla microflora presente sulla loro superficie sono coinvolti nel processo di localizzazione della pianta ospite e del sito di ovideposizione da parte degli adulti della mosca. Negli ultimi decenni, indagini chimiche, elettrofisiologiche e comportamentali hanno chiarito l'attività biologica di vari estratti, loro frazione e singoli componenti. Azione attrattiva verso le femmine fecondate è stata osservata per alcuni composti alifatici (nonen-1-olo, esan-1-olo, ottanale, nonanale), aromatici (toluene, etilbenzene) e terpenici [(+)- α -pinene, (-)- β -pinene, D-(+)-limonene, L-(-)-limonene] di origine vegetale e per sostanze volatili prodotte dalla microflora epifitica (ammoniaca, stirene). Una significativa azione repellente/deterrente è stata dimostrata per alcune aldeidi alifatiche [esanale, (*E*)-2-esenale, (*E*)-2-eptenale, alte dosi di ottanale] e alcuni composti non volatili. Altre sostanze, [(+)- α -copaene, stirene] sono risultate stimolanti l'ovideposizione mentre composti, presenti nella cera che rivestono la superficie delle drupe (acido oleanolico e maslinico), hanno mostrato effetti antiovideponenti. Opportune formulazioni delle sostanze bioattive identificate sono necessarie per una loro applicazione in strategie di controllo integrato della mosca delle olive.

BIBLIOGRAFIA

ALFONSO I., VACAS S., PRIMO J., 2014 – *Role of α -copaene in the susceptibility of olive fruits to Bactrocera oleae (Rossi)*. - J. Agric. Food Chem., 62: 11976-11979.

- BEROZA M., GREEN N., 1963 – *Materials tested as insect attractants*. - U.S. Dep. Agric. Handb. 239.
- CAPASSO R., EVIDENTE A., TREMBLAY E., SALA A., SANTORO C., CRISTINZIO G., SCOGNAMIGLIO F., 1994 – *Direct and mediated effects on Bactrocera oleae (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) of natural polyphenols and some of related synthetic compounds: structure-activity relationships*. - J. Chem. Ecol., 20: 1189-1199.
- CIRIO U., 1971 – *Reperti sul meccanismo stimolo-risposta nell'ovideposizione del Dacus oleae Gmelin (Diptera, Trypetidae)*. - Redia, 52: 577-600.
- DAANE K.M., JOHNSON M.W., 2010 – *Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times*. - Annu. Rev. Entomol., 55: 151-169.
- DE CRISTOFARO A., ROTUNDO G., BELCARI A., GERMINARA G.S., 2007 – *Effect of age and mating status on the antennal sensitivity of Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera Tephritidae) male and female*. - IOBC/WPRS Bull., 30: 23.
- GEROFOTIS C.D., IOANNOU C.S., PAPAPOPOULOS N.T., 2013 – *Aromatized to find mates: α -pinene aroma boosts the mating success of adult olive fruit flies*. - PLoS ONE 8 (11): e81336. doi:10.1371/journal.pone.0081336.
- GIROLAMI V., STRAPAZZON A., 1982 – *Attrattività della pianta ospite, stimolazione e regolazione della fecondità in Dacus oleae (Gmelin)*. - Frustula Ent. (n.s.) IV: 247-255.
- GIROLAMI V., VIANELLO A., STRAPAZZON A., RAGAZZI E., VERONESE G., 1981 – *Ovipositional deterrents in Dacus oleae*. - Ent. Exp. Appl., 29: 177-188.
- GIROLAMI V., RENSI F., PAVAN F., STRAPAZZON A., BRIAN E., 1989 – *Host plant stimulation of oogenesis in Dacus oleae Gmel.* In: R. Cavalloro (ed.), Proc. CEC/IOBC Int. Symp. "Fruit flies of economic importance 87", Rome, Italy; 7-10 April 1987, A.A. Balkema, Rotterdam, 159-167.
- GUERIN P.M., REMUND U., BOLLER E.F., KATSOYANNOS B., DELRIO G., 1983 – *Fruit fly electroantennogram and behavior responses to some generally occurring fruit volatiles*. In Proceedings of CEC and IOBC International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Cavalloro R. Ed., A.A. Balkema Publishers, Rotterdam, pp. 248-251.
- HOELMER K.A., KIRK A.A., PICKETT C.H., DAANE K.M., JOHNSON M.W., 2011 – *Prospects for improving biological control of olive fruit fly, Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae), with introduced parasitoids (Hymenoptera)*. - Biocontrol Sci. Technol., 21: 1005-1025.
- KEISER I., HARRIS E.J., MIYASHITA D.H., JACOBSON M., PERDUE R.E. JR., 1975 – *Attraction of ethyl ether extracts of 232 botanicals to oriental fruit flies, melon flies and Mediterranean fruit flies*. - Lloydia, 38: 141-152.
- KOMBARGI W.S., MICHELAKIS S.E., PETRAKIS C.A., 1998 – *Effect of olive surface waxes on oviposition by Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae)*. - J. Econ. Entom., 91: 993-998.
- LO SCALZO R., SCARPATI M.L., VERZEGNASSI B., VITA G., 1994 – *Olea europaea chemicals repellent to Dacus oleae females*. - J. Chem. Ecol., 20: 1813-1824.
- MALHEIRO R., CASAL S., CUNHA S.C., BAPTISTA P., PEREIRA J.A., 2015a – *Olive volatiles from Portuguese cultivars Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana: role in oviposition preference of Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae)*. - PLoS ONE 10(5): e0125070. doi:10.1371/journal.pone.0125070.
- MALHEIRO R., ORTIZ A., CASAL S., BAPTISTA P., PEREIRA J.A., 2015b – *Electrophysiological response of Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae) adults to olive leaves essential oils from different cultivars and olive tree volatiles*. - Ind. Crops Prod., 77: 81-88.
- MAZOMENOS B.E., HANIOTAKIS G.E., 1981 – *A multi component female sex pheromone of Dacus oleae Gmel. Isolation and bioassay*. - J. Chem. Ecol., 7: 437-443.
- MAZOMENOS B.E., HANIOTAKIS G.E., 1985 – *Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests*. - J. Chem. Ecol., 11: 397-405.
- ROSSI R., CARPITA A., VITA G., 1978 – *(Z)-6-nonen-1-ol and related compounds as attractants of the olive fruit fly, Dacus oleae (Gmelin)*. - Gaz. Chim. Ital., 108: 709.
- ROTUNDO G., GERMINARA G.S., 2015 – *I semiochimici in agricoltura*. - Atti della Accademia dei Georgofili, Serie VIII - Vol. 12: 25-41.
- ROTUNDO G., GERMINARA G.S., DE CRISTOFARO A., RAMA F., 2001 – *Identificazione di composti volatili in estratti da diverse cultivar di Olea europaea L. biologicamente attivi su Bactrocera oleae (Gmelin) (Diptera: Tephritidae)*. - Boll. Lab. Ent. Agr. "Filippo Silvestri", 57: 25-34.
- SCARPATI M.L., LO SCALZO R., VITA G., 1993 – *Olea europaea volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (Dacus oleae, Gmelin)*. - J. Chem. Ecol., 19: 881-891.
- SCARPATI M.L., LO SCALZO R., VITA G., GAMBACORTA A., 1996 – *Chemiotropic behavior of female olive fly (Bactrocera oleae Gmel.) on Olea europaea L.* - J. Chem. Ecol., 22: 1027-1036.
- SOLINAS M., REBORA M., DE CRISTOFARO A., ROTUNDO G., GIROLAMI V., MORI N., DI BERNARDO A., 2001 – *Functional morphology of Bactrocera oleae Gmel. (Diptera: Tephritidae) tarsal chimosensilla involved in interactions with the host-plant*. - Entomologica, 35: 105-123.
- TREMBLAY E., ROTUNDO G., 1980 – *I feromoni*. Estratto da: Prospettive di controllo biologico degli insetti in agricoltura. Consiglio Nazionale delle Ricerche AQ/1: 51-56.

NEURONI SENSORIALI DI *BACTROCERA OLEAE* (ROSSI) COINVOLTI NELLA PERCEZIONE DI SEMIOCHIMICI

ANTONIO DE CRISTOFARO (*) - GIACINTO S. GERMINARA (**) - GIUSEPPE ROTUNDO (*)

(*) *Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti - Università degli Studi del Molise - Via De Sanctis snc, 86100 Campobasso; decrist@unimol.it*

(**) *Dipartimento di Scienze Agrarie degli Alimenti e dell'Ambiente - Università degli Studi di Foggia - Via Napoli 25, 71122 Foggia*
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

Sensory neurons of Bactrocera oleae involved in the perception of semiochemicals

The olfactory sensitivity of the Olive fruit fly (OFF), *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae), the key pest of olive fruits, was investigated. The electroantennographic (EAG) response to substances identified in olive leaves and fruits was studied in virgin and mated adults of different sex and age. In both sexes the EAG response patterns were similar, while EAG amplitudes were different since they were higher in females, particularly on stimulation with aldehydes. Older were the virgin females or males lower was the response, while in mated adults the response was constant. Cluster analysis showed that mated females are able to discern the different odours for a longer period. The persistent olfactory sensitivity and selectivity of mated females might be related to the need of the oviposition site location. In a subsequent field study, D-(+)-limonene and α -pinene showed the higher catch potency, trapping OFF adults in a 1:1 sex ratio, acting as kairomones. Sampling by single cell recordings (SCR) the antennal olfactory neurons responses, together with cell types stimulated only by the main pheromone component or plant volatile compounds, the presence of highly generalist cells sensitive to substances of both categories came out, with possible inferences in their perception and biological activity. As a consequence, it is necessary to pay great attention when setting up mixed blends of pheromone components and other compounds to monitor or control OFF populations. Researches focused to a practical utilization of the identified kairomones, alone or mixed with other compounds like pheromone and other plant or bacterial volatile compounds, in *B. oleae* monitoring and control techniques, are still in progress.

KEY WORDS: Olive fruit fly, pheromone, kairomones, EAG, SCR, olfactory receptor neurons.

INTRODUZIONE

Il controllo della Mosca delle olive, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae), è problematico, sia ricorrendo a strategie di controllo biologico classico che integrato, come dimostrato dagli ingenti danni subiti dall'olivicoltura italiana anche negli ultimi anni; di conseguenza sono stati costantemente intrapresi studi mirati alla messa a punto di tecniche di controllo alternative (es. uso di semiochimici) e/o a supporto di quelle esistenti. Dall'analisi della letteratura si evidenzia che, mentre molte ricerche sono state condotte sull'identificazione del feromone sessuale e sull'uso del suo componente principale 1,7-dioxaspiro (5,5) undecano (es. BAKER *et al.*, 1980; MAZOMENOS e HANIOTAKIS, 1981, 1985), solo poche indagini hanno focalizzato l'attenzione sui composti emessi dalla principale pianta ospite (ROTUNDO *et al.*, 2001) della Mosca delle olive o dai batteri ad essa associati, sul loro possibile ruolo nel modificare il comportamento del fitofago ai fini di un suo controllo ecocompatibile, nonché sulle possibili interazioni tra le due categorie di sostanze.

Gli insetti percepiscono un'ampia gamma di com-

posti chimici presenti nell'ambiente usando diversi tipi di chemiorecettori. Lo stimolo chimico è trasformato in segnale elettrico (potenziale di azione), registrabile con l'ausilio di tecniche elettrofisiologiche. I potenziali di azione generati dai neuroni sensoriali possono essere registrati da una determinata struttura sensoriale (es. antenna, palpo, zampa, ovipositore) in modo cumulativo (es. elettroantennografia, EAG) o singolarmente (es. registrazione da singola cellula sensoriale, SCR).

Cellule olfattive stimulate solo da componenti feromonici (CARLSSON e HANSSON, 2002) o da un composto di origine vegetale sono state riportate da molti autori (es. ANDERSON *et al.*, 1995; 1996). Neuroni sensoriali sensibili a più di un composto feromonico, o ad antagonisti e sinergici del feromone, sono stati segnalati in parecchie specie di insetti (es. LÖFSTEDT *et al.*, 1990; RENOUE e LUCAS, 1994; HANSSON *et al.*, 1995; MONTI *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1995; COSSÈ *et al.*, 1998; BÄCKMAN *et al.*, 2000; DE CRISTOFARO *et al.*, 2004; SCHMIDT *et al.*, 2007), come sono altrettanto note cellule olfattive stimulate da più di una sostanza di origine vegetale (es. DE CRISTOFARO, 1995; DEN OTTER *et al.*, 1996; DE CRISTOFARO *et al.*, 1997;

ANFORA *et al.*, 2014). Molte cellule rispondono intensamente a un composto e solo debolmente a pochi altri a esso correlati (es. ULLAND *et al.*, 2003).

Cellule stimolate da un componente feromonico e da alte dosi di sostanze di origine vegetale sono state già evidenziate sulle antenne maschili di *Cydia fagiglandana* (Zeller) (Lepidoptera, Tortricidae) (DE CRISTOFARO, 1995; DEN OTTER *et al.*, 1996; DE CRISTOFARO *et al.*, 1997). Un neurone sensoriale stimolato da una miscela del componente principale del feromone sessuale (Z11-esadecenale) sia con linalolo che con Z3-6:OH, ma non dal solo composto di origine vegetale, è stato riportato sulle antenne dei maschi di *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera, Noctuidae) (OCHIENG *et al.*, 2002). Il significato biologico di queste evidenze elettrofisiologiche non è stato completamente capito, dal momento che sono stati chiaramente dimostrati distinti meccanismi di percezione periferica e di integrazione a livello del sistema nervoso centrale delle due categorie di sostanze volatili (es. MUSTAPARTA, 2002).

La comprensione delle possibili interazioni nella percezione di tali categorie di composti in *B. oleae*, tefritide caratterizzato da fasi di corteggiamento, accoppiamento e di ricerca del sito di ovideposizione molto complesse, potrebbe favorire un uso più razionale e consapevole dei semiochimici in nuove strategie di controllo del fitofago che mirino a modificarne il comportamento. Di seguito sono sommariamente riportati i risultati di studi elettrofisiologici condotti per approfondire le conoscenze sulla sensibilità olfattiva di entrambi i sessi di *B. oleae* in diverso stato fisiologico e di diversa età, nonché le strutture e i neuroni sensoriali coinvolti nella percezione di semiochimici intraspecifici e interspecifici.

STUDIO ELETTROANTENNOGRAFICO

È stata adottata una tecnica elettroantennografica (EAG) messa a punto in precedenti lavori (DE CRISTOFARO *et al.*, 1998, 2004; ANFORA *et al.*, 2014). L'indagine è stata condotta su adulti di *B. oleae* di diverso sesso, età (1-3; 10-15; 27-32; 57-62; 89-92 gg) e stato fisiologico (vergini e accoppiati) (DE CRISTOFARO *et al.*, 2007). Le risposte EAG sono state ottenute stimolando (25 µl di una soluzione di un composto in olio minerale; 1:10, v/v) le antenne, in un'area del terzo distale della superficie interna del funicolo, con composti identificati in foglie e frutti di olivo. I composti (purezza 95-99%) erano rappresentati da idrocarburi alifatici (*n*-undecano, *n*-dodecano, *n*-tricosano, *n*-tetracosano, *n*-pentacosano, *n*-esacosano, *n*-eptadecano), alcoli alifatici [(*E*)-3-esen-1-olo, 1-octanolo], aldeidi alifatiche [(*E*)-2-esenale, 1-eptanale, ottanale, (*E*)-2-ottenale, nonanale, (*E*)-2-dece-

nale] e aromatiche (2-idrossibenzaldeide), chetoni alifatici (2-esanone, 3-esanone), terpeni [mircene, *p*-cimene, (+)- α -pinene, (-)- β -pinene, D-(+)-limonene, L-(-)-limonene] e idrocarburi aromatici (stirene, toluene, etilbenzene). Le risposte sono state calcolate in valore assoluto e, dopo aver sottratto la risposta al solvente utilizzato (olio minerale), normalizzate rispetto alla risposta media a uno stimolo standard [D-(+)-limonene].

Il profilo di risposta EAG dei due sessi è risultato simile ma con le singole risposte caratterizzate da ampiezza diversa, significativamente più elevate ad alcune aldeidi [(*E*)-2-esenale, 1-eptanale, ottanale, (*E*)-2-ottenale] nelle femmine, sia vergini che accoppiate, rispetto ai maschi. In relazione alle classi di età saggiate, è risultato evidente che maggiore è l'età degli adulti vergini (maschi e femmine) di minor ampiezza sono le risposte EAG; negli adulti accoppiati la risposta è invece quasi costante; in particolare, nelle femmine accoppiate è anche più elevata, a partire dai 10-15 gg di età, rispetto alle femmine vergini. Per individuare i gruppi (risposte statisticamente simili a più composti) di risposta EAG ai semiochimici dell'olivo degli adulti di entrambi i sessi, vergini e accoppiati, e di diverse età, è stata utilizzata l'analisi dei gruppi (cluster analysis). Dal confronto dei gruppi di risposta EAG nelle diverse classi di età è risultato che il numero di cluster decresce all'aumentare dell'età, ma in modo meno pronunciato nelle femmine, in particolare se accoppiate (ad esempio, tra 10-15 gg e 89-94 gg, il numero di gruppi di risposta decresce da 24 a 13 nei maschi vergini, da 21 a 7 in quelli accoppiati, da 24 a 14 nelle femmine vergini e solo da 24 a 19 in quelle accoppiate). Le femmine accoppiate di *B. oleae* sono in grado di discernere i diversi odori emessi dalla pianta ospite per un periodo più lungo rispetto a maschi e femmine vergini.

REGISTRAZIONE DA SINGOLA CELLULA SENSORIALE

La tecnica di registrazione da singolo neurone olfattivo (SCR), messa a punto in precedenti lavori (DE CRISTOFARO *et al.*, 2004; ANFORA *et al.*, 2014), ha previsto l'uso di elettrodi di vetro contenente una soluzione elettrofisiologica. La punta (25 µm) dell'elettrodo di riferimento è stata inserita nella capsula cefalica alla base di un'antenna, quella (2 µm) dell'elettrodo di registrazione è stata spinta delicatamente sulla superficie esterna (terzo distale) del funicolo (surface contact technique). I composti saggiati sono stati gli stessi dello studio EAG, eccetto gli idrocarburi alifatici *n*-tricosano, *n*-tetracosano, *n*-pentacosano, *n*-esacosano; è stato impiegato anche il componente principale del feromone sessuale di *B. oleae*. Le sostanze sono state diluite in olio minerale leggero

(1:10 v/V); uno stimolo era costituito da 25 µl di soluzione assorbita su carta da filtro (2,5 cm²) inserita in una pipetta Pasteur. Un'apposita apparecchiatura ha fornito un flusso costante (50 cm³/s) d'aria filtrata che, passando attraverso la pipetta, fluiva sull'antenna. Lo stimolo è stato aggiunto per 0.1 s al flusso d'aria continuo.

Sono stati analizzati, dalle antenne di individui accoppiati, i potenziali di azione di 36 (femmine=19; maschi=17) neuroni olfattivi. In entrambi i sessi alcune cellule (femmine=7; maschi=4) non sono state stimolate da alcuna delle sostanze saggiate (Tabelle 1, 2). Un solo composto (*n*-eptadecano) non ha elicitato alcuna risposta. Sono state riscontrate sia cellule specialiste, stimolate da una o poche sostanze, che cellule generaliste, stimolate da molti composti volatili. Particolarmente interessante è da ritenersi la presenza di cellule stimolate sia dai composti volatili della pianta ospite che dal componente principale del fero-

me sessuale (Tabelle 1, 2). I tipi cellulari riscontrati in entrambi i sessi sono molto simili; nei maschi sono state trovate anche cellule sensibili al solo componente principale del feromone sessuale (Tabella 2). Le cellule olfattive più frequenti sono risultate quelle sensibili alle aldeidi, in particolare a 6-9 atomi di carbonio (Tabella 3). Sono risultate essere presenti con elevata frequenza anche le cellule sensibili a chetoni, alcoli e terpeni, in particolare D-(+)-limonene. Le cellule sensibili al feromone sono state rilevate in circa il 40% dei casi nei maschi ed il 32% nelle femmine (Tabella 3).

CONCLUSIONI

La maggiore persistenza della sensibilità e della selettività olfattiva nelle femmine accoppiate di *B. oleae* molto probabilmente è da correlare alla neces-

Tabella 1 – Risposte di singoli neuroni olfattivi antennali di femmine di *B. oleae* a sostanze volatili dell'olivo e al componente principale del feromone sessuale [1,7-dioxaspiro (5,5) undecano].

Composto	Cellula																		
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u
olio minerale	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -cimene	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-esanone	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -undecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-3-esen-1-olo	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
(-)-β-pinene	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3-esanone	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
stirene	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-2-decenale	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1-octanolo	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-2-octenale	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-(-)-limonene	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-(+)-limonene	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
etilbenzene	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -dodecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
toluene	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -eptadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
salicilaldeide	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)-α-pinene	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
octanale	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mircene	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-eptanale	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nonanale	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-2-esenale	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
feromone	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ indica incrementi statisticamente significativi (*t* test; *P*=0,05) della frequenza dei potenziali di azione dopo la stimolazione. Su ogni cellula è stata applicata la serie completa di stimoli.

Tabella 2 – Risposte di singoli neuroni olfattivi antennali di maschi di *B. oleae* a sostanze volatili dell’olivo e al componente principale del feromone sessuale [1,7-dioxaspiro (5,5) undecano].

Composto	Cellula																
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	l	m	n	o	p	q	r	s
olio minerale	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>p</i> -cimene	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
2-esanone	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>n</i> -undecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-3-esen-1-olo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
(-)-β-pinene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-esanone	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
stirene	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)-2-decenale	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1-octanolo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
(<i>E</i>)-2-octenale	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
L(-)-limonene	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D(+)-limonene	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
etilbenzene	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>n</i> -dodecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
toluene	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>n</i> -eptadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
salicilaldeide	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
(+)-α-pinene	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
octanale	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
mircene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1-eptanale	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
nonanale	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
(<i>E</i>)-2-esenale	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
feromone	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+ indica incrementi statisticamente significativi (*t* test; P=0,05) della frequenza dei potenziali di azione dopo la stimolazione. Su ogni cellula è stata applicata la serie completa di stimoli.

sità di un’efficace localizzazione del sito di ovideposizione più adatto. In uno studio di campo opportunamente allestito utilizzando trappole a pannello adesivo di colore bianco, innescate con dispensatori in gomma naturale contenenti diverse dosi dei composti sintetici EAG-attivi (0.1, 1.0, 10 mg diluiti in olio minerale), D(+)-limonene e α-pinene hanno evidenziato il più elevato potere di cattura verso maschi e femmine di *B. oleae*, soprattutto in un rapporto 1:1, agendo quindi da caironi (DE CRISTOFARO *et al.*, 2007). È stato dimostrato che α-pinene stimola l’ovideposizione (SCARPATI *et al.*, 1993, 1996), è presente tra i componenti secondari del feromone sessuale della femmina (MAZOMENOS e HANIOTAKIS, 1981; 1985) e predispone entrambi i sessi all’accoppiamento (GEROFOTIS *et al.*, 2013).

Il campionamento delle risposte dei neuroni olfattivi antennali di *B. oleae* mediante SCR ha evidenziato la presenza, insieme a cellule stimulate solo dal componente principale del feromone sessuale o da

composti volatili di origine vegetale, di neuroni altamente generalisti, sensibili a sostanze di entrambe le categorie. Tale evenienza suggerisce ulteriore cautela nella messa a punto di formulazioni miste di componenti feromonici e composti volatili di origine diversa (vegetale o batterica) per il monitoraggio o il controllo delle popolazioni di *B. oleae*.

In conclusione, la conoscenza morfologica e fisiologica dei siti di ricezione delle sostanze biologicamente attive è fondamentale per ipotizzarne un’idonea formulazione, nella prospettiva di una loro utilizzazione pratica quali modificatori del comportamento della Mosca delle olive.

RIASSUNTO

È stata studiata la sensibilità olfattiva della Mosca delle olive, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae), il fitofago chiave dell’agroecosistema oliveto. La risposta elettroantennografica (EAG) a sostanze identificate in

Tabella 3 – Risposta (%) di singoli neuroni sensoriali olfattivi di maschi (n=13) e femmine (n=12) accoppiati di *B. oleae* stimolati da composti volatili dell'olivo e dal componente principale del feromone sessuale [1,7-dioxaspiro (5,5) undecano].

Composto	Risposta (%)	
	Maschi	Femmine
olio minerale	8	0
<i>n</i> -undecano	0	0
<i>n</i> -dodecano	0	16
(<i>E</i>)-3-esen-1-olo	40	56
1-octanolo	52	56
(<i>E</i>)-2-esenale	80	80
1-eptanale	60	80
ottanale	60	40
(<i>E</i>)-2-ottenale	44	80
nonanale	60	80
(<i>E</i>)-2-decenale	32	56
2-idrossibenzaldeide	56	52
2-esanone	64	52
3-esanone	48	80
mircene	12	16
<i>p</i> -cimene	48	44
(+)- α -pinene	12	16
(-)- β -pinene	16	28
D-(+)-limonene	56	72
L-(-)-limonene	28	24
stirene	16	40
toluene	20	40
etilbenzene	20	52
feromone	40	32

Sono state considerate positive le risposte caratterizzate da incrementi statisticamente significativi (*t* test; *P*=0,05) della frequenza dei potenziali di azione dopo la stimolazione. Su ogni cellula è stata applicata la serie completa di stimoli.

foglie e frutti di olivo è stata analizzata in adulti vergini e accoppiati di diverso sesso ed età. In entrambi i sessi il profilo di risposta EAG è risultato simile mentre l'ampiezza delle risposte è stata maggiore nelle femmine, in particolare alle aldeidi. In maschi e femmine vergini le risposte sono diminuite all'aumentare dell'età, mentre negli adulti accoppiati sono state costanti. L'analisi dei gruppi di risposta (cluster analysis) ha dimostrato che le femmine accoppiate discernono i diversi odori per un periodo più lungo. La maggiore persistenza della sensibilità e della selettività del sistema olfattivo delle femmine accoppiate è da correlare al bisogno di localizzare il sito di ovideposizione più adatto. In un successivo studio di campo D-(+)-limonene e α -pinene hanno evidenziato una capacità attrattiva più elevata delle altre sostanze, agendo da caïromoni. Campionando le risposte dei neuroni olfattivi sulla superficie antennale mediante registrazione da singola cellula sensoriale (SCR), insieme a tipi cellulari specialisti, stimolati solo dal componente principale del feromone sessuale o da composti volatili di origine vegetale, è stata evidenziata anche la presenza di neuroni altamente generalisti, sensibili a sostanze di entrambe le categorie, con possibili rile-

vanti implicazioni su percezione e attività biologica. I risultati suggeriscono che, come conseguenza generale, è necessaria grande attenzione nella messa a punto di miscele di componenti feromonici e composti di natura diversa per il monitoraggio o il controllo delle popolazioni di *B. oleae*. Ricerche mirate ad un'utilizzazione pratica dei caïromoni identificati, da soli o in miscela con altre sostanze, quali componenti feromonici e altri composti di origine vegetale o batterica, sono tuttora in corso.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON P., HANSSON B.S., LÖFQVIST J., 1995 – *Plant odour-specific receptor neurones on the antennae of female and male Spodoptera littoralis*. - *Physiol. Entomol.*, 20: 189-198.
- ANDERSON P., LARSSON M., LÖFQVIST J., HANSSON B.S., 1996 – *Plant odour receptor neurones on the antennae of the two moths Spodoptera littoralis and Agrotis segetum*. - *Ent. Exp. Appl.*, 80: 32-34.
- ANFORA G., VITAGLIANO S., LARSSON M.C., WITZGALL P., TASIN M., GERMINARA G.S., DE CRISTOFARO A., 2014 – *Disruption of Phthorimaea operculella (Lepidoptera: Gelechiidae) oviposition by the application of host plant volatiles*. *Pest Manag. Sci.*, 70 (4): 628-635.
- BÄCKMAN A.C., ANDERSON P., BENGSSON M., LÖFQVIST J., UNELIUS C. R., WITZGALL P., 2000 – *Antennal response of codling moth males, Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae), to the geometric isomers of codlemone and codlemone acetate*. - *J. Comp. Physiol. A*, 186: 513-519.
- BAKER R., HERBERT R., HOWSE P.E., JONES O.T., FRANKE W., REITH W., 1980 – *Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (Dacus oleae)*. - *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*: 52-53.
- COSSÉ A.A., TODD J.L., BAKER T.C., 1998 – *Neurons discovered in male Helicoverpa zea antennae that correlate with pheromone-mediated attraction and interspecific antagonism*. - *J. Comp. Physiol. A*, 182: 585- 594.
- CARLSSON M.A., HANSSON B.S., 2002 – *Responses in highly selective sensory neurons to blends of pheromone compounds in the moth Agrotis segetum*. - *J. Insect Physiol.*, 48: 443-451.
- DE CRISTOFARO A., 1995 – *Ruolo dei semiochimici nelle interrelazioni castagno-tortrici: studi elettrofisiologici e comportamentali*. - Ph.D. Thesis, Italian National Libraries of Rome and Florence: 1-80.
- DE CRISTOFARO A., ROTUNDO G., GERMINARA G.S., 1997 – *Risposte elettrofisiologiche e comportamentali delle tortrici delle castagne (Lep.: Tortricidae) agli attrattivi sessuali ed alla pianta ospite*. - *Atti Convegno Nazionale sul Castagno, Cison di Valmarino (TV), 23-25 ottobre*: 493-513.
- DE CRISTOFARO A., DEN OTTER C.J., ROTUNDO G., 1998 – *Risposte di cellule olfattive in sensilli basiconici e tricoidei di Drosophila melanogaster Meigen e D. simulans (Sturtevant)*. *Atti XVIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Maratea (PZ) 21-26 giugno*: 175.
- DE CRISTOFARO A., IORIATTI C., PASQUALINI E., ANFORA G., GERMINARA G.S., VILLA M., ROTUNDO G., 2004 – *Electrophysiological responses of Cydia pomonella to codlemone and pear ester ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate: peripheral interactions in their perception and evidences for cells responding to both compounds*. *Bull. Insectol.*, 57 (2): 137-144.

- DE CRISTOFARO A., ROTUNDO G., BELCARI A., GERMINARA G.S., 2007 – *Effect of age and mating status on the antennal sensitivity of Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae) male and female. - IOBC/WPRS Bull., 30: 23.
- DEN OTTER C.J., DE CRISTOFARO A., VOSKAMP K.E., ROTUNDO G., 1996 – *Electrophysiological and behavioural responses of chestnut moths, Cydia fagiglandana and C. splendana* (Lep., Tortricidae), to sex attractants and odours of host plant. - J. Appl. Entomol., 120: 413-421.
- GEROFOTIS C.D., IOANNOU C.S., PAPADOPOULOS N.T., 2013 – *Aromatized to find mates: α -pinene aroma boosts the mating success of adult olive fruit flies*. - PLoS ONE, 8 (11): e81336. doi:10.1371/journal.pone.0081336.
- HANSSON B.S., BLACKWELL A., HALLBERG E., LÖFQVIST J., 1995 – *Physiological and morphological characteristics of the sex pheromone detecting system in male corn stemborers, Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). - J. Insect Physiol., 41: 171-178.
- LÖFSTEDT C., HANSSON B.S., DIJKERMAN H., HERREBOUT W.M., 1990 – *Behavioural and electrophysiological activity of unsaturated analogues of the pheromone tetradecyl acetate in the small ermine moth Yponomeuta rorellus*. - Physiol. Entomol. 15: 47-54.
- MAZOMENOS B.E., HANIOTAKIS G.E., 1981 – *A multi component female sex pheromone of Dacus oleae Gmel. Isolation and bioassay*. - J. Chem. Ecol., 7: 437- 443.
- MAZOMENOS B.E., HANIOTAKIS G.E., 1985 – *Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests*. - J. Chem. Ecol., 11: 397-405.
- MONTI L., LALANNE-CASSOU B., LUCAS P., MALOSSE C., SILVAIN J.F., 1995 – *Differences in sex pheromone communication systems of closely related species: Spodoptera latifascia* (Walker) and *S. descoinsi* (Lalanne-Cassou and Silvain) (Lepidoptera: Noctuidae). - J. Chem. Ecol., 21: 641-660.
- MUSTAPARTA H., 2002 – *Encoding of plant odour information in insects: peripheral and central mechanisms*. - Ent. Exp. Appl., 104: 1-13.
- OCHIENG S.A., PARK K.C., BAKER T.C., 2002 – *Host plant volatiles synergize responses of sex pheromone-specific olfactory receptor neurons in male Helicoverpa zea*. - J. Comp. Physiol. A, 188: 325-333.
- RENOU M., LUCAS P., 1994 – *Sex pheromone reception in Mamestra brassicae L. (Lepidoptera): responses of olfactory receptor neurones to minor components of the pheromone blend*. J. Insect Physiol., 40: 75-85.
- ROTUNDO G., GERMINARA G.S., DE CRISTOFARO A., RAMA F., 2001 – *Identificazione di composti volatili in estratti da diverse cultivar di Olea europaea L. biologicamente attivi su Bactrocera oleae (Gmelin) (Diptera: Tephritidae)*. - Boll. Lab. Ent. Agr. "Filippo Silvestri", 57: 25-34.
- SCARPATI M.L., LO SCALZO R., VITA G., 1993 – *Olea europaea volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (Dacus oleae, Gmelin)*. - J. Chem. Ecol., 19: 881-891.
- SCARPATI M.L., LO SCALZO R., VITA G., GAMBACORTA A., 1996 – *Chemiotropic behavior of female olive fly (Bactrocera oleae Gmel.) on Olea europaea L.* - J. Chem. Ecol., 22: 1027-1036.
- SCHMIDT S., ANFORA G., IORIATTI C., GERMINARA G.S., ROTUNDO G., DE CRISTOFARO A., 2007 – *Biological activity of ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate on different tortricid species: electrophysiological responses and field tests*. Environ. Entomol., 36 (5): 1025-1031.
- ULLAND S., MEADOW R., BORG-KARLSON A.K., BONES A., MUSTAPARTA H., 2003 – *Olfactory receptor neurones in Mamestra brassicae specified for volatiles released by host plants of related species*. Book of Abstracts of VIII ESITO Meeting, Harstad, Norway, 2-7 July 2003: 81.
- WU W.-Q., HANSSON B.S., LÖFSTEDT C., 1995 – *Electrophysiological and behavioral evidence for a fourth sex pheromone component in the turnip moth, Agrotis segetum*. - Physiol. Entomol., 20: 81-92.

LA MOSCA DELLE OLIVE *BACTROCERA OLEAE* (ROSSI) E IL SUO RAPPORTO CON LA DRUPA

ANTONIO PIETRO GARONNA (*) - FILOMENA GRASSO (*) - GIANDOMENICO CORRADO (*) - ROSA RAO (*)

(*) Dipartimento di Agraria - Università degli Studi di Napoli "Federico", II Via Università 100 - 80055 Portici (Napoli); email: garonna@unina.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

The Olive fly Bactrocera oleae (Rossi) and its relationship with the drupe

The Olive fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) is the most harmful species that threatens the olive crop production worldwide. To date, the molecular mechanisms of host response associated with olive fly attack are still largely unexplored. The knowledge of the defense mechanisms activated by the plant can lead to the identification of genes that play a key role in olive defense and it may be exploited for insect control. The results of few transcriptomic and proteomic investigations of the molecular response of the drupe in olive varieties with different levels of susceptibility are available. Drupe response to olive fly attack involve an extensive transcriptome reprogramming modifying the expression of thousands of genes included in a wide range of pathways. Major modifications are related to the biosynthesis of jasmonic acid, salicylic acid, ethylene, flavonoid and related VOCs. In addition, the modification of transcript levels active in the regulation of defense genes was observed. New insights into the molecular mechanisms of olive genetic resistance to *B. oleae* and the related defense responses can be suitable to the development of more sustainable pest management strategies.

KEY WORDS: *Olea europaea*, biotic stress agent, olive susceptibility, molecular defense responses.

INTRODUZIONE

Bactrocera oleae, la mosca olearia, è il fitofago chiave della coltivazione dell'olivo su scala globale. Indagini di campo hanno consentito di evidenziare che alcune cultivar risultano possedere una minore suscettibilità all'attacco del tefritide. Tale peculiarità è considerata geograficamente specifica ed è influenzata dal variare delle condizioni ambientali tipiche delle differenti regioni olivicole (MALHEIRO *et al.*, 2015a). I fattori di questa differente suscettibilità sono dibattuti (LO SCALZO *et al.*, 1994; SCARPATI *et al.*, 1996; BASILE *et al.*, 2006). Una forte tolleranza, perlopiù evidenziata da basse percentuali di infestazione, è nota per alcune varietà coltivate (DAANE & JOHNSON, 2010; IANNOTTA & SCALERCIO, 2012), anche se, in particolari annate favorevoli alla mosca, questa caratteristica non impedisce il raggiungimento di percentuali di infestazione elevate (IANNOTTA *et al.*, 1999).

Numerosi fattori possono influenzare, in modo positivo o negativo, la scelta della femmina ovideponente di *B. oleae* e il successivo sviluppo larvale. I fattori maggiormente indagati sono quelli di natura fisica, chimica, e microbiologica, mentre ancora carenti sono gli studi sugli eventi molecolari. Questi ultimi sono però decisivi per chiarire l'attivazione e i protagonisti dei meccanismi di difesa diretta ed indiretta nel-

l'olivo. Ogni fattore non agisce da solo ed il comportamento del fitofago e l'intensità delle infestazioni è da considerarsi come il risultato della loro interazione (GONÇALVES *et al.*, 2012).

Tra i **fattori fisici** vi sono forma, dimensioni, peso, volume, durezza ed elasticità dell'epicarpo e grado di colorazione delle drupe. Sono state evidenziate correlazioni positive tra forma, dimensioni/volume e grado d'infestazione, maggiore attrattività del colore verde rispetto al colore del frutto maturo (RIZZO & CALECA, 2006; IANNOTTA & SCALERCIO, 2012; RIZZO *et al.*, 2012). Anche l'elasticità minore dell'epicarpo, caratteristica che favorisce la penetrazione dell'ovopositore, è correlabile positivamente con il grado di infestazione raggiunto in alcune cultivar esaminate in Portogallo e Sicilia in anni più recenti (GONÇALVES *et al.*, 2012; RIZZO *et al.*, 2012).

Tra i **fattori chimici** indagati vi sono le cere di superficie, che in generale hanno effetto deterrente (KOMBARGI *et al.*, 1998). Risultano fortemente attrattivi sostanze ammoniacali e stirene (SCARPATI *et al.*, 1996), che derivano in gran parte dal metabolismo della microflora epifitica, dalla quale dipendono la fitness della femmina adulta e la sopravvivenza delle larve carpofaghe (SACCHETTI *et al.*, 2008; BEN-YOSEF *et al.*, 2015). La composizione di sostanze volatili può essere decisiva nel determinare maggiore o minore

suscettibilità (KUBO *et al.*, 1998; ROTUNDO *et al.*, 2001; CAMPEOL *et al.*, 2003; MALHEIRO *et al.*, 2015b, 2015c) e condizionare la scelta delle femmine ovi-deponenti della mosca olearia (MALHEIRO *et al.*, 2016). Attrattiva risulta la presenza degli idrocarburi toluene ed etilbenzene (SCARPATI *et al.*, 1993) e quella di alfa-copaene, sesquiterpene presente in concentrazioni superiori in cultivar suscettibili (ALFONSO *et al.*, 2014). Altri studi hanno evidenziato l'attivazione di meccanismi di difesa legati a sostanze fenoliche, come l'oleuropeina, precursore di composti ad attività antimicrobica ed insetticida (SPADAFORA *et al.*, 2008; KOUDOUNAS *et al.*, 2015). La stessa composizione di acidi grassi è stata indagata come possibile fattore influenzante il grado di infestazione, evidenziando una correlazione negativa tra contenuto di alcuni acidi grassi (palmitico, linolenico e lignocericico) e grado di attacco (GONÇALVES *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda le indagini molecolari svolte sull'olivo, la gran parte degli studi riguarda i geni coinvolti in vie metaboliche biosintetiche di acidi grassi, dei trigliceridi, dei composti fenolici e antiossidanti, nonché nelle risposte a stress idrico, mentre sono ancora insufficienti gli studi sulle risposte agli stress biotici, a dispetto dell'importanza economica globale della coltura. Infatti, diversamente da molte altre specie arboree, il sequenziamento del genoma dell'olivo è allo stato attuale ancora in una fase iniziale.

APPROCCI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELL'INTERAZIONE TRA L'OLIVO E LA MOSCA OLEARIA

Gli effetti sul trascrittoma e sul metaboloma dell'interazione oliva-mosca olearia sono poco conosciuti. Primi dati riguardanti le modalità di attivazione di alcune delle vie metaboliche inducibili in pianta dall'infestazione di insetti fitofagi, valide anche per *B. oleae* nel suo rapporto con la drupa, sono state pubblicate solo di recente (CORRADO *et al.*, 2012; IMPERATO *et al.*, 2012; GRASSO, 2015; ALAGNA *et al.*, 2016).

Gli interessanti risultati ottenuti hanno evidenziato cambiamenti dei profili trascrittomici e proteomici in drupe delle cultivar *Moraiolo* e *Leccino* sottoposte dall'attacco del carpofago (CORRADO *et al.*, 2012). La risposta della drupa è risultata essere complessa, coinvolgendo geni correlati alla fotosintesi, nella produzione di radicali ROS (*reactive oxygen species*) implicati nell'attivazione di vie metaboliche delle risposte a stress e nella produzione di composti ad attività anti-larvale. Tra questi gli inibitori della tripsina, che potrebbero avere un ruolo primario nelle reazioni di difesa dell'ospite.

L'identificazione di trascritti genici coinvolti nell'attivazione di vie metaboliche per le risposte a stress biologici, effettuata mediante analisi Gene Ontology,

ha permesso di verificare che, nelle drupe infestate, la classe funzionale più abbondante di geni sovra espressi è quella legata alla "Risposta a Stress" della categoria "Processi biologici" (CORRADO *et al.*, 2012). L'analisi di espressione di alcuni geni coinvolti nei meccanismi di difesa della pianta, ha evidenziato che le sequenze maggiormente indotte dall'infestazione larvale, includono la proteina PR 27, l'inibitore della tripsina e la chitinasi I. È noto che le chitinasi sono una componente significativa della difesa nei vegetali per la diretta azione su patogeni fungini e anche su insetti fitofagi. L'analisi di espressione genica svolta e la presenza di peptide segnale supportano il ruolo della chitinasi I nei processi di difesa nella drupa (CORRADO *et al.*, 2012). Nello stesso studio, l'approccio proteomico ha permesso di osservare le modificazioni quali-quantitative nel profilo di espressione di 19 proteine, presenti in drupe infestate, coinvolte nella produzione di molecole implicate nella difesa diretta e nella produzione di molecole segnale (fitormoni e radicali ROS).

La caratterizzazione funzionale della libreria genica ottenuta ha permesso di evidenziare l'esistenza di sequenze riconducibili a geni coinvolti nella risposta a stress, compresi quelli legati a fenomeni biotici, come l'attacco di patogeni, e quelli legati agli stress termici e salini. Oltretutto sono stati identificati trascritti coinvolti nella produzione primaria, nella trasduzione di segnale o nelle risposte ad ormoni e molecole legate alla resistenza vegetale nei riguardi di fitofagi (CORRADO *et al.*, 2012). È risultata rilevante anche l'espressione differenziale di geni coinvolti nel rapporto pianta-patogeno, nota anche per altri binomi pianta-fitofago indagati, che suggerisce la sovrapposizione di vie metaboliche per le risposte a patogeni ed insetti fitofagi e la condivisione di componenti a livello di segnalazione cellulare (VAN LOON *et al.*, 2006).

Come per altre piante, anche in olivo si è evidenziato il coinvolgimento di numerose molecole nei meccanismi di difesa contro insetti fitofagi. È stato possibile annotare una diminuzione del livello di proteine coinvolte nella fotosintesi ed un'alterazione del metabolismo glucidico, a seguito dell'azione alimentare della larva di *B. oleae*. Le lacune riguardanti il genoma dell'olivo ed il suo trascrittoma, sono le ragioni principali che hanno comportato un elevato numero di trascritti non annotati (CORRADO *et al.*, 2012).

BASI MOLECOLARI DELL'INTERAZIONE TRA LA DRUPA E LA MOSCA DELLE OLIVE

Una successiva indagine ha permesso di ottenere una comprensione più ampia dei cambiamenti mole-

colari che si verificano nelle olive dopo l'attacco di *B. oleae* (GRASSO, 2015). Essa ha riguardato due varietà campane note per il loro diverso livello di suscettibilità alla mosca: *Ruveia* (considerata resistente) e *Ortice* (molto suscettibile) (PUGLIANO *et al.*, 2000). Lo studio ha permesso l'annotazione funzionale di ben 14209 trascritti differenzialmente espressi, con i profili trascrittomici delle drupe danneggiate significativamente differenti rispetto a quelli dei loro omologhi non danneggiati. L'analisi su olive infestate, e non, delle due cultivar indagate, ha evidenziato sequenze espresse in modo differenziale, pari a 52 per *Ortice* e ben 2477 per *Ruveia*, con alterazioni trascrittomiche più rilevanti indotte dall'attacco di *B. oleae* in drupe della cultivar più resistente (GRASSO, 2015). Nella riprogrammazione genica sono risultate coinvolte diverse categorie funzionali: quella più rappresentata è il metabolismo proteico, seguito da trascrizione, metabolismo primario, trasporto, stress e risposte di difesa, trasduzione di segnale, organizzazione cellulare, metabolismo secondario, modifiche della parete cellulare e fotosintesi. Mentre per la cv *Ruveia* i numerosi trascritti sono riconducibili a tutte le categorie funzionali, in *Ortice* alcune di queste sono solo minimamente rappresentate. Inoltre, tra le sequenze sotto espresse, in drupe di *Ortice*, ben cinque sono coinvolte nell'attivazione di difesa e risposta a stress. Tali risultati evidenziano l'incapacità della varietà suscettibile ad attivare una risposta adeguata a *B. oleae*. Di contro, la cv *Ruveia* mostra estesi cambiamenti trascrittomici a seguito dell'attacco di *B. oleae*. Tra i geni di difesa e di risposta a stress 50 sono risultati sovra espressi e 95 sotto espressi, 20 dei quali coinvolti nella regolazione negativa della risposta di difesa, evidenziando in tal modo che l'attacco della mosca provoca l'attivazione di risposte repressi in condizioni fisiologiche normali (GRASSO, 2015). Tale risultato è in linea con il fatto che le piante hanno evoluto difese inducibili da attivare solo in caso di necessità per limitare dispendio di energia e nutrienti (SCHUMAN & BALDWIN, 2016). La quantità di geni espressi in modo differenziale (40 geni), coinvolti sia nel metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno, sia nella risposta allo stress ossidativo indica l'alterazione dello stato redox cellulare delle drupe di *Ruveia* dopo l'attacco della mosca dell'olivo (GRASSO, 2015).

L'alterata espressione genica della categoria funzionale *metabolismo proteico*, può indicare che le risposte di difesa hanno determinato una forte riallocazione delle risorse ed una maggiore espressione di geni direttamente o indirettamente influenzanti lo sviluppo e la sopravvivenza del fitofago. Nei casi di interazione pianta-patogeno è stata verificata la riallocazione di sostanze proteiche lontano dai tessuti infetti dal patogeno, per limitare la crescita del

parassita, limitando altresì la perdita di nutrienti (HAVKO *et al.*, 2016). In presenza del danno causato dalla mosca, i geni del metabolismo primario e di quello proteico sotto espressi sono risultati il doppio di quelli sovra espressi. Questo documenta che l'attacco di *B. oleae* induce la pianta ad isolare la zona infestata con possibile anticipo della senescenza del frutto e sua cascola (GRASSO, 2015).

Quali che siano gli elicitori e i relativi recettori, non ancora identificati, una gran quantità di eventi segnale precoci sono scatenati dall'interazione larva carpo-faga-drupa di *Ruveia*, così come regolazioni positive e negative di geni codificanti per proteine da attivare in risposta a shock ossidativi. La stessa produzione di radicali liberi ROS (superossidi, perossidi) è stata modificata sensibilmente, con geni espressi in modo alterato, evidenziando che la variazione dello stato redox nelle cellule della drupa deve giocare un ruolo importante nelle interazioni olivo-*B. oleae* (Grasso, 2015). Com'è noto, la percezione degli elicitori di un fitofago include cambiamenti a livello del potenziale di membrana e l'attivazione di un network ormonale, in cui acido giasmonico, salicilico ed etilene giocano un ruolo decisivo. In tal senso, è stato verificato che in drupe di *Ruveia*, infestate da larve di *B. oleae*, numerosi geni, che codificano per la risposta all'acido giasmonico hanno evidenziato espressione alterata, così come per i geni coinvolti in risposte all'etilene e a vie di segnale attivate dall'etilene (GRASSO, 2015).

IL RUOLO DEI FITORMONI QUALI MODULATORI DELLA RISPOSTA A *BACTROCERA OLEAE*

I meccanismi di difesa delle piante contro gli attacchi degli insetti coinvolgono una varietà di risposte coordinate. Queste sono modulate anche dagli ormoni vegetali, tra i quali l'etilene. L'incremento di produzione di etilene è una risposta della pianta agli stress biotici, che promuove l'emissione di volatili e modula altre risposte di difesa ad insetti fitofagi (BROEKGAARDEN *et al.*, 2015; MÜLLER & MUNNÉ-BOSCH, 2015). L'etilene induce rapida trascrizione di geni che codificano per tossine o sostanze antidigestive, in particolare chitinasi, beta 1-3 glucanasi, proteine PR ed inibitori di proteasi (WU & BALDWIN, 2010). CORRADO *et al.* (2012) hanno riscontrato significativa induzione trascrizionale di geni associati direttamente o indirettamente al metabolismo dell'etilene, inclusi alcuni fattori di trascrizione, in drupe di *Moraiolo* danneggiate da *B. oleae*.

I risultati di uno studio recente hanno confermato la complessità della risposta dell'olivo a *B. oleae*, analizzando il contenuto dei fitormoni etilene, acido giasmonico, del suo precursore OPDA e acido sali-

cilico in drupe infestate e non delle cultivar *Leccino*, di media suscettibilità, e *Coratina*, di elevata suscettibilità (ALAGNA *et al.*, 2016). La comparazione dei livelli di emissione di etilene tra infestato e sano ha evidenziato un suo incremento di 23 volte nei frutti infestati di *Leccino* e di circa 10 volte in *Coratina*, suggerendo che la maggiore suscettibilità della seconda cv sia legata ai livelli di induzione di etilene.

Anche i trascritti dei fattori attivati dall'etilene (ERF) e coinvolti nel *signaling* hanno evidenziato incrementi fino a 13 volte il livello normale. Sono stati identificati 3 geni ERF coinvolti nella risposta a *B. oleae*, i cui livelli non aumentano nei frutti maturi. Ciò sta ad indicare che l'aumento di etilene elicitato dall'insetto non è collegato al processo di maturazione dei frutti, ma all'attivazione delle difese contro il fitofago (ALAGNA *et al.*, 2016).

Gli stessi autori hanno verificato che, a causa dell'azione larvale, si ottiene anche l'attivazione della via idroperossido-liasi (HPL), con incremento significativo dei livelli di traumatina, acido 12-idrossidodecanoico e idrossi-traumatina che presiedono alla sintesi di metaboliti secondari coinvolti in meccanismi di difesa. Altra conseguenza di tali attivazioni metaboliche è la produzione di sostanze volatili in modo differenziale tra drupe infestate da mosca e quelle sane, con variazione significativa del profilo dei volatili, tra cui si evidenzia una sovra regolazione per sesquiterpeni ipotizzando un loro coinvolgimento nei meccanismi di difesa indiretti (ALAGNA *et al.*, 2016).

MODULAZIONE DI INIBITORI DI PROTEASI NELLE DRUPE

Gli inibitori di proteasi (IP) sono ampiamente distribuiti nel regno vegetale e sono considerati una parte essenziale del sistema di difesa della pianta contro insetti fitofagi. ALAGNA *et al.* (2016) riportano in olivo la modulazione di IP ad elevati livelli a causa dell'infestazione da mosca olearia in frutti prossimi alla maturazione della cv *Leccino*. Già CORRADO *et al.* (2012) avevano evidenziato incrementi dei livelli di mRNA di geni IP in drupe infestate rispetto a quelle sane di *Moraiolo*. Gli stessi autori ritengono che la mancata modulazione di IP in drupe verdi infestate sia dovuto ad un livello già elevato, quali elementi della difesa costitutiva dell'olivo, e quindi sufficiente a proteggere la pianta da eventuali attacchi di fitofagi, spiegando in tal modo perché essi non siano indotti dall'attacco di *B. oleae* (ALAGNA *et al.*, 2016). Di contro, in fase di maturazione, le differenze evidenziate sono risultate significative con livelli di IP espressi superiori nelle drupe infestate rispetto alle

sane. Con il completamento del processo di maturazione della drupa, la pianta, riducendo le risposte di difesa costitutive al termine del ciclo riproduttivo, recupera energia metabolica, che può essere destinata ai cambiamenti fisiologici legati alla maturazione. È noto per altre specie che la direzione e la magnitudo delle risposte di difesa all'azione larvale di un fitofago dipende dall'età dei tessuti che sono danneggiati e che l'ontogenesi della pianta condiziona sia la produzione costitutiva e sia quella indotta di composti di difesa (SCHULTZ *et al.*, 2013; STAM *et al.*, 2014).

PROSPETTIVE FUTURE E CONCLUSIONI

I risultati degli studi trascrittomici riguardanti le risposte molecolari di cultivar di olivo all'attacco della mosca, potranno servire sia allo sviluppo di markers trascrizionali e sia a valutare l'influenza di tutte le modifiche e reazioni della pianta (es., produzione di metaboliti secondari, volatili emessi solo in presenza della mosca nell'oliveto) sulla qualità dell'olio ottenibile (GRASSO *et al.*, 2014). Profilo di espressione, metabolomica, analisi dei volatili potranno aprire scenari inesplorati sulla interazione mosca-olivo.

Gli studi molecolari fin qui realizzati (ALAGNA *et al.*, 2016; CORRADO *et al.*, 2012; GRASSO, 2015) evidenziano che la variabilità del germoplasma di olivo non coinvolge solo tratti fenotipici e qualitativi (es. olio), ma anche le risposte di difesa alla mosca. Gli studi trascrittomici possono mettere in luce i meccanismi che determinano minore suscettibilità o resistenza genetica alla mosca olearia e la varietà delle difese attivate dalla pianta nei riguardi del suo nemico, come osservato in passato. La molteplicità dei meccanismi di difesa messa in luce dall'interazione *B. oleae* – olivo, offre l'opportunità di procedere alla selezione di germoplasma olivicolo adatto a differenti condizioni ambientali. I dati ottenuti possono fornire concrete possibilità anche per la manipolazione della resistenza. La possibilità di correlare livelli di resistenza con l'espressione genica potrebbe permettere di individuare geni candidati o regioni genomiche per dare un contributo alla resistenza dell'olivo, anche attraverso uno screening per tolleranza e resistenza a livello molecolare. Lo sviluppo degli studi molecolari ed il loro ampliamento mediante ricerche multidisciplinari, finalizzate alla più fine comprensione delle interazioni pianta-fitofago, potranno contribuire allo sviluppo di strumenti innovativi per il controllo della mosca e la messa a punto di sistemi di gestione, per limitare le attuali ingenti perdite di produzione di olio e olive da mensa causate da *B. oleae*.

RIASSUNTO

La mosca delle olive *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) è il fitofago chiave dell'olivo a livello mondiale. I meccanismi molecolari e i geni implicati nelle risposte attivate dall'ospite a seguito dell'attacco del fitofago sono aspetti non ancora adeguatamente studiati. Tali conoscenze sono alla base dello sviluppo di modalità di controllo innovative e a minor impatto ambientale. Ad oggi, le indagini completate si riferiscono ad un numero ridotto di cultivar da olio a diverso grado di suscettibilità, di cui sono noti i risultati scaturiti da analisi trascrittomiche e proteomiche. Analogamente a quanto avviene in altre specie vegetali, per l'olivo la risposta della drupa all'attacco della mosca determina un'estesa riprogrammazione dei trascritti, con la modifica dei livelli di espressione di migliaia di geni coinvolti in un'ampia gamma di vie metaboliche. Inoltre, sono state evidenziate modifiche nei trascritti di geni coinvolti nelle risposte di difesa diretta. Le ricerche in atto sui meccanismi molecolari della resistenza genetica dell'olivo alla mosca olearia potranno portare alla selezione di cultivar con maggiore capacità di resistere allo stress biotico. Tali conoscenze forniranno un contributo indispensabile per una gestione sostenibile del fitofago.

BIBLIOGRAFIA

- ALAGNA F., KALLENBACH M., POMPA A., DE MARCHIS F., RAO R., BALDWIN I.T., BONAVENTURE G., BALDONI L., 2016 – *Olive fruits infested with olive fly larvae respond with an ethylene burst and the emission of specific volatiles*. - J. Integr. Plant Biol., 58(4): 413-425.
- ALFONSO I., VACAS S., PRIMO J., 2014 – *Role of α -copaene in the susceptibility of olive fruits to Bactrocera oleae (Rossi)*. - J. Agr. Food Chem., 62: 11976-11979.
- BASILE B., ROMANO R., GARONNA A.P., FORLANI M., RAO R., 2006 – *Preliminary study of the susceptibility of different olive cultivars to olive fruit fly [Bactrocera oleae (Gmel.)]*. - Proc. Olivebioteq, Marsala 5-10.11.2006, Vol. II: 319-322.
- BEN-YOSEF M., PASTERNAK Z., JURKEVITCH E., YUVAL B., 2015 – *Symbiotic bacteria enable olive fly larvae to overcome host defences*. - R. Soc. open Sci., 2(7): 150170.
- BROEKGAARDEN C., CAARLS L., VOS I.A., PIETERSE C.M.J., VAN WEES S.C.M., 2015 – *Ethylene: Traffic controller on hormonal crossroads to defense*. - Plant Physiol., 169: 2371-2379.
- CAMPEOL E., FLAMINI G., CIONI P.L., MORELLI I., CREMONINI R., CECCARINI L., 2003 – *Volatile fractions from three cultivars of Olea europaea L. collected in two different seasons*. - J. Agr. Food Chem., 51: 1994-1999.
- CORRADO G., ALAGNA F., ROCCO M., RENZONE G., VARRICCHIO P., COPPOLA V., COPPOLA M., GARONNA A., BALDONI L., SCALONI A., RAO R., 2012 – *Molecular interactions between the olive and the fruit fly Bactrocera oleae*. - BMC Plant Biol., 12: 1-17.
- DAANE K.M., JONHSON M.W., 2010 – *Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times*. - Annu. Rev. Entomol., 55: 151-169.
- GONÇALVES M.F., MALHEIRO R., CASAL S., TORRES L., PEREIRA J.A., 2012 – *Influence of fruit traits on oviposition preference of the olive fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae), on three Portuguese olive varieties (Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana)*. - Sci. Hortic., 145: 127-135.
- GRASSO F., COPPOLA M., PADUANO A., GARONNA A.P., CARBONE F., CORRADO G., PERROTTA G., SACCHI R., RAO R., 2014 – *Effetto della mosca olearia (Bactrocera oleae) sul profilo trascrittomico e metabolomico dell'olivo (Olea europaea)*. - Abstracts XXIV Congr. Naz. It. Entomologia – Orosei (NU), comunicazione orale: 22-23.
- GRASSO F., 2015 – *Olive genetic diversity and molecular interaction with Bactrocera oleae*. PhD Thesis, Dottorato in Scienze Biotechnologiche – XXVII ciclo. Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, 109 pp.
- HAVKO N.E., MAJOR I.T., JEWELL J.B., ATTARAN E., BROWSE J., HOWE G.A., 2016 – *Control of carbon assimilation and partitioning by jasmonate: An accounting of growth–defense tradeoffs*. - Plants, 5: 7 doi: 10.3390/plants5010007
- IANNOTTA N., PERRI L., TOCCI C., ZAFFINA F., 1999 – *The behaviour of different olive cultivars following attacks by Bactrocera oleae (Gmel.)*. - Acta Hortic., 474: 545-548.
- IANNOTTA N., MACCHIONE B., NOCE M.E., PERRI E., SCALERCIO S., 2006 – *Olive genotypes susceptibility to the Bactrocera oleae (Gmel.) infestation*. - Proc. Olivebioteq, Marsala 5-10.11.2006, Vol. II: 261-266.
- IANNOTTA N., SCALERCIO S., 2012 – *Susceptibility of cultivars to biotic stresses*. In: Muzzalupo I. (Ed.), Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy, 81-106. InTech, Rijeka.
- IMPERATO A., CORRADO G., ALAGNA F., VARRICCHIO P., BALDONI L., RAO R., 2012 – *Olive molecular response to attack of Bactrocera oleae: identification of up-regulated genes in infested olive fruits*. - Acta Hortic., 929: 125-128.
- KOMBARGI W.S., MICHELAKIS S.E., PETRAKIS C.A., 1998 – *Effect of olive surface waxes on oviposition by Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae)*. - J. econ. Entomol., 91: 993-998.
- KOUDOUNAS K., BANILAS G., MICHAELIDIS C., DEMOLIOU C., RIGAS S., HATZOPOULOS P., 2015 – *A defence-related Olea europaea β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent*. - J. Exp. Bot., 66(7): 2093-2106.
- KUBO I, MATSUMOTO A, TAKASE I., 1998 – *A multichemical defense mechanism of bitter olive Olea europaea (Oleaceae). Is oleuropein a phytoalexin precursor?* - J. Chem. Ecol., 11: 251-263.
- LO SCALZO R., SCARPATI M.L., VERZEGNASSI B., VITA G., 1994 – *Olea europaea chemicals repellent to Bactrocera oleae females*. - J. Chem. Ecol., 20: 1813-1823.
- MALHEIRO R., CASAL S., BAPTISTA P., PEREIRA J.A., 2015A – *A review of Bactrocera oleae (Rossi) impact in olive products: from the tree to the table*. - Trend. Food Sci. Technol., 44: 226-242.
- MALHEIRO R., CASAL S., CUNHA S.C., BAPTISTA P., PEREIRA J.A., 2015B – *Olive volatiles from Portuguese cultivars Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana: role in oviposition preference of Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae)*. - Plos One, 10: 1-15.
- MALHEIRO R., CASAL S., BAPTISTA P., PEREIRA J.A., 2015C – *Physico-chemical characteristics of olive leaves and fruits and their relation with Bactrocera oleae (Rossi) cultivar oviposition preference*. - Scientia Horticulturae, 194: 208-214.
- MALHEIRO R., CASAL S., CUNHA S.C., BAPTISTA P., PEREIRA J.A., 2016 – *Identification of leaf volatiles from olive olive (Olea europaea) and their possible role in the ovipositional preferences of olive fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae)*. - Phytochemistry, 121: 11-19.

- MÜLLER M., MUNNÉ-BOSCH S., 2015 – *Ethylene Response Factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling*. - Plant Physiol., 169: 32–41.
- PUGLIANO G., FLAMINIO G., PUGLIANO G., PUGLIANO M. L., SANNINO G., SCHIAVONE S., 2000 – *La risorsa genetica dell'olivo in Campania*. - Regione Campania, 160 pp.
- RIZZO R., CALECA V., 2006 – *Resistance to the attack of Bactrocera oleae (Gmelin) of some sicilian olive cultivars*. - Proc. Olivebioteq 2006, Marsala 5-10.11.2006, Vol. II: 291-298.
- RIZZO R., CALECA V., LOMBARDO A., 2012 – *Relation of fruit color, elongation, hardness, and volume to the infestation of olive cultivars by the olive fruit fly, Bactrocera oleae*. - Entomol. Exp. Appl., 145: 15-22.
- ROTUNDO G., GERMINARA G.S., DE CRISTOFARO A., RAMA F., 2001 – *Identificazione di composti volatili in estratti da diverse cultivar di Olea europaea L. biologicamente attivi su Bactrocera oleae (Gmelin) (Diptera: Tephritidae)*. - Boll. Lab. Ent. agr. Filippo Silvestri, 57:25-34.
- SACCHETTI P., GRANCHIETTI A., LANDINI S., VITTI C., GIOVANNETTI L., BELCARI A., 2008 – *Relationships between the olive fly and bacteria*. - J. appl. Entomol., 132: 682-689.
- SCARPATI M.L., LO SCALZO R., VITA G., 1993 – *Olea europaea volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly (Dacus oleae, Gmelin)*. - J. Chem. Ecol., 19: 881-891.
- SCARPATI M.L., LO SCALZO R., VITA G., GAMBACORTA A., 1996 – *Chemotropic behavior of female olive fly (Bactrocera oleae Gmel.) on Olea europaea L.* - J. Chem. Ecol., 22: 1027-1036.
- SCHULTZ J.C., APPEL H.M., FERRIERI A.P., THOMAS T.M., 2013 – *Flexible resource allocation during plant defense responses*. - Front Plant Sci., 4: 324.
- SCHUMAN M.C., BALDWIN I.T., 2016 – *The Layers of Plant Responses to Insect Herbivores*. - Annu. Rev. Entomol., 61: 373-394.
- SPADAFORA A., MAZZUCA S., CHIAPPETTA F.F., PARISE A., INNOCENTI A.M., 2008 – *Oleuropein-specific- β -glucosidase activity marks the early response of olive fruits (Olea europaea) to mimed insect attack*. - Agric. Sci. China, 7: 703-712.
- STAM J.M., KROES A., LI Y., GOLS R., VAN LOON J.J.A., POELMAN E.H., DICKE M., 2014 – *Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes*. - Annu. Rev. Plant Biol., 65: 689-713.
- VAN LOON L.C., GERAATS B.P., LINTHORST H.J. 2006 – *Ethylene as a modulator of disease resistance in plants*. - Trends Plant Sci., 11: 184-191.
- WU J., BALDWIN I.T., 2010 – *New insights into plant responses to the attack from insect herbivores*. - Annu. Rev. Genet., 44: 1-24.

CONSIDERAZIONI FILOGENETICHE E BIOGEOGRAFICHE SU “*CANDIDATUS ERWINIA DACICOLA*” E PROSPETTIVE PER L’ALLEVAMENTO DI *BACTROCERA OLEAE* (ROSSI)

LUCA MAZZON (*) - ISABEL MARTINEZ-SAÑUDO (*) - MAURO SIMONATO (*) - VINCENZO GIROLAMI (*)

(*) Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente - DAFNAE, Università degli Studi di Padova, Viale dell’Università 16, 35020 Legnaro (PD). Autore corrispondente: lmazzon@unipd.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*”. Seduta pubblica dell’Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

Phylogenetic and biogeographic remarks on “Candidatus Erwinia dacicola” and development prospects for the mass rearing of Bactrocera oleae (Rossi)

The presence of a hereditary symbiosis in *Bactrocera oleae* was described by Petri (1909), which highlighted the presence of an oesophageal bulb that harbours bacteria. Within this organ, bacteria continuously multiply, forming masses that are discharged into the midgut.

In 2005 this symbiotic bacterium was genetically characterized and its phylogenetic status was investigated. Attempts at cultivation ex situ of the symbiont were not productive, leading to the choice of unculturable status definition. The coevolved bacterium was described as a novel taxon within the family Enterobacteriaceae as ‘*Candidatus Erwinia dacicola*’. Recently, an extended study showed the presence of three different haplotypes of *Ca. Erwinia dacicola* with a geographical distribution that appeared not to be random. Moreover, the extension of the studies to the Tephritidae family, showed the presence of specific bacteria in other species.

In the mass-rearing of the olive fly *Ca. Erwinia dacicola* is particularly important. The first mass-rearing of *B. oleae* on artificial diet was developed in the 60s but it is reported that the symbiont (considered *P. savastanoi*) was replaced by acidophilus bacteria. In the *B. oleae* rearing, the microorganism can be lost in particular for the presence of antimicrobial agents. The several attempts to restore the symbiosis have not been successful up to now.

The new knowledge on the symbiosis of the tephritid flies and advances in biotechnology give the possibility to improve *B. oleae* mass-rearing once the symbiont can be successfully reared in vitro.

KEY WORDS: symbiosis, bacteria, oesophageal bulb, Enterobacteriaceae, Oleaceae, fruit flies.

INTRODUZIONE

I primi studi sulla simbiosi in *Bactrocera oleae* risalgono agli inizi del secolo scorso con il microbiologo italiano Lionello PETRI (1909) che, nel suo trattato “Ricerche sopra i batteri intestinali della Mosca olearia”, descrisse la presenza nell’intestino anteriore di un bulbo adatto a ospitare e a consentire la moltiplicazione tumultuosa di batteri. Attraverso osservazioni di preparati microscopici, Petri descrisse inoltre la presenza di tali batteri a livello del meso-intestino sotto forma di masserelle fuoriuscenti dal bulbo esofageo e a livello delle ghiandole perianali. Il rinvenimento dei microrganismi a livello del micropilo dell’uovo e dei ciechi gastrici larvali lo portò a definire la simbiosi come ereditaria, affermazione che fu successivamente avvalorata dalle osservazioni di MAZZINI e VITA (1981). Sempre Petri ipotizzò che il simbiote della mosca delle olive potesse coincidere con ‘*Bacterium*’ (*Pseudomonas*) *savastanoi*, l’agente della rogna dell’olivo. Tale attribuzione non fu poi più messa in discussione nemmeno nei succes-

sivi lavori di HELLMUTH (1956), BUCHNER (1965) e di HAGEN (1966). Più tardi, GIROLAMI e CAVALLORO (1972) evidenziarono l’impossibilità di coltivare tali batteri, nonostante i ripetuti tentativi su diversi terreni di coltura e in diverse condizioni, rimettendo così in discussione l’identità del simbiote attribuita da Petri. Gli autori evidenziarono anche la perdita dei batteri simbiotici in insetti allevati su substrati artificiali con una conseguente riduzione della fecondità e longevità. Allo stesso tempo, nelle mosche che avevano perso i simbiotici, osservarono una riduzione del volume del bulbo esofageo che tende ad essere colonizzato da altre specie microbiche generiche acquisite dall’ambiente. Il dibattito sull’identità tassonomica dei simbiotici si protrasse sino a quando CAPUZZO *et al.* (2005), grazie all’applicazione di tecniche molecolari di sequenziamento del 16S rRNA batterico, designarono il battere della mosca dell’olivo come “*Candidatus Erwinia dacicola*”, nuovo taxon della famiglia delle Enterobacteriaceae (GenBank AJ586620) (da qui in poi riportato come *E. dacicola*). Successivamente la presenza di *E. dacicola* fu ripetuta-

mente confermata dall'analisi di differenti popolazioni di *B. oleae* compiuta in diversi laboratori nazionali ed esteri (SACCHETTI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; KOUNATIDIS *et al.*, 2009; ESTES *et al.*, 2012; SAVIO *et al.*, 2012).

POSIZIONE FILOGENETICA DI ERWINIA DACICOLA

Il sequenziamento del 16S rRNA ha consentito di indagare sulla collocazione filogenetica di *E. dacicola*. La ricostruzione filogenetica, in cui l'agente della rogna dell'olivo *Pseudomonas savastanoi* è stato inserito come outgroup, identifica come sister group di *E. dacicola* un clade, ben supportato dal punto di vista statistico, in cui ricadono *E. persicinus* ed *E. rhapontici* considerati patogeni vegetali e con i quali presenta una omologia media del 98% (Fig. 1). Tali specie batteriche possono essere considerate quindi ad oggi le specie *free-living* filogeneticamente più vicine al simbionte della mosca delle olive.

Molte specie del genere *Erwinia* appartengono alla comunità microbica che compone la microflora epifitica vegetale (WALERON *et al.*, 2002) con la capacità di comportarsi come patogeni più o meno deboli quando riescono a penetrare nei tessuti della pianta, ad esempio attraverso lesioni di vario genere (BEATTIE, 2007). È noto come, per molti tefritidi, i batteri generici del filloplano possano rappresentare un'importante fonte proteica e come poi, molte di queste specie batteriche, siano comunemente associate al tratto intestinale (DREW *et al.*, 1983; DREW e LLOYD, 1989;

SACCHETTI *et al.*, 2008). C'è inoltre da segnalare che recentemente è stata isolata da olivo una nuova specie batterica, designata come *Erwinia oleae*, geneticamente vicina a *E. herbicola* (= *Pantoea agglomerans*) (MORETTI *et al.*, 2011). L'instaurarsi di una simbiosi batterica ereditaria e coevoluita in *B. oleae* potrebbe essere spiegata quindi ipotizzando che l'acquisizione sia avvenuta dalla pianta ospite a partire da una *Erwinia* ancestrale *free-living* con un evento simile, ma indipendente, a quello avvenuto per *Candidatus Stammerula* spp. nella tribù dei Tephritini (MAZZON *et al.*, 2008; 2010; VIALE *et al.*, 2015). Questi eventi di acquisizione indipendenti sottolineerebbero la propensione dei tefritidi a stabilire rapporti simbiotici ereditari con le Enterobacteriaceae, favoriti in questo dall'utilizzo dei batteri come fonte alimentare e dallo stretto rapporto con la pianta ospite. Il legame con la pianta ospite, infatti, per molti tefritidi è tale per cui la maggior parte del loro ciclo biologico è spesa a contatto con i tessuti vegetali come larva o adulto. Sono presenti in letteratura altri casi di associazioni tra il genere *Erwinia* e insetti come ad esempio *Erwinia* sp. con *Frankliniella occidentalis* (DE VRIES *et al.*, 2001), *E. aphidicola* con afidi (HARADA *et al.*, 1997) ed *E. teleogrylli* con ortotteri (LIU *et al.*, 2016).

La recente possibilità da parte del gruppo di ricerca di avere a disposizione alcuni esemplari di *Bactrocera biguttula* (BEZZI, 1922) sfarfallati da olive raccolte in Sudafrica ha consentito di poterne analizzare il 16S rRNA del contenuto batterico del bulbo esofageo e degli agglomerati membranosi mesointestinali. È interessante notare che, nella ricostruzione filoge-

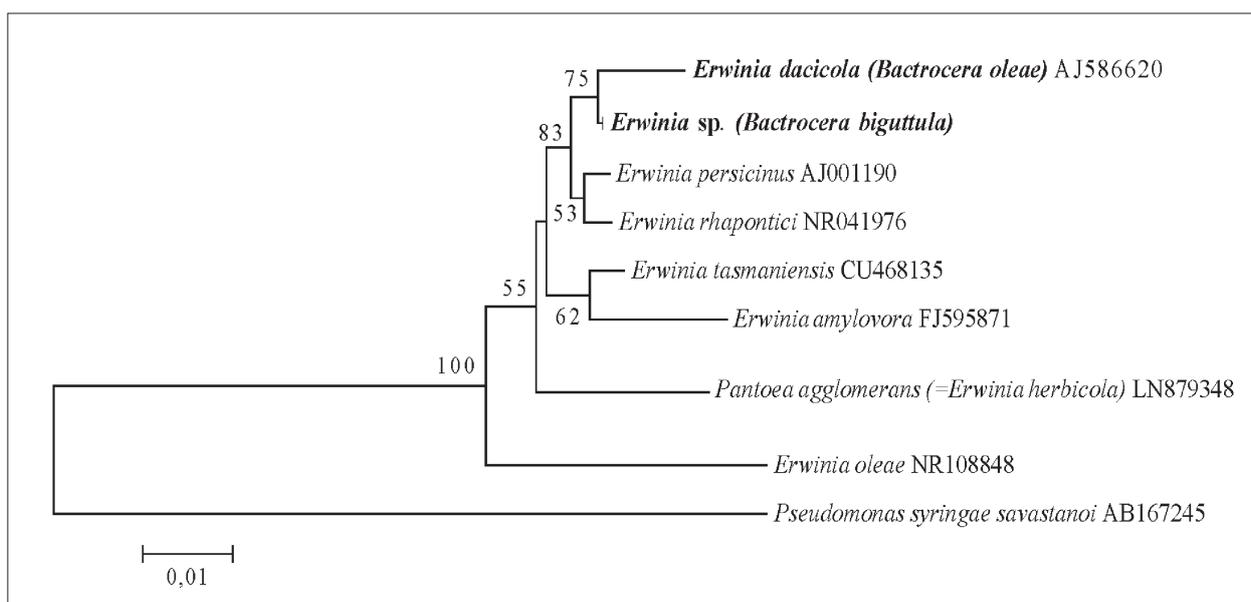


Fig. 1 – Relazioni filogenetiche di *Erwinia dacicola* con i principali e affini taxa *free-living* appartenenti al genere *Erwinia* e con *Erwinia* sp. da *Bactrocera biguttula*. Come outgroup è riportato *Pseudomonas syringae savastanoi* ritenuto l'agente causale della rogna dell'olivo. Maximum Composite Likelihood method.

netica, i batteri di *B. biguttula* si dimostrano i più affini a *E. dacicola* (dati non pubblicati) (Fig. 1). COPELAND *et al.* (2004) individuano, all'interno del sottogenere *Daculus* Speiser, il “Gruppo Oleae”, un gruppo di quattro specie del genere *Bactrocera* associate al frutto delle Oleaceae. A tale gruppo, oltre a *B. oleae*, appartengono *B. biguttula*, *B. cogani* e *B. munroi*. La presenza nel bulbo esofageo di *B. biguttula* di *Erwinia* sp. affine a *E. dacicola* apre intriganti scenari per future indagini volte a far luce sulla possibile esistenza di un complesso di batteri simbiotici monofiletici e coevoluti, appartenenti al genere *Erwinia*, ma specifici per il gruppo di specie di *Bactrocera* gravitanti intorno alle Oleaceae. Tali conoscenze potrebbero diventare uno strumento molto importante adatto da una parte a comprendere la filogenesi del “Gruppo Oleae” e la dibattuta origine geografica di *B. oleae* e dall'altra a datare l'inizio del rapporto simbiotico.

ERWINIA DACICOLA NEL MEDITERRANEO

Grazie allo sviluppo delle tecniche di analisi molecolari SAVIO *et al.* (2012), hanno studiato il 16S rRNA batterico del bulbo esofageo di oltre 300 esemplari di *B. oleae* appartenenti a 26 popolazioni scelte in modo da rappresentare più o meno omogeneamente l'intero areale italiano dell'olivo spontaneo e/o coltivato.

L'analisi delle sequenze ottenute (781 bp) ha evidenziato, oltre che la presenza di *E. dacicola* in tutti gli esemplari studiati, la presenza esclusiva di due aplotipi del simbiote che differiscono tra di loro per tre siti di mutazione associati. I due aplotipi, denominati aplotipo A (GenBank HQ667588) e aplotipo B (GenBank HQ667589), sono stati rinvenuti rispettivamente nel 43% e nel 57% degli esemplari analizzati. L'esistenza di soli due aplotipi è stata confermata estendendo l'analisi del 16S rRNA a 1280 bp in 43 adulti (di cui 21 con aplotipo A e 22 con aplotipo B).

Tale analisi ha consentito tuttavia di evidenziare altri due ulteriori siti di mutazione, portando quindi a 5 i punti di mutazione per i quali differiscono i due aplotipi A e B di *E. dacicola* (Fig. 2). Parallele indagini sul 23S rRNA (761 bp) hanno permesso di evidenziare che questa regione non presenta invece siti di mutazione che permettano di distinguere i due aplotipi individuati nel 16S rRNA (GenBank HQ667590). Inoltre, il clonaggio in seguito a PCR, eseguito su alcuni esemplari, non ha mai evidenziato la coesistenza dei due aplotipi, o la presenza di aplotipi intermedi, nel medesimo bulbo esofageo.

I due aplotipi rinvenuti hanno dimostrato di essere presenti entrambi nelle popolazioni di *B. oleae* indagate ma in diversi rapporti e apparentemente senza una definita struttura geografica con l'esclusione delle due isole maggiori nelle quali sorprendentemente è stato rinvenuto solo l'aplotipo A in Sardegna e solo l'aplotipo B in Sicilia.

Successive e più estese indagini sono state compiute dal gruppo di ricerca su 50 popolazioni di *B. oleae* raccolte nell'areale dell'olivo attraverso l'intero bacino del Mediterraneo (17 paesi) (VIALE, 2014). Nello stesso lavoro sono state analizzate tre ulteriori popolazioni di provenienza extra-mediterranea: una asiatica (Pakistan), una africana (Sudafrica) e una americana (California) dove *B. oleae* è stata recentemente introdotto. Ancora una volta, in Italia, in tutto il bacino del Mediterraneo oltre che in Sudafrica e in California, i risultati hanno evidenziato la presenza di *E. dacicola* con i due aplotipi A e B descritti da Savio *et al.* (2012). Un terzo aplotipo (aplotipo C) è stato individuato esclusivamente nella popolazione di *B. oleae* raccolta in Pakistan. Tale aplotipo risulta filogeneticamente più vicino all'aplotipo B avendo con quest'ultimo una unica base di differenza (Tab. 1; Fig. 2). Dal punto di vista della distribuzione sul territorio, i dati rivelano una significativa struttura genetica degli aplotipi del simbiote nelle popolazioni studiate (SAMOVA). La distribuzione geografica degli aplo-

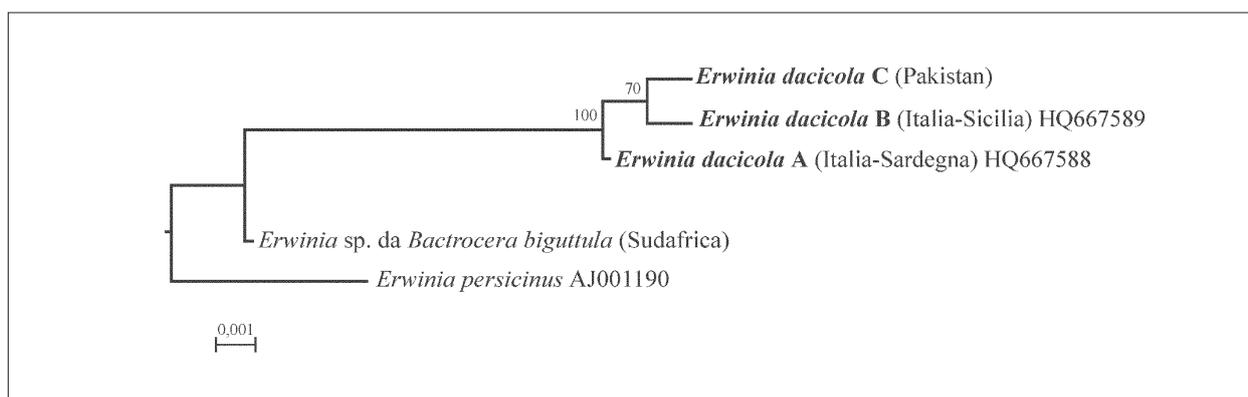


Fig. 2 – Relazioni filogenetiche tra i tre aplotipi di *Erwinia dacicola* individuati ed *Erwinia* sp. da *Bactrocera biguttula*. Come outgroup è riportato *Erwinia persicinus* che risulta la specie batterica *free-living* filogeneticamente più affine. Maximum Composite Likelihood method.

Tab. 1 – Mutazioni nel 16S rRNA per le quali differiscono i tre aplotipi di *Erwinia dacicola* (1240 bp).

Aplotipo	Posizione				
	11	282	657	943	945
A	C	C	G	C	T
B	T	T	A	A	A
C	T	T	G	A	A

tipi di *E. dacicola* evidenzia infatti la tendenza quasi esclusiva, della maggior parte delle popolazioni in *B. oleae*, raccolte nel Mediterraneo occidentale e in Sudafrica ad ospitare l’aplotipo A (Algeria, Marocco, Penisola Iberica, Francia, Corsica e Sardegna). Al contrario, l’aplotipo B ad eccezione dell’isola di Creta, appare nettamente predominante nella parte sud-orientale del Mediterraneo (Tunisia, Egitto, Israele, Cipro, Turchia) oltre che nella popolazione originaria della California mentre Italia, Slovenia, Croazia e Grecia sembrano ospitare entrambe le linee di *E. dacicola* in proporzioni diverse (Fig. 3).

I risultati ottenuti dagli studi sulla variabilità genetica di *E. dacicola* hanno aperto una serie di interrogativi e hanno consentito di ipotizzare una probabile antica separazione tra le tre linee individuate (A, B e C). È interessante notare che la distribuzione geografica dei tre aplotipi di *E. dacicola* sembra sovrapporsi bene ai gruppi genetici individuati da NARDI *et al.* (2010) che suddivide *B. oleae* in una popolazione africana considerata il centro di differenziazione della specie, una popolazione pakistana considerata una

popolazione relitto di antica separazione, già definita da SILVESTRI (1916) var. *asiatica* e infine una popolazione mediterranea, geneticamente suddivisa in tre sottogruppi: orientale, centrale e occidentale. Tale corrispondenza si presta a speculazioni circa la possibile origine ed epoca di separazione delle tre linee di *E. dacicola* individuate. La distribuzione dei tre aplotipi potrebbe infatti essere il risultato prima della antica separazione basale dell’olivo selvatico nelle tre linee (africana, asiatica e mediterranea) che viene fatto risalire ad inizio Pliocene e poi delle ripetute frammentazioni dell’areale mediterraneo in differenti stazioni di rifugio avvenuta nel corso del Pleistocene (BESNARD *et al.*, 2002; 2007; NARDI *et al.*, 2010) che hanno costretto popolazioni di *B. oleae* a lunghi periodi di isolamento geografico. È evidente, alla luce di questi risultati, come la presenza di un modello di trasmissione verticale per il simbiote di *B. oleae* possa rendere lo studio genetico di *E. dacicola* una fase fondamentale per la comprensione della storia evolutiva e della genetica di popolazione dell’insetto ospite.

IMPORTANZA DI ERWINIA DACICOLA
NEGLI ALLEVAMENTI DI *BACTROCERA OLEAE*

Negli anni 60, sull’entusiasmo dei primi risultati positivi, numerose ricerche sono state indirizzate all’applicazione della tecnica del “maschio sterile” per il controllo di specie dannose ed in Europa in par-

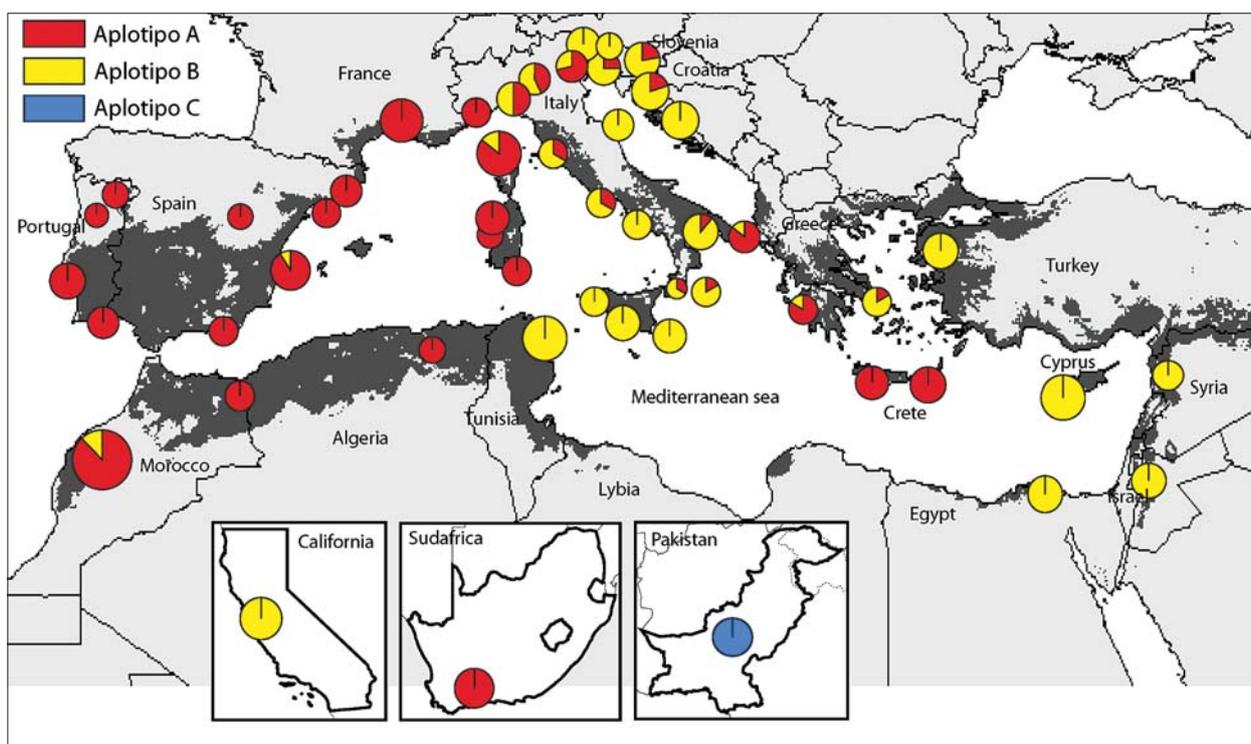


Fig. 3 – Variabilità genetica di *Erwinia dacicola* nel bacino del Mediterraneo ed in tre campionamenti puntiformi extra-mediterranei (dati non pubblicati). In grigio scuro la potenziale distribuzione dell’olivo nel Mediterraneo (da OTEROS, 2014, modificata).

ticolare contro i tefritidi. Le tecniche di allevamento hanno pertanto conosciuto un momento di grande interesse, anche grazie ai successi nell'allevamento in massa su substrati artificiali di *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). Notevoli difficoltà sono state invece incontrate nei confronti di *B. oleae*, il cui primo insoddisfacente allevamento su substrati artificiali è stato messo a punto negli anni '60 (HAGEN, 1966); già nella relativa pubblicazione è riportato come le difficoltà incontrate fossero imputabili alla perdita del battere simbionte (ritenuto *P. savastanoi*) che nei substrati viene sostituito da microrganismi acidofili.

Nel tentativo di sopperire alla perdita dei simbionti mediante substrati larvali ricchi e tecniche appropriate sono stati messi a punto numerosi allevamenti di *B. oleae* insoddisfacenti per la scarsa vitalità degli adulti ottenuti, tra l'altro incapaci di completare lo sviluppo su oliva. Negli allevamenti di *B. oleae* il microrganismo simbionte viene perduto anche con il semplice contatto delle uova con l'acqua di raccolta o successivamente per la presenza di antifermentativi nei substrati artificiali di allevamento larvale.

Successivamente è stato osservato che le masse batteriche meso-intestinali descritte da Petri in realtà sono costituite da un nucleo secreto nel bulbo esofageo attorno al quale si moltiplicano i batteri; tali agglomerati sono presenti, oltre che in *B. oleae*, anche in tutte le altre Dacinae e Trypetinae e soprattutto in assenza di batteri conservano la forma del bulbo esofageo e sono comunque visibili all'interno della membrana peritrofica (GIROLAMI, 1973). Le masserelle sono prodotte in *B. oleae* al ritmo di una decina al giorno con un inevitabile sacrificio metabolico per

l'adulto (Fig. 4) (PISCEDDA e GIROLAMI, 2005). Ne consegue che la presenza rinnovata di nuclei per la moltiplicazione dei batteri nel lume intestinale deve corrispondere ad un vantaggio per la sopravvivenza degli adulti pena una compromessa vitalità degli stessi. A differenza di *B. oleae*, i tefritidi facilmente allevabili nei substrati artificiali, non possiedono simbionti coevoluti e sono capaci di acquisire dall'ambiente, filloplano in particolare, i batteri in grado poi di moltiplicarsi nell'intestino. I numerosi tentativi di coltivare *E. dacicola*, al fine di ripristinare la simbiosi negli allevamenti, non hanno sinora avuto successo.

Le nuove acquisizioni sulla simbiosi di *B. oleae* e dei tefritidi, le moderne tecniche molecolari e di microscopia avanzata e i progressi della chimica analitica, fanno intravedere ulteriori prospettive nelle possibilità di successo di coltivazione di *E. dacicola*. Si aprirebbero così nuovi orizzonti sulle possibilità di allevare adulti fecondi e vitali di *B. oleae* anche su substrati artificiali e di metter a punto allevamenti massali.

RIASSUNTO

La presenza di una simbiosi ereditaria in *Bactrocera oleae* è stata descritta da Petri (1909) che ha evidenziato la presenza di un bulbo esofageo ospitante batteri poi regolarmente scaricati in masse compatte nel mesointestino. Nel 2005 questo simbionte è stato geneticamente caratterizzato, ne è stata studiata la sua filogenesi e quindi designato come *Candidatus Erwinia dacicola* (Enterobacteriaceae). Inoltre, è stato definito non coltivabile a causa del fallimento dei tentativi di coltura ex-situ sui principali terreni di coltura. Recentemente, è stata evidenziata la presenza di tre differenti aplotipi con



Fig. 4 – Agglomerati membranosi nel lume del primo tratto meso-intestinale in adulti di *Bactrocera oleae*.

una distribuzione geografica nel bacino del Mediterraneo che risulta non casuale. Il rinvenimento di batteri appartenenti al genere *Erwinia* nel bulbo esofageo di *B. biguttula* evidenzia la propensione di *Bactrocera* "Gruppo Oleae" ad ospitare batteri appartenenti a questo genere.

Al fine di ottenere individui vitali, negli allevamenti massali di *B. oleae*, risulta ad oggi fondamentale la permanenza di *Ca. E. dacicola* la quale però viene facilmente persa principalmente per la presenza di agenti antimicrobici e sostituita da batteri acidofili. I primi allevamenti di massa su dieta artificiale sono stati tentati negli anni '60 quando il simbionte era stato identificato come *Pseudomonas savastanoi*.

Le nuove acquisizioni sulla simbiosi in *B. oleae* e sui tefritidi in generale, anche grazie alle moderne tecniche molecolari, lasciano intravedere possibilità di successo nei tentativi di coltivazione dei simbionti in vitro.

BIBLIOGRAFIA

- BEATTIE G.A., 2007 – *Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent avances*. In: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Netherlands, pp. 1-56.
- BESNARD G., KHADARI B., BARADAT P., BERVILLÉ A., 2002 – *Olea europaea (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism*. - *Theor. Appl. Genet.*, 104: 1353-1361.
- BESNARD G., RUBIO DE CASAS R., VARGAS P., 2007 – *Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (Olea europaea)*. - *J. Biogeogr.*, 34: 736-752.
- BUCHNER P., 1965 – *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. New York: Interscience.
- Capuzzo C., Firrao G., Mazzon L., Squartini A., Girolami V., 2005 - 'Candidatus *Erwinia dacicola*', a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 1641-1647.
- COPELAND R.S., WHITE I.M., OKUMU M., MACHERA M., WHARTON R.A., 2004 – *Insects associated with fruits of the Oleaceae (Asteridae, Lamiales) in Kenya, with special reference to the Tephritidae (Diptera)*. - *Bishop Mus. Bull. Entomol.*, 12: 135-164.
- DE VRIES E.J., BREEUWER J.A., JACOBS G., MOLLEMA C., 2001 – *The association of Western flower thrips, Frankliniella occidentalis, with a near Erwinia species gut bacteria: transient or permanent?* - *J. Invertebr. Pathol.*, 77: 120-128.
- Drew R.A.I., Courtice A.C., Teakle D.S., 1983 - *Bacteria as a natural source of food for ault of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae)*. *Oecologia*, 60: 279-284.
- Drew R.A.I., Lloyd A.C., 1989 - *Bacteria associated with Fruit Flies and their host plants*. In: Robinson A.S., Hooper G. (eds.): *Fruit Flies their Biology, Natural Enemies and Control*. World Crop Pest, Elsevier, Amsterdam, 3A: 131-140.
- ESTES A.M., HEARN D.J., BURRACK H.J., REMPOLAKIS P., PIERSON E.A., 2012 – *Prevalence of Candidatus Erwinia dacicola in wild and laboratory olive fruit fly populations and across developmental stages*. - *Environ. Entomol.*, 41: 265-274.
- GIROLAMI V., 1973 – *Reperti morfo-istologici sulle batteriosimbiosi del Dacus oleae Gmelin e di altri ditteri tripetidi, in natura e negli allevamenti su substrati artificiali*. - *Redia*, 54: 269-294.
- GIROLAMI V., CAVALLORO R., 1972 – *Aspetti della simbiosi batterica di Dacus oleae (Gmelin) in natura e negli allevamenti di laboratorio*. - *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 8: 561-571.
- HAGEN K.S., 1966 – *Dependence of the olive fly, Dacus oleae, larvae on symbiosis with Pseudomonas savastanoi for the utilization of olive*. - *Nature*, 209: 423-424.
- HARADA H., OYAIZU H., KOSAKO Y., ISHIKAWA H., 1997 – *Erwinia aphidicola, a new species isolated from pea aphid, Acyrthosiphon pisum*. - *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43: 349-354.
- HELLMUTH H., 1956 – *Untersuchungen zur Bakteriensymbiose der Trypetiden (Diptera)*. - *Z. Morphol. Oekol. Tiere*, 44: 438-517.
- KOUNATIDIS I., CROTTI E., SAPOUNTZIS P., SACCHI L., RIZZI A., CHOUAIA B., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D. & altri, 2009 – *Acetobacter tropicalis is a major symbiont of the olive fruit fly (Bactrocera oleae)*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 3281-3288.
- LIU B., LUO J., LI W., LONG X.F., ZHANG Y.Q., ZENG Z.G., TIAN Y.Q., 2016 – *Erwinia teleogrylli sp. nov., a bacterial isolate associated with a chinese cricket*. - *PloS one*, 11: e0146596.
- MAZZINI M., VITA G., 1981 – *Identificazione submicroscopica del meccanismo di trasmissione del batterio simbiote in Dacus oleae (Diptera, Trypetidae)*. - *Redia*, 64: 277-301.
- MAZZON L., MARTINEZ-SAÑUDO I., SIMONATO M., SQUARTINI A., SAVIO C., GIROLAMI V., 2010 – *Phylogenetic relationships between flies of the Tephritinae subfamily (Diptera, Tephritidae) and their symbiotic bacteria*. - *Mol. Phylogenet. Evol.*, 56, 312-326.
- MAZZON L., PISCEDDA A., SIMONATO M., MARTINEZ-SAÑUDO I., SQUARTINI A., GIROLAMI V., 2008 – *Presence of specific symbiotic bacteria in flies of the subfamily Tephritinae (Diptera Tephritidae) and their phylogenetic relationships: proposal of 'Candidatus Stammerula tephritidis'*. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 1277-1287.
- MORETTI C., HOSNI T., VANDEMEULEBROECKE K., BRADY C., DE VOS P., BUONAURO R., CLEENWERCK I., 2011 – *Erwinia oleae sp. nov., isolated from olive knots caused by Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61: 2745-2752.
- NARDI F., CARAPPELLI A., BOORE J.L., RODERICK G.K., DALLAI R., FRATI F., 2010 – *Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes*. - *Mol. Phylogenet. Evol.*, 57: 678-686.
- OTEROS J., 2014 – *Modelización del ciclo fenológico reproductor del olivo* (Tesi di Dottorato). University of Córdoba, Córdoba, Spain.
- PETRI L., 1909 – *Ricerche sopra i batteri intestinali della Mosca olearia*. Memorie della Regia Stazione di Patologia vegetale, pp. 1-129.
- PISCEDDA A., GIROLAMI V., 2005 – *Ghiandola faringea e produzione di agglomerati membranosi nei tefritidi: prima quantificazione in Bactrocera oleae (Gmelin)*. *Proceedings XX Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*. Perugia 13-18 Giugno, pp. 50.
- SACCHETTI P., GRANCHIETTI A., LANDINI S., VITI C., GIOVANETTI L., BELCARI A., 2008 – *Relationships between the olive fly and bacteria*. - *J. Appl. Entom.*, 132: 682-689.
- SAVIO C., MAZZON L., MARTINEZ-SAÑUDO I., SIMONATO M., SQUARTINI A., GIROLAMI V., 2012 – *Evidence of two lineages of the symbiont 'Candidatus Erwinia dacicola' in Italian populations of Bactrocera oleae (Rossi) based on*

- 16S rRNA gene sequences*. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 62: 179-187.
- SILVA F.J., MORET A., NEEF A., BELDA E., 2008 – *Bacterial microbiota associated with a Bactrocera oleae population from eastern Spain*. In: First Meeting of TEAM, Palma de Mallorca 7–8th April, abstract book, vol. 15. Ed. by M.A. Miranda-Chueca. Mallorca: Universitat de les Illes Balears.
- SILVESTRI F., 1916 – *Prima notizia sulla presenza della mosca delle olive e di un parassita di essa in India*. - Rend. Accad. Naz. Lincei 25, 424.
- VIALE E., 2014 – *Symbiotic bacteria inhabiting tephritid flies: a worldwide specific interaction*. Tesi di Dottorato. Università degli Studi di Padova.
- VIALE E., MARTINEZ-SAÑUDO I., BROWN J.M., SIMONATO M., GIROLAMI V., SQUARTINI A., BRESSAN A., FACCOLI M., MAZZON L., 2015 – *Pattern of association between endemic Hawaiian fruit flies (Diptera, Tephritidae) and their symbiotic bacteria: Evidence of cospeciation events and proposal of “Candidatus Stammerula trupaneae”*. - Mol. Phylogenet. Evol., 90: 67-79.
- WALERON M., WALERON K., PODHAJSKA A.J., ŁOJKOWSKA E., 2002 – *Genotyping of bacteria belonging to the former Erwinia genus by PCR-RFLP analysis of a recA gene fragment*. - Microbiology, 148: 583-595.

LE SIMBIOSI BATTERICHE NELLA MOSCA DELLE OLIVE, *BACTROCERA OLEAE*: DALLA RICERCA DI BASE ALLO SVILUPPO DI NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO

PATRIZIA SACCHETTI (*) - ANNA LISCIA (**) - ROBERTA PASTORELLI (***) - GAIA BIGIOTTI (*)
ROBERTO GUIDI (*) - ANTONIO BELCARI (*)

(*) Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze; e-mail: patrizia.sacchetti@unifi.it

(**) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari

(***) Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia (CREA-ABP), Firenze.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

Bacterial symbioses in the olive fruit fly, Bactrocera oleae: from basic research to new control strategies development

Recent and previous studies have shown that the olive fly, *Bactrocera oleae* houses in the alimentary canal a symbiotic bacterial community such as *Candidatus Erwinia dacicola*, and other bacterial species that are acquired by the fly as food source. In this paper we report the results of a research on the effects of probiotic diets on some physiological parameters of *B. oleae* reared on artificial substrate. Further, the study of the complex relationships that the fly establishes with phylloplane bacteria has allowed us to develop an attractant, obtained from an epiphytic bacterium, that showed a marked attractiveness towards females of *B. oleae*. The subsequent isolation and identification of volatile compounds emitted from bacterial filtrate, enabled a first and positive assessment in behavioral and electrophysiological bioassays, that open perspectives for the development of new attractants as possible tools in control strategies based on attract and kill techniques in area-wide olive systems.

KEY WORDS: probiotic diets, longevity, fecundity, attractants, bacterial VOCs

PREMESSA

La mosca delle olive, *Bactrocera oleae* presenta due tipi di simbiosi con i batteri: una più stretta, legata alla presenza di *Candidatus Erwinia dacicola* (CAPUZZO *et al.*, 2005; SACCHETTI *et al.*, 2008) la cui presenza in tratti specializzati del canale alimentare assicura la sopravvivenza delle giovani larve nelle drupe in via di maturazione, e una simbiosi occasionale, con specie batteriche ubiquitarie di cui la mosca si ciba sul filloplano dell'olivo. La presenza pressoché costante di *Ca. Erwinia dacicola* nelle mosche selvagge è stata evidenziata in molti areali olivicoli del mondo (ESTES *et al.*, 2009; BEN-YOSEF *et al.*, 2010; ESTES *et al.*, 2012a), mentre nelle colonie di laboratorio la specie non riesce a sopravvivere a causa degli antibiotici e antifungini presenti nella dieta artificiale. Nonostante non si possano quantificare gli effetti della presenza batterica sugli adulti della mosca, paragonando sia la durata della vita delle mosche selvagge rispetto a quelle di laboratorio come anche la fecondità, si può affermare che il batterio permetta alle mosche di metabolizzare fonti azotate altrimenti non disponibili e, di conseguenza, abbia ripercus-

sioni benefiche sulla fitness degli adulti (BEN-YOSEF *et al.*, 2014). La possibilità di allevare il dittero in assenza di antibiotici (REMPOULAKIS *et al.*, 2014) ha reso ipotizzabile il trasferimento del batterio simbiote dalle popolazioni selvagge ai ceppi di laboratorio, allevati su dieta artificiale. In attesa di sviluppare ricerche finalizzate al trasferimento di *Ca. Erwinia dacicola*, si è pensato di somministrare alle colonie di laboratorio una dieta a base di batteri definita "probiotico" e valutarne gli effetti su alcuni parametri fisiologici del dittero.

Per quanto concerne le simbiosi temporanee che la mosca instaura con i batteri epifiti, si ipotizza che i batteri emettendo sostanze odorose siano in grado di attrarre gli adulti verso questa sorgente trofica. Precedenti osservazioni hanno dimostrato che la Pseudomonadacea *Pseudomonas putida* (BELCARI *et al.*, 2003; SACCHETTI *et al.*, 2008) è una specie batterica ricorrente nel canale alimentare di individui selvaggi e sul filloplano dell'olivo. Su queste basi, si è ipotizzato che gli adulti di *B. oleae* si nutrano di specie batteriche, analogamente a quanto è stato dimostrato in passato per le specie tropicali appartenenti al genere *Bactrocera* (DREW e LLOYD, 1989; VIJAYSEGARAN *et al.*, 1997).

Il batterio *P. putida* è stato quindi isolato da un adulto di *B. oleae* ed è stato coltivato su substrato artificiale per ottenere un “filtrato batterico”, da impiegare come attrattivo degli adulti. Nel presente lavoro si riportano risultati ottenuti in laboratorio riguardanti la possibilità di trasferire il batterio simbiote, unitamente alla valutazione degli effetti delle diete probiotiche sugli adulti della mosca. Inoltre, vengono riportati i risultati di prove effettuate in campo per la valutazione dell’attrazione del filtrato batterico nei confronti degli adulti di *B. oleae*, unitamente a indagini comportamentali, elettrofisiologiche e morfologiche.

EFFETTO DI DIETE PROBIOTICHE SULLA FITNESS DEGLI ADULTI

Sono state condotte prove di laboratorio su una colonia di mosche delle olive allevata in condizioni artificiali per valutare l’eventuale effetto di batteri somministrati con la dieta, sulla fisiologia e, in modo particolare, sulla longevità e sulla fecondità (SACCHETTI *et al.*, 2014). Le prove sono state condotte su gruppi omogenei di adulti mantenuti in condizioni standard di laboratorio. Le mosche sono state alimentate per tutta la durata della loro vita con solo zucchero o con zucchero con l’aggiunta di batteri, con la dieta standard o con la dieta standard addizionata del probiotico. Per quanto concerne la longevità degli adulti, effetti negativi del probiotico si sono evidenziati a carico dei maschi, mentre verso le femmine l’aggiunta di batteri ai differenti tipi di dieta non ha determinato alcun cambiamento (tab. 1). La fecondità, al contrario, sembra essere notevolmente influenzata dall’aggiunta del probiotico, che ha determinato un aumento medio del numero di uova deposte, specialmente nelle femmine alimentate con zucchero.

Ulteriori esperimenti sono stati poi condotti, con diete probiotiche contenenti batteri vivi o uccisi col calore, utilizzando *P. putida* e *Acetobacter tropicalis*, quest’ultimo in particolare è stato indicato come il principale simbiote della mosca delle olive (KOUNATIDIS *et al.*, 2009). Anche in questo caso, le diete addizionate con batteri sia vivi sia uccisi dal calore non hanno

mostrato effetti evidenti sulla longevità degli adulti (Fig. 1). Le mosche alimentate con la dieta completa, in generale, sono vissute più a lungo e la riduzione del 50% della popolazione è stata osservata dopo 13 giorni, mentre negli altri trattamenti il dimezzamento degli adulti è avvenuto 3-4 giorni prima. Inoltre bisogna rimarcare l’effetto decisamente negativo causato dall’aggiunta del probiotico *A. tropicalis* sotto forma di colonie vive, che ha aumentato la mortalità delle mosche. Occorre tuttavia sottolineare che il parametro longevità non è così determinante per il successo degli allevamenti, infatti, la vita media degli adulti di *B. oleae* è molto più breve in confronto alle mosche selvatiche e la fecondità massima si verifica tra l’ottavo e il decimo giorno di vita (REMPLOULAKIS *et al.*, 2014).

In effetti, osservando i risultati ottenuti nella valutazione della fecondità (Fig. 2), il picco di deposizione delle uova con la dieta completa è stato registrato intorno al decimo giorno, mentre nelle tesi con i probiotici il numero medio di uova per femmina è ridotto e decresce sensibilmente durante il periodo di osservazione.

Questi risultati sembrano in contrapposizione con quanto osservato in precedenza, tuttavia sono stati osservati effetti diversi a seconda del periodo in cui sono state condotte le prove, pertanto occorrerà indagare ulteriormente questi aspetti. Le osservazioni condotte, comunque permettono di escludere che *A. tropicalis* possa essere impiegato nelle diete probiotiche e rinforzano la motivazione di approfondire la ricerca sulle possibilità di trasferire *Ca. E. dacicola* ai ceppi di laboratorio.

IL FILTRATO BATTERICO E L’ATTRAZIONE VERSO GLI ADULTI DELLA MOSCA

In una ricerca condotta anni fa furono isolate, nel canale alimentare della mosca delle olive, numerose specie batteriche appartenenti alle famiglie delle Enterobacteriacee e Pseudomonadacee (BELCARI *et al.*, 2003). La mosca si nutre di questi batteri presenti sul filloplano (SACCHETTI *et al.*, 2008) ed è stato dimostrato come la mosca sia attratta dalle sostanze volatili emesse da un filtrato batterico (SACCHETTI *et al.*, 2007) (Fig. 3). Lo stesso filtrato batterico è stato ottenuto dalla crescita su substrato di cultura di *P. putida*, la stessa specie somministrata agli insetti adulti (vedi quanto sopra discusso). Questa specie batterica è stata isolata più volte nelle mosche selvatiche e nel filloplano per cui si è ipotizzato che fosse una delle specie di cui la mosca si nutre in natura. Prove più recenti volte a dimostrare l’attrazione del filtrato batterico nei confronti degli adulti di *B. oleae* lo confermano come una fonte di nuove sostanze vola-

Tab. 1 – Effetti sulla longevità e sulla fecondità di *B. oleae* di diete addizionate di probiotici a base di *P. putida* in confronto a solo zucchero e dieta completa.

tipo di dieta	probiotico	effetti sulla longevità		effetti sulla fecondità
		maschi	femmine	femmine
zucchero	no	-	=	=
	sì	-	=	+
dieta completa	no	+	+	+
	sì	+	=	+

Fig.1 – Effetto sulla longevità di *B. oleae* di diete addizionate di probiotici a base di colonie di *Acetobacter tropicalis* o *Pseudomonas putida* vive o uccise col calore, in confronto a solo zucchero e dieta completa.

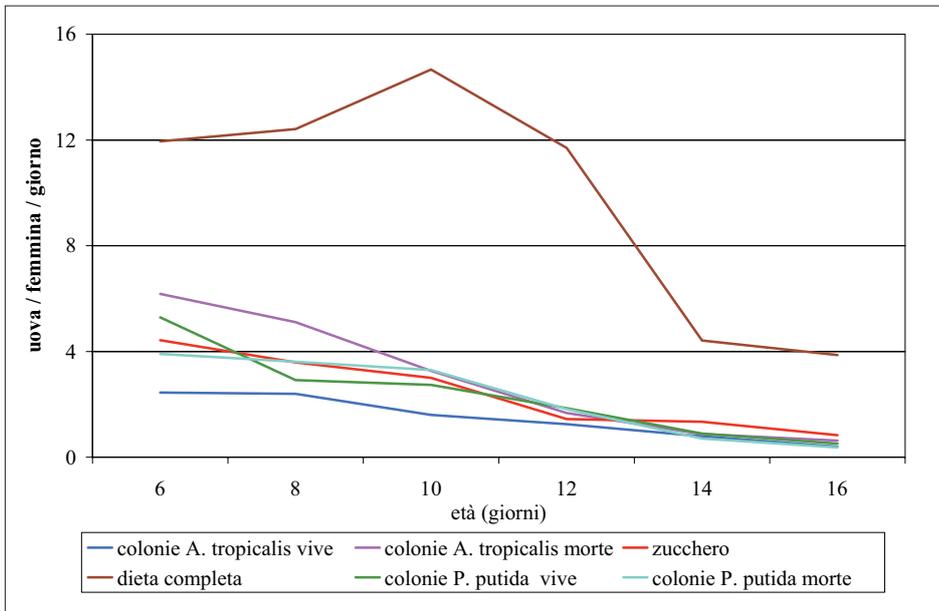
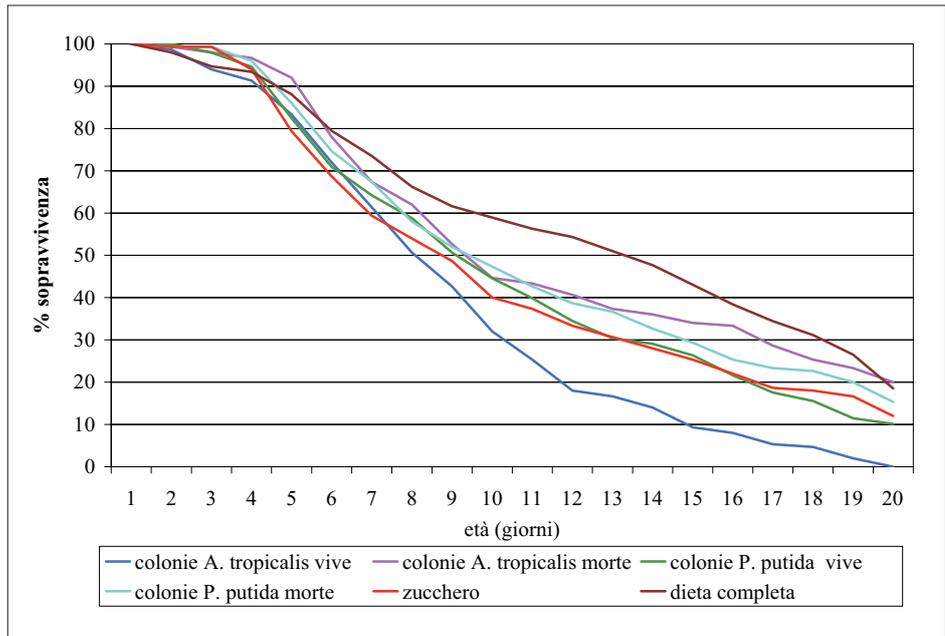
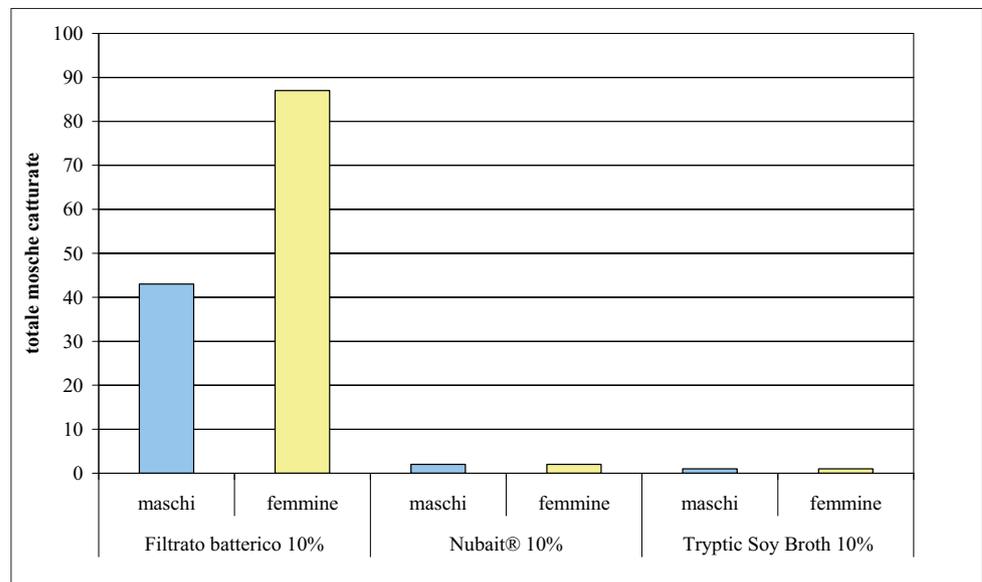


Fig. 2 – Effetto sulla fecondità di *B. oleae* di diete addizionate di probiotici a base di colonie di *A. tropicalis* o *P. putida* vive o uccise col calore, in confronto a solo zucchero e dieta completa.

Fig. 3 – Maschi e femmine di *B. oleae* catturati in totale in trappole innescate con filtrato di *P. putida*, substrato di crescita (TSB) ed esca Nubait® alla stessa concentrazione del 10% (trappole esposte per un giorno, 9 repliche).



tili, attrattive soprattutto nei confronti delle femmine (Fig. 4).

Le sostanze volatili emesse dal filtrato batterico sono state poi oggetto di una indagine condotta mediante gascromatografia. Le analisi del filtrato batterico, comparate con il substrato di crescita del batterio (Trypone Soy Broth - TSB), hanno evidenziato differenze nella presenza di alcuni composti, soprattutto contenenti zolfo, riconducibili fondamentalmente all'attività del batterio. Durante la ricerca si è valutato anche l'eventuale potere attrattivo di alcune di queste sostanze nei confronti degli adulti della mosca. A tale scopo, sono state effettuate indagini comportamentali e elettrofisiologiche su mosche esposte a differenti tipi di sostanze volatili quali: il filtrato batterico e alcuni composti di origine batterica come il metil tiolacetato (LISCIA *et al.*, 2013). I biosaggi comportamentali e le analisi elettrofisiologiche hanno dimostrato come tali odori producano risposte positive negli adulti di mosca. Infatti, i biosaggi condotti in tunnel del vento hanno evidenziato una pronunciata risposta verso il filtrato batterico rispetto al sub-

strato di crescita, in entrambi i sessi; allo stesso modo, i test elettrofisiologici hanno messo in evidenza che il filtrato batterico produce risposte elettroantennografiche (EAG) soprattutto nelle femmine e nei maschi accoppiati. Infine, è stata condotta anche un'indagine elettrofisiologica sui palpi delle mosche che, sorprendentemente, ha dimostrato una correlazione diretta dose-risposta a diverse sostanze volatili e in particolar modo al metil tiolacetato che, come già detto, è un componente presente nel filtrato batterico prodotto dall'attività metabolica di *P. putida*. Indagini condotte sulla morfologia antennale di *B. oleae* hanno poi messo in evidenza come nel flagello siano presenti quattro tipi di sensilli: tricoidi, basiconici corti, clavati e di tipo "grooved" cioè con la parete cuticolare solcata da formazioni digitiformi (Fig. 5). Tutte le tipologie di sensillo individuate presentano la superficie porosa, che come noto è correlabile con una funzione chemorecettiva olfattoria. Nei palpi mascellari si è evidenziata la presenza di sensilli basiconici multipli (Fig. 6) che giustifica la risposta olfattiva a dosi crescenti di metil tiolacetato.

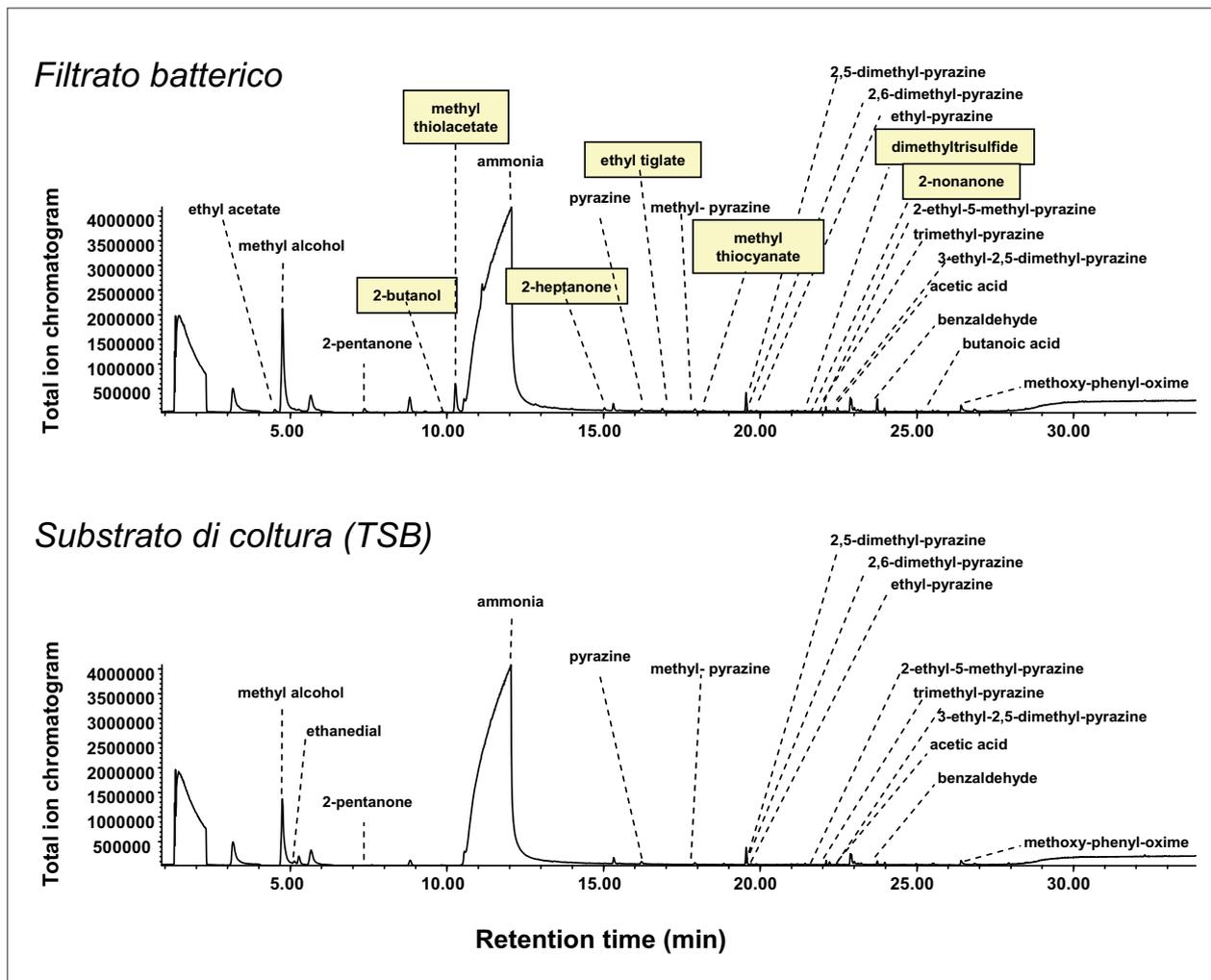


Fig. 4 – Cromatogrammi delle sostanze volatili identificate nello spazio di testa del filtrato di *P. putida* e del substrato di crescita (TSB). Sono evidenziati i composti derivanti dal metabolismo batterico.

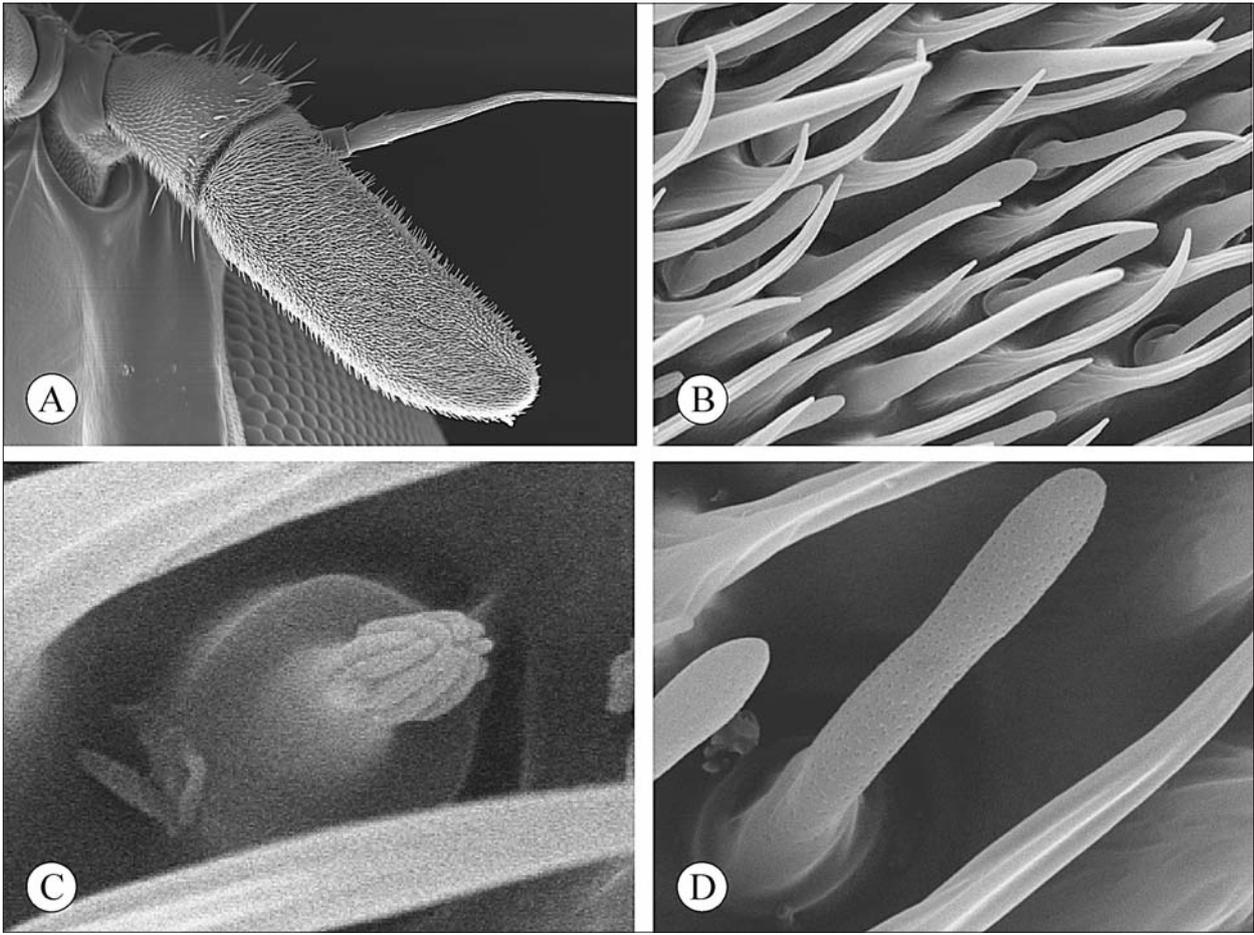


Fig. 5 – Foto al microscopio elettronico a scansione delle antenne di *B. oleae*: antenna in toto (A); ingrandimento del funicolo con i diversi tipi di sensillo tricoide, basiconico e clavato (B); sensillo multiporo con formazioni cuticolari digitiformi (grooved) (C); sensillo basiconico multiporo a forte ingrandimento (D).

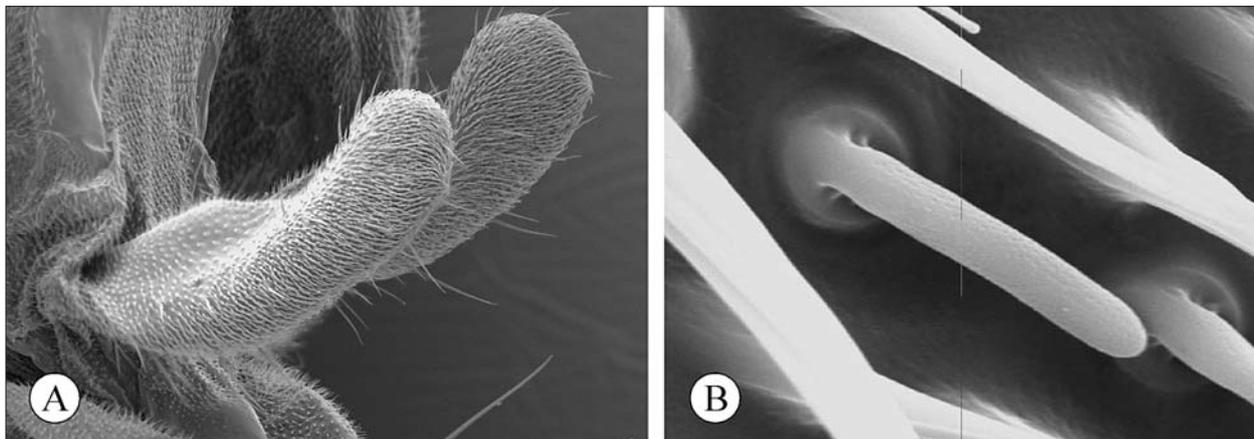


Fig. 6 – Foto al microscopio elettronico a scansione dei palpi di *B. oleae*: palpi in toto (A) e sensillo basiconico multiporo (B).

CONCLUSIONI

Man mano che le conoscenze sull'ecologia microbica della mosca delle olive aumentano, si delineano sempre più nuovi campi di indagine e nuovi spunti per l'applicazione di strategie di lotta più efficaci e rispettose dell'ambiente. La possibilità di applicare la tecnica SIT (Sterile Insect Technique) nei confronti

di *B. oleae* passa necessariamente, in una prima fase, attraverso l'ottimizzazione delle tecniche di allevamento (ESTES *et al.*, 2012b). La possibilità di aumentare la fitness degli adulti e degli stadi giovanili costituisce uno degli obiettivi prioritari per la produzione massiva degli adulti destinati alla sterilizzazione. Per questo, l'uso di sostanze probiotiche unitamente alla possibilità di trasferire *Ca. Erwinia*

dacicola alle popolazioni allevate su diete artificiali, può sicuramente garantire dei miglioramenti negli allevamenti in termini di maggiore produzione di uova e aumento della longevità degli adulti, determinando così ripercussioni positive in termini di abbassamento dei costi di produzione. La ricerca in questo campo attende ancora tuttavia di essere perfezionata.

Per quanto concerne l'aspetto relativo alla messa a punto di nuovi attrattivi basati su sostanze volatili di origine batterica, occorrerà in seguito valutare i composti presenti nel filtrato batterico che hanno dimostrato un forte potere attrattivo in laboratorio e testarli quindi in campo. Se le risposte, in termini di catture di femmine e di maschi, saranno paragonabili o superiori agli attrattivi attualmente disponibili (sali di ammonio) tali sostanze potranno essere usate per potenziare i dispositivi commerciali oggi in uso per migliorare l'efficacia delle tecniche "attract and kill" che, come noto, rivestono un notevole interesse per il loro scarso impatto ambientale in una moderna gestione biologica e integrata dell'agroecosistema olivo.

RIASSUNTO

Ricerche condotte in passato e indagini più recenti hanno dimostrato che la mosca delle olive ospita nel canale alimentare un batterio simbiote, *Candidatus Erwinia dacicola*, e altre specie batteriche che vengono acquisite dall'ambiente esterno come fonte di cibo.

In questo articolo si riferiscono i risultati di una ricerca volta a valutare gli effetti di diete probiotiche su alcuni parametri fisiologici di adulti di *B. oleae* allevati su un substrato artificiale. L'aggiunta di un probiotico a base del batterio *Pseudomonas putida* ha prodotto effetti negativi sulla longevità dei maschi, mentre ha incrementato la fecondità delle femmine. Successivamente, somministrando diete addizionate con batteri, vivi o uccisi con trattamento termico, non sono stati osservati effetti positivi sulla longevità degli adulti anzi, l'aggiunta del batterio *Acetobacter tropicalis* sotto forma di colonie vive, ha determinato un aumento della loro mortalità.

Altre ricerche, condotte sulle relazioni tra la mosca delle olive e i batteri epifiti, hanno permesso di sviluppare, a partire da *P. putida*, un filtrato batterico che ha indotto una marcata risposta verso le femmine di *B. oleae*. Biosaggi comportamentali hanno evidenziato come le sostanze volatili emesse dal filtrato batterico producano risposte positive negli adulti della mosca delle olive. Infine, sono state condotte indagini morfologiche ed elettrofisiologiche che hanno permesso l'identificazione di sensilli, presenti sulle antenne e sui palpi di *B. oleae*, coinvolti nelle risposte elettrofisiologiche ad alcuni composti di origine batterica, tra cui il metil tiolacetato, che ha indotto una risposta a dose crescente. La scoperta di nuove sostanze attrattive apre nuove prospettive per lo sviluppo di strategie di controllo della mosca delle olive, basate sulle tecniche attract and kill, efficaci a livello territoriale.

BIBLIOGRAFIA

BELCARI A., SACCHETTI P., MARCHI G., SURICO G., 2003 – *La mosca delle olive e la simbiosi batterica*. Inf. Fitopatol., 53: 55-59.

- BEN-YOSEF M., AHARON Y., JURKEVITCH E., YUVAL B., 2010 – *Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion*. - P. Roy. Soc. B-Biol. Sci., 277: 1545-1552.
- BEN-YOSEF M., PASTERNAK Z., JURKEVITCH E., YUVAL B., 2014 – *Symbiotic bacteria enable olive flies (Bactrocera oleae) to exploit intractable sources of nitrogen*. - J. Evolution. Biol., 27: 2695-2705.
- CAPUZZO C., FIRRAO G., MAZZON L., SQUARTINI A., GIROLAMI V., 2005 – *Candidatus Erwinia dacicola', a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly Bactrocera oleae (Gmelin)*. - Int. J. Syst. Evol. Micr., 55: 1641-1647.
- DREW R.A.I., LLOYD A.C., 1989 – *Bacteria associated with fruit flies and their host plants*. In: Fruit Flies their biology, natural enemies and control, World Crop Pest, Robinson A.S. & Hooper G. eds., Elsevier, Amsterdam, 3A: 131-140.
- ESTES A.M., HEARN D.J., BRONSTEIN J.L., PIERSON E.A., 2009 – *The olive fly endosymbiont, "Candidatus Erwinia dacicola" switches from an intracellular existence to an extracellular existence during host insect development*. - Appl. Environ. Microb., 75(22): 7097-7106.
- ESTES A.M., HEARN D.J., BURRACK H.J., REMPOULAKIS P., PIERSON E.A., 2012a – *Prevalence of Candidatus Erwinia dacicola in wild and laboratory olive fruit fly populations and across developmental stages*. - Environ. Entomol., 41, 265-274.
- ESTES A.M., NESTEL D., BELCARI A., JESSUP A., REMPOULAKIS P., ECONOMOPOULOS A.P., 2012b – *A basis for the renewal of sterile insect technique for the olive fly, Bactrocera oleae (Rossi)*. - J. Appl. Entomol., 136, 1-16.
- KOUNATIDIS I., CROTTI E., SAPOUNTZIS P., SACCHI L., RIZZI A., CHOUAIA B., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D., MAVRAGANI-TSIPIDOU P., BOURTZIS K., 2009 – *Acetobacter tropicalis is a major symbiont of the olive fruit fly (Bactrocera oleae)*. - Appl. Environ. Microb., 75: 3281-3288.
- LISCIA A., ANGIIONI P., SACCHETTI P., PODOGHE S., GRANCHIETTI A., SETZU M.D., BELCARI A., 2013 – *Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate*. - J. Insect Physiol., 59: 705-716.
- REMPOLAKIS P., DIMOU I., CHRYSARGYRIS A., ECONOMOPOULOS A.P., 2014 – *Improving olive fruit fly Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae) adult and larval artificial diets, microflora associated with the fly and evaluation of a transgenic olive fruit fly strain*. - Int. J. Trop. Insect Sci., 34: S114-S122.
- SACCHETTI P., GHIARDI B., GRANCHIETTI A., STEFANINI F.M., BELCARI A., 2014 – *Development of probiotic diets for the olive fly: evaluation of their effects on fly longevity and fecundity*. Ann. Appl. Biol., 164: 138-150.
- SACCHETTI P., GRANCHIETTI A., LANDINI S., VITI C., GIOVANETTI L., BELCARI A., 2008 – *Relationship between the olive fly and bacteria*. J. Appl. Entomol., 132, 682-689.
- SACCHETTI P., LANDINI S., GRANCHIETTI A., CAMERA A., ROSI M.C., BELCARI A., 2007 – *Attractiveness to the olive fly of Pseudomonas putida isolated from the foregut of Bactrocera oleae*. IOBC/wprs Bull. 30: 37-42.
- VIJAYSEGARAN, S., WALTER, G.H., DREW R.A.I., 1997 – *Mouthpart structure, feeding mechanisms, and natural food sources of adult Bactrocera (Diptera: Tephritidae)*. Ann. Entomol. Soc. Am., 90: 184-201.

CONTENIMENTO NATURALE DI *BACTROCERA OLEAE* (ROSSI): CLIMA O PARASSITOIDI? CONFRONTO TRA WESTERN CAPE (SUD AFRICA) E SICILIA

VIRGILIO CALECA (*) - CHRISTIAN GIACALONE (*) - MATTEO MALTESE (*) - FRANCESCO TORTORICI (*)

(*) Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo, Viale delle scienze, Edificio 5, 90128 Palermo; email: virgilio.caleca@unipa.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 19 febbraio 2016.

Natural environmental control of Bactrocera oleae (Rossi): climate or parasitoids? A comparison between the Western Cape of South Africa and Sicily

Bactrocera oleae (Rossi), the olive fruit fly is considered not a continuously serious pest of olive trees in the Western Cape of South Africa, in spite of the climate similar to Mediterranean areas. South African braconid parasitoids of *B. oleae* are more numerous than in Mediterranean areas, and until now their action has been considered the factor lowering the level of infestation due to the olive fruit fly, but no deep studies on its infestation levels and climatic factors influencing them were carried out in the past. Analyzing recent data on infestation levels collected in the Western Cape and Sicily, they appear similar in a regular mid-summer, differing at the end of summer-beginning of autumn, when in Sicily the climate becomes more humid than in the Western Cape. A comparison of climatic data regarding four years underlines that Somerset West and Franshhoek, in comparison with Trapani, have significantly lower minimum daily temperatures, a higher daily thermal excursion and a lower relative humidity in the last three months preceding harvesting.

Parasitization rates on *B. oleae* of Western Cape and Sicily, recorded on both cultivated and wild olives (*Olea europaea* subsp. *cuspidata* in South Africa, *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* in Sicily) are not substantially different, confirming that in South Africa three braconids, *Utetes africanus* (Szépligeti), *Psytalia lounsburyi* (Silvestri) and *Bracon celer* (Szépligeti), are the main parasitoids, with the first one as leader in wild olives and the last one as leader in cultivated ones, while in Sicily the braconid *Psytalia concolor* (Szépligeti) is the main parasitoid in both wild and cultivated olives. Nevertheless parasitism on *B. oleae* doesn't reach effective levels of control in both regions.

The climate, instead of parasitization due to braconids, is the main environmental factor limiting the olive fruit fly infestations in the Western Cape of South Africa.

The introduction of parasitoids specific to the olive fruit fly is necessary in new invaded areas where they lack, but the attempt of providing them a more available amount of host fruits along the year, planting olive trees bearing fruits up to spring, could bring serious problems as those typical of Mediterranean areas where the European wild olive naturally grows.

KEY WORDS: olive fruit fly, braconids, relative humidity, daily thermal excursion, parasitoids alternative hosts.

INTRODUZIONE

Già dai primi anni del secolo scorso la constatazione che, in un'area a clima mite come il Western Cape del Sud Africa, le infestazioni di *Bactrocera oleae* (Rossi) erano molto minori di quelle registrate negli areali mediterranei ha suscitato molto interesse negli entomologi agrari che nel bacino del Mediterraneo cercavano di limitare le infestazioni del tefritide.

In una lettera del 1909 C.P. Lounsbury (citata da SILVESTRI, 1913) affermava che *B. oleae* era stata già riscontrata in Sud Africa sull'olivo selvatico (*Olea europaea* subsp. *cuspidata*), mentre "sui pochi olivi coltivati era passata inosservata per non aver arrecato mai alcun danno". Lo stesso SILVESTRI (1913) scriveva "molto probabilmente la poca frequenza della mosca delle olive in quella regione si deve agli insetti che la combattono. Questi fatti giustificano la spe-

ranza che, introducendo e acclimatando in Italia i parassiti africani del *Dacus oleae*, si possa riuscire ad ottenere la riduzione della mosca delle olive a quantità trascurabile".

E infatti Silvestri credendo molto in questa soluzione introdusse immediatamente numerosi parassitoidi. Dalle olive selvatiche sudafricane spedite dal Lounsburyi dalla Colonia del Capo (attuale Western Cape) sfarfallarono sei diversi parassitoidi che SILVESTRI (1913) rilasciò in Calabria e Puglia dal 1910 al 1912, senza che si sia poi registrato un loro insediamento. Qualche anno dopo SILVESTRI (1914) rilasciò nell'Italia meridionale cinque parassitoidi della mosca delle olive sfarfallati da materiale proveniente dall'Eritrea, anche stavolta senza una successiva notizia di avvenuta acclimatazione.

Da allora fino ad oggi l'azione di un maggior numero di braconidi e altri parassitoidi della mosca delle olive

in Sud Africa è stata ancora considerata una logica spiegazione dei bassi livelli d'infestazione del dittero registrati in quest'area (NEUENSCHWANDER, 1982; MONACO, 1976; MKIZE *et al.*, 2008). Anche le recenti rivisitazioni bibliografiche sugli insetti potenzialmente dannosi all'olivo in Sud Africa considerano la mosca delle olive un insetto non particolarmente dannoso, ad esclusione delle aree più umide, legando ciò alla positiva influenza dell'intenso controllo biologico dovuto ai parassitoidi (ANNECKE e MORAN, 1982; COSTA, 1998; ADDISON *et al.*, 2015).

Tra gli entomologi mediterranei, e anche americani, è diffusa la convinzione che i più efficaci nemici naturali della mosca delle olive, soprattutto braconidi, siano proprio in Sud Africa, e più in generale nell'Africa sub-sahariana.

Infatti, all'arrivo della mosca delle olive in California, considerata la mancanza di efficaci agenti di controllo biologico locali, sono stati iniziati programmi di controllo biologico classico che hanno poi visto il rilascio di *Psytalia humilis* (Silvestri) [inizialmente identificata come *P. concolor* (Szépligeti)] o *P. cf. concolor*, descritta da Silvestri da esemplari raccolti su *Ceratitis capitata* (Wiedemann) proveniente da Namibia e Kenia, e di *Psytalia lounsburyi* (Silvestri), proveniente da Kenia e Sud Africa (DAANE *et al.*, 2008; YOKOYAMA *et al.*, 2008; DAANE *et al.*, 2015).

Appare sorprendente che le radicate convinzioni che hanno portato a tali scelte, siano basate su ipotesi simili a quelle che aveva Silvestri nei primi decenni del secolo scorso, e che non siano suffragate da adeguati studi, né recenti né del passato, relativi all'olivo coltivato in Sud Africa, e mirati all'incidenza delle infestazioni di *B. oleae*, alla sua parassitizzazione, e ai fattori climatici di quella regione condizionanti lo sviluppo della mosca.

In questo lavoro bibliografico si sono confrontati dati relativi ad aree olivicole del Western Cape con quelli di aree con ricorrenti e intense infestazioni delle zone costiere della Sicilia, cercando di rispondere alle seguenti domande:

- I livelli d'infestazione di *B. oleae* su olivo coltivato in Western Cape e Sicilia sono molto differenti?
- Il clima delle due regioni è davvero così simile da lasciar presumere condizioni favorevoli alla mosca in entrambe le aree?
- Il livello di parassitizzazione di *B. oleae* è così differente tra Western Cape e Sicilia?

LIVELLI D'INFESTAZIONE DI *BACTROCERA OLEAE* NEL WESTERN CAPE E IN SICILIA, E CONFRONTO CLIMATICO

Alcuni dati sull'infestazione di *B. oleae* su olivo coltivato nel Western Cape si possono ricavare da

NEUENSCHWANDER (1982) che in sette località, a fine marzo-inizio aprile (corrispondenti ai nostri fine settembre-inizio ottobre) registrò livelli d'infestazione totale dal 5,5 al 35% (media 18,4%).

GIACALONE (2011) in otto oliveti non trattati di tre località del Western Cape (Somerset West, Franschhoek, Wellington) ha registrato infestazioni totali di *B. oleae* da 0 a 9% (media 3,2%) nel 2009, e dal 3 al 10% (media 6,3%) nel 2010.

Confrontando i parametri climatici più influenti sulle popolazioni di *B. oleae* (temperatura e umidità relativa dell'aria) e le relative infestazioni tra i differenti siti, si nota che i due siti del Western Cape (Somerset West e Franschhoek) in entrambi gli anni manifestano simile andamento climatico e simili livelli d'infestazione, mentre il confronto tra il sito di Trapani e i due siti sudafricani evidenzia in questi ultimi una maggiore escursione termica giornaliera, dovuta soprattutto a minori temperature minime, alte temperature nella prima decade di marzo (corrispondente al nostro settembre) e una minore umidità relativa in marzo, aprile e maggio (corrispondenti ai nostri settembre, ottobre e novembre). Questi fattori climatici mantengono le condizioni climatiche poco favorevoli alla crescita delle popolazioni di *B. oleae*, che si mantiene sotto il 10% d'infestazione totale, mentre a Trapani in entrambi gli anni raggiunge l'80% (Fig. 1). Tali differenze climatiche si registrano anche confrontando i dati dei tre siti relativi al periodo che va dal 2007 al 2010; le temperature massime dei tre siti non mostrano differenze statisticamente significative, mentre tali differenze si evidenziano tra le temperature minime, l'umidità relativa (Fig. 2) e l'escursione termica giornaliera (Fig. 3).

Che i parametri climatici giocano un ruolo fondamentale è dimostrato dalla minore infestazione (40%) registrata nello stesso sito di Trapani nel 2008, rispetto all'80% del 2009, a seguito delle alte temperature registrate nella prima decade di settembre e le minori piogge di settembre e ottobre.

PARASSITOIDI DI *B. OLEAE* E LORO LIVELLO DI PARASSITIZZAZIONE IN SUD AFRICA E SICILIA

Sud Africa

Su olivo coltivato la parassitizzazione di *B. oleae* è stata studiata meno che sull'olivo selvatico africano (*Olea europaea* subsp. *cuspidata*).

Nella breve permanenza in Sud Africa SILVESTRI (1913) ottenne da olive raccolte a Wellington, non si sa se selvatiche o coltivate, più parassiti che mosche, con il braconide ectofago *Bracon celer*: (Szépligeti) dominante sugli altri.

Per il Western Cape un dato numerico sul livello di parassitizzazione sull'olivo coltivato ci viene fornito

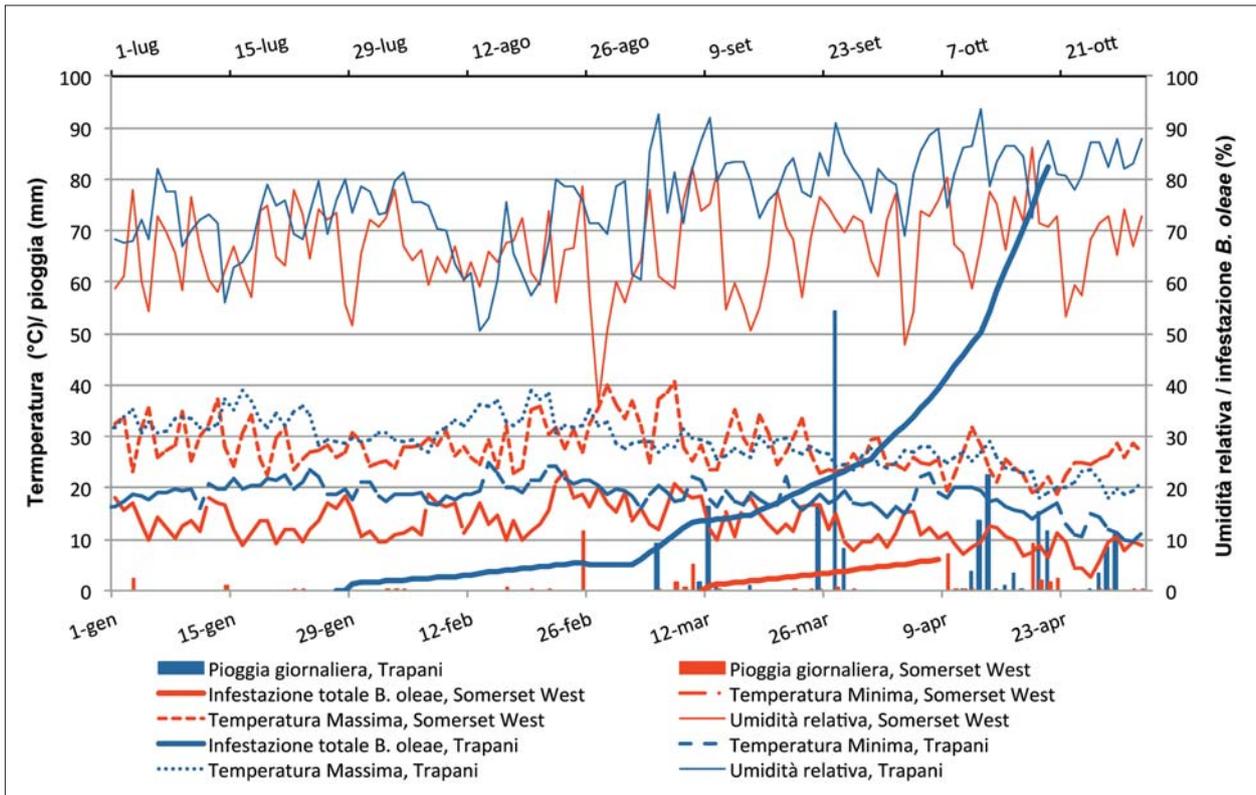


Fig. 1 – Confronto tra i parametri climatici e le infestazioni di *B. oleae* nei due siti di Trapani e Somerset West nel 2010; nell'asse orizzontale in alto i giorni dell'anno nell'emisfero boreale, in basso quelli dell'emisfero australe (da GIACALONE, 2011).

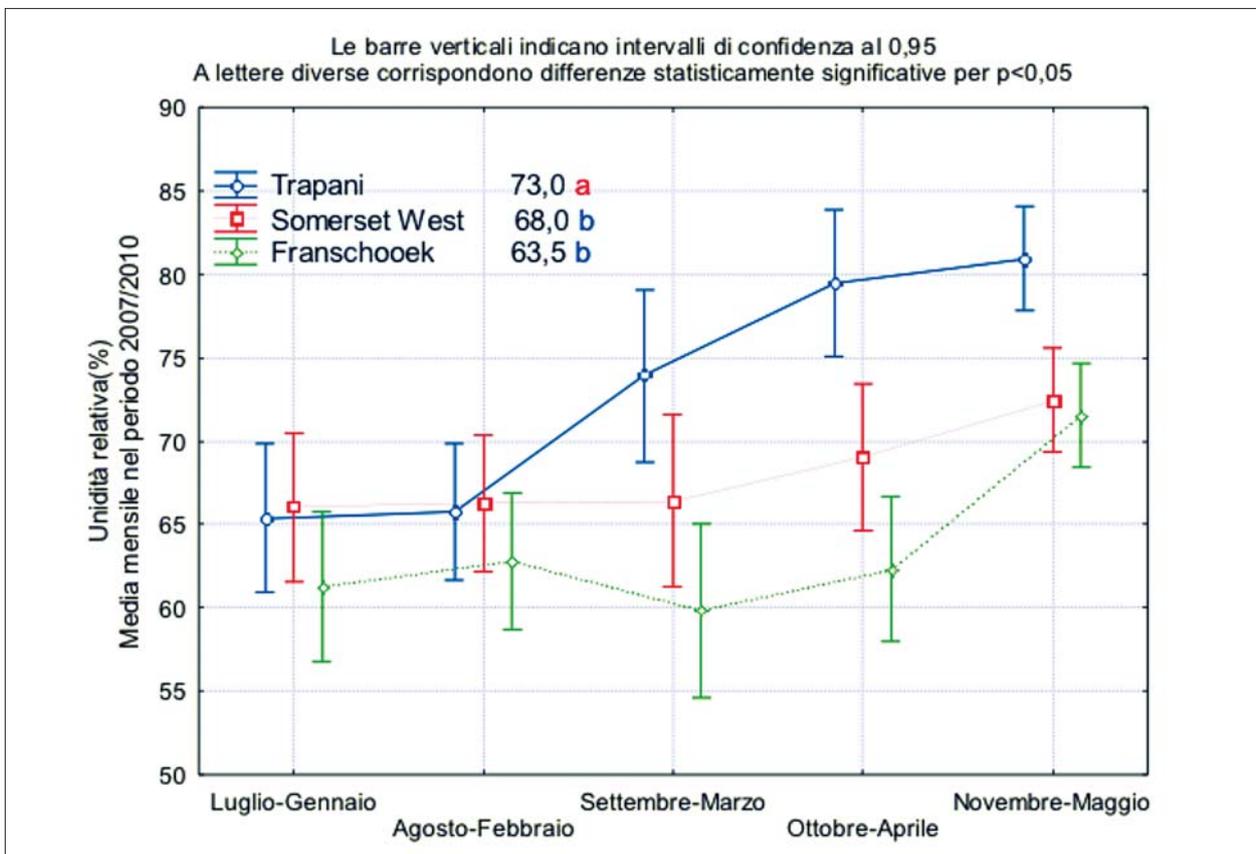


Fig. 2 – Confronto tra gli andamenti delle medie mensili dell'umidità relativa in Sicilia (Trapani) e nel Western Cape (Somerset West e Franschoek) nel periodo 2007/2010; il primo mese dell'etichetta si riferisce all'Italia, il secondo al Sud Africa (da GIACALONE, 2011).

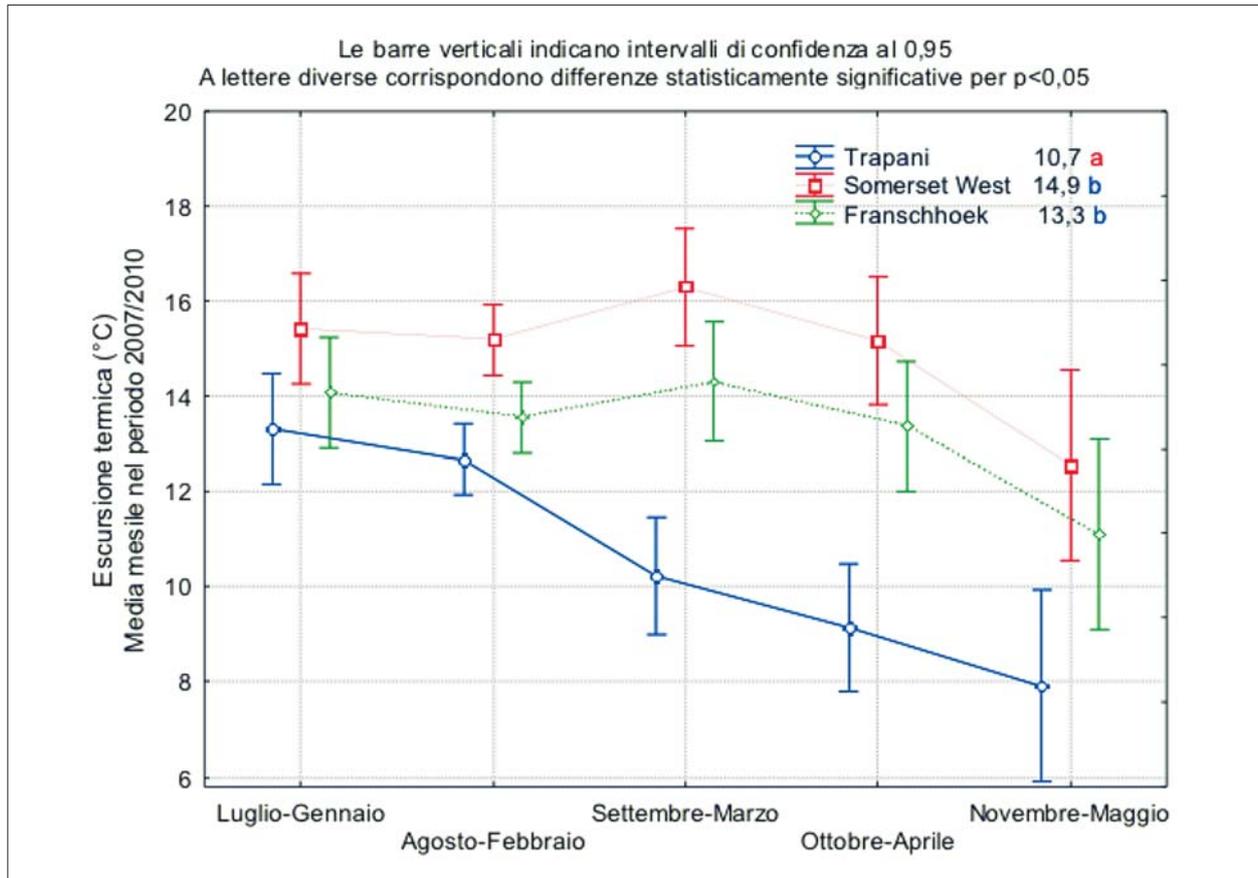


Fig. 3 – Confronto tra gli andamenti delle medie mensili dell’escursione termica giornaliera in Sicilia (Trapani) e nel Western Cape (Somerset West e Franschhoek) nel periodo 2007/2010; il primo mese dell’etichetta si riferisce all’Italia, il secondo al Sud Africa (da GIACALONE, 2011).

da NEUENSCHWANDER (1982), che dissezionando le olive registra che il 52% delle larve di *B. oleae* è parassitizzato. Il parassitoide che domina incontrastato è *Bracon celer* (98% dei parassitoidi), che tra tutti i braconidi parassitoidi di *B. oleae* in Sud Africa è quello con il più lungo ovopositore (2,9 mm secondo WANG *et al.*, 2009); appena rappresentati sono invece altri braconidi, stavolta endofagi, come *Psytalia dacicida* Silvestri, *Utetes africanus* (Szépligeti) e *Psytalia lounsburyi* (Silvestri). Il complesso parassitario riscontrato in questo lavoro non differisce molto da quello individuato da SILVESTRI (1913, 1914) e MONACO (1978).

Sempre nella stessa regione e dall’olivo coltivato, GIACALONE (2011) ottiene un basso numero di insetti sfarfallati, e qui *B. celer* ha registrato livelli pari a *P. lounsburyi* (Fig. 4).

Sull’olivo selvatico africano il parassitoide più abbondante ritrovato sia nel Western Cape da Giacalone (Fig. 5; 2011) che nell’Eastern Cape da MKIZE *et al.* (2008) è *Utetes africanus*, che tra i braconidi parassitoidi di *B. oleae* ha il più corto ovopositore (0,9 mm secondo WANG *et al.*, 2009). Nelle ricerche di NEUENSCHWANDER (1982) su olivo selvatico prevale invece *Psytalia lounsburyi* (lunghezza dell’ovopo-

sitore 1,8 mm, WANG *et al.* 2009) su *Bracon celer* e *U. africanus*.

E’ interessante notare come le drupe di olivo selvatico africano fanno registrare un’infestazione maggiore che sull’olivo coltivato sia nelle prove di GIACALONE (2011), rispettivamente 17,5% e 8,2% (Figg. 4 e 5), che in quelle di NEUENSCHWANDER (1982), 43,6% nel selvatico e 18% nel coltivato. Le drupe dell’olivo selvatico africano sono infestate anche da un altro tefritide, *Bactrocera biguttula* (Bezzi) molto più abbondante nell’Eastern Cape dove è risultato tre volte più abbondante di *B. oleae* (MKIZE *et al.*, 2008). Nell’olivo selvatico i parassitoidi sfarfallati potrebbero anche avere rapporti nutrizionali con *B. biguttula*, ma finora nessuno studio ha chiarito questo dubbio.

Sicilia

Il braconide *Psytalia concolor* (Szépligeti) è da considerarsi autoctono della Sicilia, a differenza di quanto sostenuto da DELUCCHI (1957) che lo considera introdotto in tutto il territorio italiano. Questo braconide descritto nel 1910 da materiale proveniente da Sousse (Tunisia), per lungo tempo noto quale unico parassitoide endofago della mosca delle olive nel Mediterraneo suscitò l’interesse di Silvestri che, dopo

Fig. 4 – Livello d’infestazione di *B. oleae* registrato dissezionando le drupe di olivo coltivato nel Western Cape nel 2009 e 2010, e parassitoidi sfarfallati (da GIACALONE, 2011).

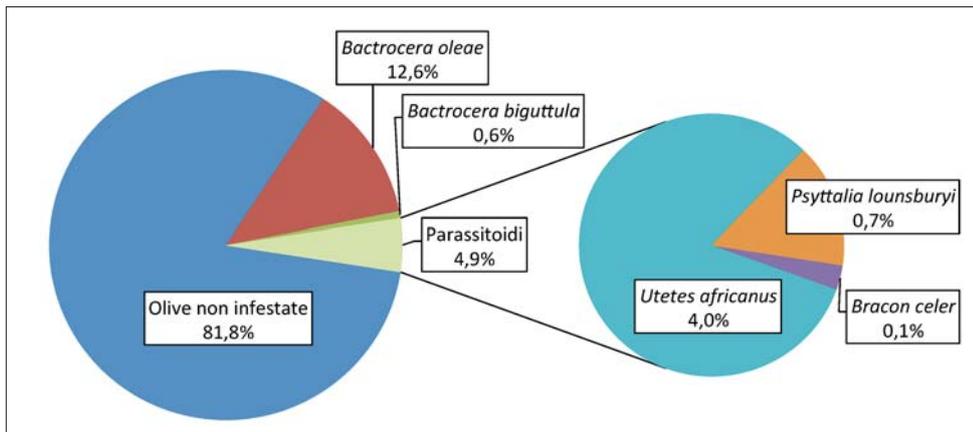
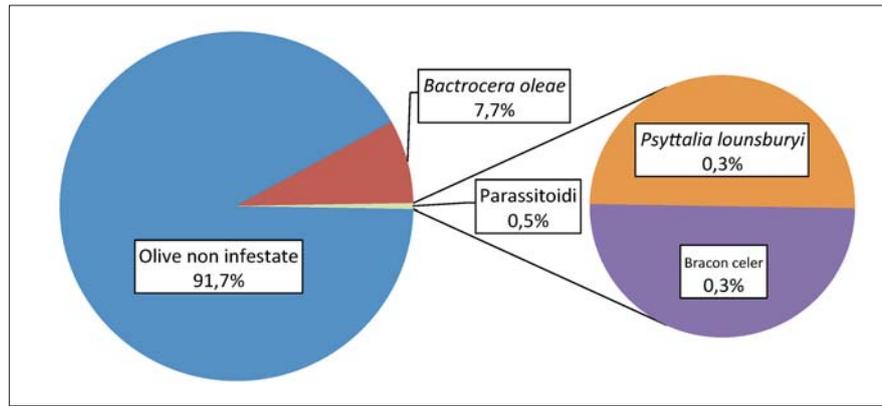


Fig. 5 – Livello d’infestazione di *B. oleae* registrato dissezionando le drupe di olivo selvatico nel Western Cape nel 2009 e 2010, e parassitoidi sfarfallati (da GIACALONE, 2011).

averlo introdotto in Campania, Puglia e Calabria settentrionale dal 1917 al 1923, nel 1929 liberò alcuni esemplari a Caltanissetta (SILVESTRI 1939). A seguito del rinvenimento di *P. concolor* nel 1930 sul litorale tirrenico siciliano da MONASTERO (1931), e poi nella Sardegna meridionale, lo stesso Silvestri (1939) lo considerò autoctono non solo del Nord Africa, ma anche della Sicilia, della Sardegna meridionale e della Calabria meridionale. In una recente revisione sistematica la specie sub-sahariana *Psyttalia humilis* (Silvestri), morfologicamente indistinguibile da *P. concolor*, è stata tolta dalla sinonimia con quest’ultima specie, e *P. concolor*, a causa dei pochi esemplari analizzati nel lavoro rimane con certezza legata alla mosca delle olive, all’area mediterranea (Italia, Marocco) e alle Canarie (RUGMAN-JONES *et al.* 2009), mentre altri ospiti e altre aree di diffusione andrebbero nuovamente indagati.

Su olivo coltivato MONASTERO (1940, 1960) registrò livelli di parassitizzazione di *P. concolor* con percentuali variabili: intorno al 40% (Altavilla Milicia, PA, nel 1930; Marsala, TP, nel 1933), medie del 10,3% nel 1934-35 (province di TP e ME), e medie del 2,7-3,7% nel 1959-60 (province di PA, TP, ME).

Sempre su olivo coltivato i calcidoidei parassitoidi ectofagi *Eurytoma martellii* Domenichini, *Pnigalio mediterraneus* Ferriere et Delucchi, *Cyrtotypx latipes* (Rondani) ed *Eupelmus urozonus* Dalman sono stati

riscontrati in scarse quantità sia alle Isole Eolie (MONASTERO e DELANOUE, 1966) che lungo la fascia tirrenica palermitana (LIOTTA e MINEO, 1968).

Un recente indagine realizzata da GIACALONE (2011) sia su olivo coltivato che su olivastro ha registrato un’infestazione di *B. oleae* sull’olivo coltivato del 74,6%, con una parassitizzazione del 16,3% quasi interamente dovuta a *P. concolor* (Fig. 6), mentre sull’olivastro l’infestazione di *B. oleae* è stata del 16,8%, con una parassitizzazione del 49% anche qui quasi totalmente dovuta a *P. concolor* (Fig. 7). Altri dati su olivastro sono stati raccolti da MINEO e BLANDO (2005) registrando simili livelli d’infestazione, una parassitizzazione del 49%, stavolta dovuta in gran parte a *Pnigalio mediterraneus* (42%).

CONCLUSIONI

Le differenze tra i livelli d’infestazione di *Bactrocera oleae* del Western Cape e della Sicilia, particolarmente marcate nell’olivo coltivato, sono attribuibili alle differenze climatiche: più basse temperature minime, maggiore escursione termica e, soprattutto nei tre mesi precedenti la raccolta, minore umidità relativa nel Western Cape (GIACALONE, 2011; GIACALONE *et al.*, 2015).

I dati pubblicati ci evidenziano un insufficiente

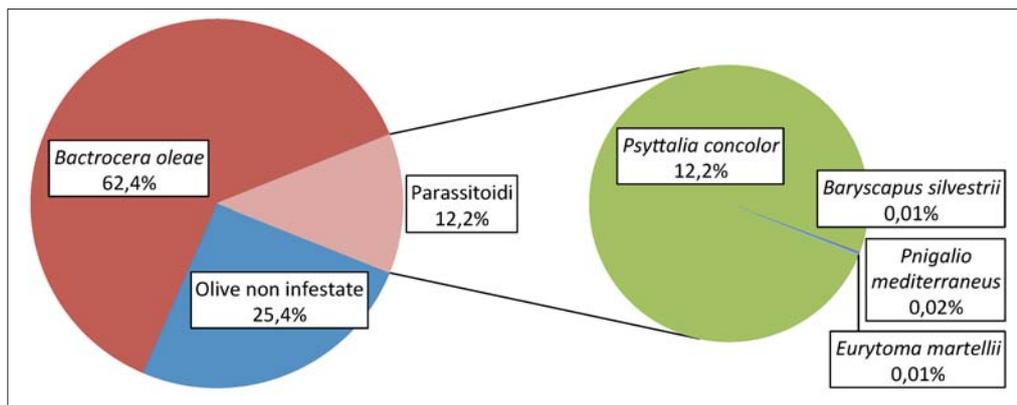


Fig. 6 – Carpofagi e parassitoidi sfarfallati da drupe di olivo raccolte in provincia di Trapani e Palermo da settembre a dicembre 2010 (150 campioni; GIACALONE, 2011).

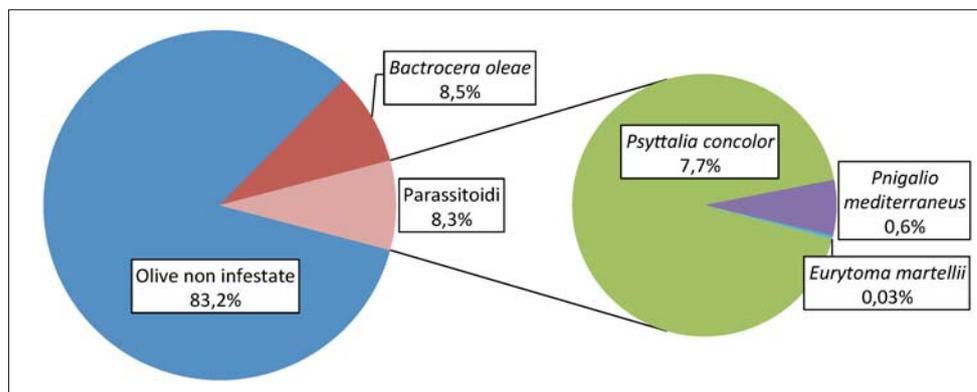


Fig. 7 – Carpofagi e parassitoidi sfarfallati da drupe di olivastro raccolte in provincia di Trapani e Palermo da settembre 2010 a febbraio 2011 (52 campioni; GIACALONE, 2011).

livello di controllo biologico dovuto ai parassitoidi sia nel Western Cape sia in Sicilia, con una maggiore parassitizzazione nei rispettivi olivi selvatici, entrambi con drupe piccole e polpa sottile, che favoriscono i parassitoidi specifici della mosca delle olive dotati di un ovopositore breve (al massimo 2,6 mm in *P. concolor*), che hanno invece difficoltà a raggiungere le larve di terza età nelle polpose olive coltivate. Tale difficoltà fu ipotizzata da LATIERE (1917) e SILVESTRI (1939), ed è stata recentemente dimostrata da WANG *et al.* (2009) e BASER *et al.* (2013). Infatti, nel Western Cape il parassitoide più abbondante sull'olivo coltivato è *Bracon celer*, dotato del più lungo ovopositore, peraltro considerato non molto specifico di *B. oleae*, mentre sull'olivo selvatico prevale *Utetes africanus*, con il più corto ovopositore tra i braconidi parassitoidi della mosca delle olive. Si conferma quindi che il controllo biologico naturale dovuto ai parassitoidi non è un efficiente fattore di controllo delle popolazioni dei tefritidi.

Alla luce delle suddette considerazioni, in assenza di parassitoidi autoctoni specifici, come in California, è sì utile aumentare il controllo biologico con l'introduzione di parassitoidi specifici come *Psytalia lounsburyi*, ma ci sentiamo di sconsigliare quanto ipotizzato da DAANE *et al.* (2015) per aumentare gli ospiti rifugio per il parassitoide; aumentare la disponibilità di ospiti per il parassitoide impiantando cultivar a differente maturazione che portino olive fino alla primavera fornirebbe una maggiore dispo-

nibilità di frutti anche alla mosca, con le nefaste note ripercussioni sulle infestazioni che abbiamo nelle zone pandacie del Mediterraneo, anche a causa della presenza dell'olivastro che ha proprio quelle caratteristiche di ospite rifugio per carpofagi e parassitoidi per un lungo periodo dell'anno.

RIASSUNTO

Bactrocera oleae (Rossi), mosca delle olive, è presente anche in Sud Africa, ma finora non si sono avute notizie di infestazioni economicamente rilevanti negli oliveti. L'accertata presenza di un maggior numero di braconidi parassitoidi della mosca delle olive rispetto alle aree mediterranee è stata ed è considerata da molti autori la principale causa di queste minori infestazioni, senza che però siano stati eseguiti in Sud Africa adeguati studi sulle infestazioni da *B. oleae* e sui fattori climatici delle aree interessate.

Analizzando recenti dati sui livelli d'infestazione di *B. oleae* registrati su olivo coltivato e selvatico nel Western Cape e in Sicilia, appaiono simili in una normale annata fino a metà estate, ma sono nettamente differenti a fine estate-inizio autunno, quando in Sicilia il clima diviene più umido. Da una puntuale analisi dei corrispondenti dati climatici registrati nelle due aree è infatti emersa una sostanziale differenza nel decorso più caldo e secco degli ultimi tre mesi precedenti la raccolta nel Western Cape; questo periodo invece in Sicilia è caratterizzato da temperature più fresche e un aumento dell'umidità relativa che favorisce l'impennata delle infestazioni di *B. oleae*. Nei quattro mesi presi in considerazione si rileva anche una significativa differenza nell'escursione termica, maggiore nel Western Cape, dovuta a minime notturne più basse.

Da un confronto dei livelli di parassitizzazione di *B. oleae* del Western Cape (Sud Africa) e dell'area costiera della

Provincia di Trapani, recentemente registrati su olivo coltivato e selvatico (*Olea europaea* subsp. *cuspidata* in Sud Africa, *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* in Sicilia) non sono emerse sostanziali differenze quantitative, pur confermando che in Sud Africa i principali parassitoidi sono tre braconidi (*Utetes africanus* (Szépligeti), *Psytalia lounsburyi* (Silvestri) e *Bracon celer* (Szépligeti)), con il primo prevalente sull'olivo selvatico e l'ultimo sul coltivato, mentre in Sicilia il braconide parassitoide *Psytalia concolor* (Szépligeti) prevale sia sull'olivo selvatico che sul coltivato. Comunque in entrambe le aree la parassitizzazione su *B. oleae* non raggiunge elevati ed efficaci livelli.

Il clima, e non la parassitizzazione dovuta ai braconidi, appare il più importante fattore di contenimento di *B. oleae* anche in Sud Africa.

L'introduzione di parassitoidi specifici della mosca delle olive è necessaria nelle aree colonizzate di recente dove essi mancano, ma i tentativi di fornir loro una maggiore disponibilità di larve dell'ospite mediante l'impianto di cultivar d'olivo a maturazione e permanenza dei frutti più differenziata, potrebbe produrre risultati certamente più negativi che positivi nei confronti della presenza e dei livelli d'infestazione di *B. oleae* sull'olivo coltivato, come avviene nelle aree pandemie dove cresce spontaneo l'olivastro.

BIBLIOGRAFIA

- ADDISON M.F., ADDISON P., BARNES B.N., 2015 – *Olive*. In: *Insects of Cultivated Plants and Natural Pastures in Southern Africa*. Prinsloo G.L., Uys V.M. Editors: 394-405.
- BASER N., CALECA V., SIMEONE V., LAMAJ F., VERRASTRO V., 2013 – *The effect of distance between parasitoid and host on the parasitism of Psytalia concolor (Szépligeti) in organic olive orchards*. - ISOFAR/MOAN International Symposium on "Crop Protection Management in Mediterranean Organic Agriculture", Book of Abstracts, Sousse, Tunisia 14-16 May 2013: 18. url:10447/78589
- DAANE K.M., SIME K.R., WANG X.G., NADEL H., JOHNSON M.W., WALTON V.M., 2008 – *Psytalia lounsburyi (Hymenoptera: Braconidae), potential biological control agent for the olive fruit fly in California*. - *Biological Control* 44:78-89.
- DAANE K.M., WANG X., NIETO D.J., PICKETT C.H., HOELMER K.A., BLANCHET A., JOHNSON M.W., 2015 – *Classic biological control of olive fruit fly in California, USA: release and recovery of introduced parasitoids*. - *BioControl* 60: 317-330.
- DELUCCHI, V. 1957 – *Les parasites de la mouche des olives*. - *Entomophaga* 2:107-118.
- GIACALONE C., 2011 – *Il controllo di Bactrocera oleae (Rossi) e di altri carpofagi negli oliveti biologici in Sicilia e Sud Africa*. - Tesi di dottorato. Dipartimento DEMETRA, Università degli Studi di Palermo: 147 pp. <https://iris.unipa.it/handle/10447/95135?mode=full.5#.WEg6ESiflUE>
- GIACALONE C., CALECA V., ALLSOPP E., 2015 – *Olive Fruit Fly: A threat to the South African olive industry?* - *South Africa Fruit Journal* 14 (4): 71-72.
- LATIERE H., 1917 – *La lutte contre les Maladies des Plantes en Italie* - *Ann. Service des Epiphyties*, 4: 76-114.
- LIOTTA G., MINEO G., 1968 – *Lotta biologica artificiale contro la mosca delle olive a mezzo dell'Opium concolor sculus Mon. in Sicilia nel 1968*. - *Bollettino dell'Istituto di Entomologia Agraria e dell'Osservatorio di Fitopatologia di Palermo*, 7 (65): 191-204.
- MKIZE N., HOELMER K.A., VILLET M.H., 2008 – *A survey of fruit-feeding insects and their parasitoids occurring on wild olives, Olea europaea ssp. cuspidata, in the Eastern Cape of South Africa*. - *Biocontrol Science and Technology* 18 (9-10): 991-1004.
- MINEO G., BLANDO S., 2005 – *I parassitoidi della mosca delle olive viventi sull'olivastro (Olea europea var. sylvestris Brot.) in Sicilia*. - *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, 37 (3): 235-239.
- MONACO R., 1978 – *Note sui parassiti del Dacus oleae Gmel. (Dipt.-Tephritidae) in Sud-Africa*. - *Atti XI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, 303-310.
- MONASTERO S., 1931 – *Un nuovo parassita endofago della mosca delle olive trovato in Altavilla Milicia (Sicilia) (Fam. Braconidae Gen. Opus)*. - *Atti R. Accade. Sci. Let Arti Palermo*, 16 (3): 1-7.
- MONASTERO S., 1940 – *Nuove osservazioni sull'"Opium sculus" parassita endofago della mosca delle olive*. - *Atti R. Accademia di Scienze, Lettere ed Arti di Palermo*. 1(1): 3-23.
- MONASTERO S. 1960 – *Altra straordinaria cattura di Opium parassiti di Dacus oleae Gmel. in Sicilia nel 1959*. - *Note di Fitopatologia*, n. 15, Aprile 1960: 8 pp.
- MONASTERO S., DELANOUE P., 1966 – *Lutte biologique expérimentale contre la mouche de l'olive (Dacus oleae Gmel.) au moyen d'Opium concolor Szépl. sculus Mon. dans les îles Éoliennes (Sicile) en 1965*. - *Entomophaga*, 11(5): 411-432.
- NEUENSCHWANDER P., 1982 – *Searching parasitoids of Dacus oleae (Gmel.) (Dipt. Tephritidae) in South Africa*. - *Z. ang. Ent.* n. 94: 509-522.
- RUGMAN-JONES P.F., WHARTON R., VAN NOORT T., STOUTHAMER R., 2009 – *Molecular differentiation of the Psytalia concolor (Szépligeti) species complex (Hymenoptera: Braconidae) associated with olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae), in Africa*. - *Biological Control* 49: 17-26.
- SILVESTRI F., 1913 – *Viaggio in Africa per cercare parassiti di mosche dei frutti*. - *Bollettino del Laboratorio di Zoologia generale e agraria della R. Scuola superiore d'agricoltura in Portici* 8: 1-164.
- SILVESTRI F., 1914 – *Viaggio in Eritrea per cercare parassiti della mosca delle olive*. - *Bollettino del Laboratorio di Zoologia generale e agraria della R. Scuola superiore d'agricoltura in Portici* 9: 185-226.
- Silvestri F., 1915 - *Contributo alla conoscenza degli insetti dell'olivo dell'Eritrea e dell'Africa meridionale*. - *Laboratorio di Zoologia generale e agraria della R. Scuola superiore d'agricoltura in Portici* 9: 239-334.
- SILVESTRI F., 1939 – *La lotta biologica contro le mosche dei frutti della famiglia Trypetidae*. - *Atti del VII Congresso Internazionale di Entomologia, Berlino, 15-20 Agosto 1938*: 2396-2418.
- WANG X.G., JOHNSON M.W., DAANE K.M., YOKOHAMA V.Y., 2009 – *Larger olive fruit size reduces the efficiency of Psytalia concolor, as a parasitoid of the olive fruit fly*. - *Biological Control*, 49: 45-51.
- YOKOYAMA V.Y., RENDON P.A., SIVINSKI J., 2008 – *Psytalia cf. concolor (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) in California*. - *Environmental Entomology* 37: 764-773.

