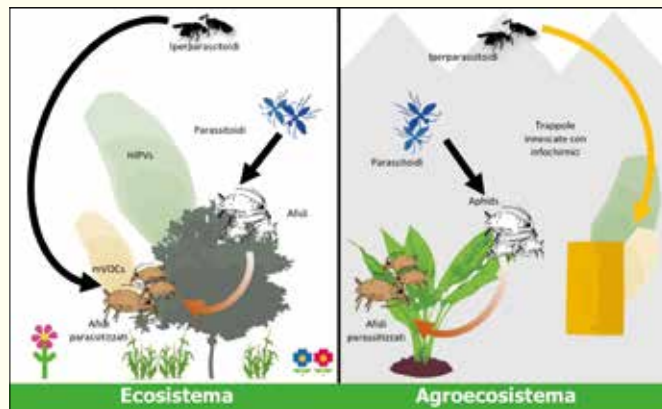




Tavole Rotonde sui maggiori problemi  
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia  
Sotto gli auspici del MIPAAF

## XLIV. CHEMICAL ECOLOGY IN INSECT PARASITOIDS



*Estratto da:*  
ATTI DELLA  
ACCADEMIA NAZIONALE  
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA  
Anno LXXI - 2023



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

**LXXI.**  
**CHEMICAL ECOLOGY**  
**IN INSECT PARASITIDS**

*Estratto da:*  
ATTI DELLA  
ACCADEMIA NAZIONALE  
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA  
Anno LXXI - 2023



## INDICE

### Tavola Rotonda su:

CHEMICAL ECOLOGY IN INSECT PARASITIDS .....	»	57
ERIC CONTI E STEFANO COLAZZA – <i>Chemical ecology of egg parasitoids: what's known and what's next?</i> .....	»	59
NINA FATOUROS – <i>Natural selection on butterfly sex scents by egg parasitoids and implications for biological control</i> .....	»	63
ANTONINO CUSUMANO, JEFFREY A. HARVEY, MITCHEL E. BOURNE E JETSKA G. DE BOER – <i>Ruolo dell'ecologia chimica per la gestione degli iperparassitoidi nel controllo biologico</i> .....	»	65
EMILIO GUERRIERI – <i>Root elicitors altering the behaviour of foraging parasitoids</i> .....	»	73
JOACHIM RUTHER – <i>Pheromones in the Nasonia group: behavior and biochemistry</i> .....	»	79
GIANFRANCO ANFORA, LORENZO FELLIN, ALBERTO SADDI, RACHELE NIERI, CLAUDIO IORIATTI, VALERIO MAZZONI E MARCO VALERIO ROSSI STACCONI – <i>Chimica ecologica e biotremologia delle interazioni tra pianta-fitofago-parassitoide a supporto dei progetti di controllo biologico (il caso studio di Drosophila suzukii vs Ganaspis brasiliensis)</i> .....	»	83
ERNESTO MOLLO – <i>Gusto e olfatto: una teoria unificatrice</i> .....	»	87

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE, 17 FEBBRAIO 2023

Tavola Rotonda su:

CHEMICAL ECOLOGY IN INSECT PARASITOIDS

Coordinatori:

ERIC CONTI e

STEFANO COLAZZA

## CHEMICAL ECOLOGY OF EGG PARASITOIDS: WHAT'S KNOWN AND WHAT'S NEXT?

ERIC CONTI <sup>a</sup> - STEFANO COLAZZA <sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Perugia*

<sup>b</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Università degli Studi di Palermo*

Sintesi della lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "Chemical Ecology in Insect parasitoids". Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 17 febbraio 2023.

Egg parasitoids are major regulators of insect populations and important agents of both classical and inundative biological control. Knowledge of their behaviour and ecology is important for species selection, risk assessment, breeding, successful application (CONTI *et al.*, 2004; VAN LENTEREN & BIGLER, 2009; MILLS, 2010; PERI *et al.*, 2018; CONTI *et al.*, 2021). Like all parasitic Hymenoptera, their survival and reproduction largely depend on their ability to exploit a wide array of different chemical signals during intraspecific and interspecific interactions. Depending on the physiological state, egg parasitoids use semiochemicals to communicate with conspecifics during competition and sexual behaviour, to locate food sources and shelters, to search host eggs for oviposition. Here we focus on interspecific interactions.

Like other parasitoids, egg associated species need and search for shelters and for nutrients such as nectar and honeydew. A recent paper (COLAZZA *et al.*, 2023) reviews the role of flowering plants as food sources for entomophages, including egg parasitoids. Hypothetically, naïve parasitoids foraging for floral resources are innately attracted toward common floral volatile compounds shared among different plant species. Then, through experience gained while foraging and rewarded by feeding (associative learning), parasitoids are expected to fine-tune their ability to specifically recognize suitable flowers. Remarkably, nectar-inhabiting microorganisms can modify some nectar traits, especially the sugar and amino acid profiles, with effects on parasitoid longevity and reproduction, and they can change floral odours by producing microbial volatile organic compounds, with effects on parasitoid olfactory responses to flowers.

Finding a suitable host is not an easy process for egg parasitoids, because eggs are minute, often concealed, and inactive with a very small biomass, thus the volatile cues they emit are quantitatively negligible, which makes them hardly detectable. In addition, host eggs are generally available during a short period of time due to rapid embryo development, so their quality for most parasitoid species decreases quite quickly after deposition. However, egg parasitoids have developed distinctive strategies to overcome these constraints and locate suitable hosts. Several species show the ability to exploit plant synomones that are induced by host egg deposition, which are potentially highly detectable because they can be emitted in high quantity due to the relatively large plant biomass. Additionally, these oviposition-induced synomones are highly reliable because they are directly related to the

presence of suitable host eggs (reviewed by COLAZZA *et al.*, 2010; HILKER & FATOUROS, 2015). Moreover, several species also exploit cues that are indirectly related to the host eggs, such as adult pheromones, allomones, chemical traces from stink bugs, or Lepidoptera scales. These stimuli are less reliable, but in general easily detectable because they are produced in significant amounts by non-host instars (VET & DICKE, 1992; COLAZZA *et al.*, 2010). A special strategy is shown by phoretic species which exploit adult instar of host to gain access to freshly laid eggs (GREENBERG *et al.*, 2023).

Parasitoid response to chemical cues depends on the taxonomic group and can change in time due to previous experience and resulting associative learning. Focusing on species of *Trissolcus* (Hymenoptera: Scelionidae), which include important biological control agents of highly invasive stink bugs, such as *Halyomorpha halys* Stål and *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae), the parasitoid females seem to exploit a hierarchical sequence of diverse stimuli. Hypothetically, the sequence from furthest to closest might be: oviposition-induced plant synomones, which are apparently perceived from a medium-long distance; volatile kairomones from host adults; short-range kairomones (chemical traces) from host adults, perceived by parasitoid after alighting on plant; volatiles from eggs when getting very close; recognition kairomone when in contact with egg (CONTI & COLAZZA, 2012). However, when investigating *Trissolcus brochymenae* Ashmead versus *Murgantia histrionica* Hahn (Hemiptera: Pentatomidae) on cabbage plants, a slightly different sequence of cues is observed. *Trissolcus brochymenae*, which is not attracted in the olfactometer to induced plant volatiles, responds from a distance to host pheromones and allomones and then it shows an arrestment and intense searching behaviour on plants that contain host eggs. Then the sequence follows as for the other species on host traces, egg volatiles and egg contact cues. Oviposition by *M. histrionica* on cabbage plants results in a change of chemical profile on plant surface with combined emission of induced synomones. We hypothesized that volatiles are adsorbed by the plant epicuticular waxes and then partly released over time (CONTI *et al.*, 2010).

Emission of oviposition-induced synomones to recruit egg parasitoids can be considered as an indirect defence strategy evolved by plants. Interestingly, egg deposition by *H. halys* on faba bean plants also pre-activates direct defences, resulting in an increased expression of

plant's inhibitor of insect proteinase with reduction of body weight and size of *H. halys* nymphs feeding on such plants. This suggests that plants recognize *H. halys* oviposition as a warning signal and prime defences against future nymphal herbivory (RONDONI *et al.*, 2018).

The available information on egg parasitoid chemical ecology indicates important prospective for improvement of biological control. A first chance is field application of semiochemicals (kairomones and synomones) to recruit parasitoids, although a literature meta-analysis on this topic indicates a significant attraction of egg parasitoids on treated fields but no significant increase of parasitism (G. Rondoni and E. Conti, unpublished). While this might not be very encouraging, at least one aspect should be considered. In simplified agricultural landscapes two important resources for parasitoids, such as food and shelter, are often lacking. A starved parasitoid, deprived of energy, shows a reduction of fitness and host foraging activity. Therefore, in Conservation Biological Control, the use of flower strips and field margins with highly attractive and food rewarding plant species, for recruitment of natural enemies, is under consideration. Laboratory and field experiments show contrasting effects on egg parasitoid populations and biological control efficacy, depending on species and systems, and highlight that knowledge of the mechanisms is still limited (COLAZZA *et al.*, 2023).

Another important aspect is plant indirect defences, which need further investigations, with evaluation of cultivar performances and breeding of those expressing high levels of both indirect and direct resistance. Previous studies conducted in Brazil show that resistant soybean cultivars attracted a higher number of egg parasitoids, partly improving parasitism of *Euschistus eros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) (MICHÉREFF *et al.*, 2015). In the future, use of new breeding technologies and genome editing should aim also at improving indirect plant resistance towards herbivores. Moreover, possible implementation of plant defence elicitors is also under evaluation. Applications of Cis-jasmone on soybean (VIEIRA *et al.*, 2013) and of *Trichoderma harzianum* Strain T22 on tomato plants (ALINÇ *et al.*, 2021) were effective in improving indirect and direct defences, respectively, but increasing of biological control efficacy has not been shown yet.

Hopefully, as a future prospective, classical, inundative or conservation biological control could be effectively integrated with application of semiochemicals and plant resistance elicitors, within organic farming or IPM, to improve egg parasitoid efficacy and pest management. However, effective and efficient integration of different complex strategies is not easy using conventional methods. This goal could be achieved through the development and implementation of digital decision support systems (DSS), automatic data collection devices, predictive tools based on mechanistic and machine learning algorithms that also consider the third trophic level.

In conclusion, knowledge of egg parasitoid chemical ecology is fundamental for a finely tuned planning

of biocontrol and IPM programmes. Acquired knowledge would help select effective biocontrol agents and improve risk assessment (BERTOLDI *et al.*, 2019), allowing to predict possible non-target effects under field conditions. Applied chemical ecology shows potential for improvement of egg parasitoid efficacy in the field, but strategies and techniques must be defined, including the combined use of smart technologies. Multidisciplinary research under laboratory and field conditions is still strongly needed.

KEY WORDS: Host selection, kairomone, synomone, Trichogrammatidae, Scelionidae, Mymaridae, biological control.

#### REFERENCES

- ALINÇ T., CUSUMANO A., PERI E., TORTA L., COLAZZA S., 2021 - *Trichoderma harzianum strain T22 modulates direct defense of tomato plants in response to Nezara viridula feeding activity.* - *Journal of Chemical Ecology*, 47: 455-462.
- BERTOLDI V., RONDONI G., BRODEUR J., CONTI E., 2019 - *An egg parasitoid efficiently exploits cues from a coevolved host but not those from a novel host.* - *Frontiers in Physiology*, 10: 746.
- COLAZZA S., PERI E., SALERNO G., CONTI E., 2010 - *Host searching by egg parasitoids: exploitation of host chemical cues.* In: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, Cònsoli F.L., Parra J.R.P., Zucchi R.A. Ed., Springer, Dordrecht, pp. 97–147.
- COLAZZA S., PERI E., CUSUMANO A., 2023 - *Chemical Ecology of Floral Resources in Conservation Biological Control.* *Annual Review of Entomology*, 2023. 68:13–29.
- CONTI E., AVILA G., BARRATT B., CINGOLANI F., COLAZZA S., GUARINO S., ... WAJNBERG E., 2021 - *Biological control of invasive stink bugs: Review of global state and future prospects.* - *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(1), 28-51.
- CONTI E., COLAZZA S., 2012 - *Chemical ecology of egg parasitoids associated with true bugs.* - *Psyche*, 2012: 651015.
- CONTI E., SALERNO G., BIN F., VINSON S. B., 2004 - *The role of host semiochemicals in parasitoid specificity: a case study with Trissolcus brochymenae and Trissolcus simoni on pentatomid bugs.* - *Biological Control*, 29(3): 435-444.
- CONTI E., SALERNO G., LEOMBRUNI B., FRATI F., BIN F., 2010. - *Short-range allelochemicals from a plant-herbivore association: a singular case of oviposition-induced synomone for an egg parasitoid.* - *Journal of Experimental Biology*, 213(22): 3911-3919.
- GREENBERG L. O., HUIGENS M. E., GROOT A. T., CUSUMANO A., FATOUROS N. E., 2023 - *Finding an egg in a haystack: variation in chemical cue use by egg parasitoids of herbivorous insects.* - *Current Opinion in Insect Science*, 55: 101002.

- HILKER M., FATOUROS N.E., 2015 - *Plant Responses to Insect Egg Deposition*. - *Annu. Rev. Entomol.*, 60: 493-515.
- MICHEREFF M. F., MICHEREFF FILHO M., BLASSIOLI-MORAES M. C., LAUMANN R. A., DINIZ I. R., BORGES M., 2015 - *Effect of resistant and susceptible soybean cultivars on the attraction of egg parasitoids under field conditions*. - *Journal of Applied Entomology*, 139(3): 207-216.
- MILLS N., 2010 - *Egg Parasitoids in Biological Control and Integrated Pest Management*. - In: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, Consoli F., Parra J., Zucchi R. Ed., *Progress in Biological Control*, vol 9, Springer, Dordrecht, pp. 389-411.
- PERI E., MOUJAHED R., WAJNBERG E., COLAZZA S., 2018 - *Applied chemical ecology to enhance insect parasitoid efficacy in the biological control of crop pests*. In: *Chemical ecology of insects*, Tabata J. Ed., CRC Press, pp. 234-267.
- RONDONI G., BERTOLDI V., MALEK R., DJELOUAH K., MORETTI C., BUONAURO R., CONTI E., 2018 - *Vicia faba plants respond to oviposition by invasive Halyomorpha halys activating direct defences against offspring*. - *Journal of Pest Science*, 91: 671-679.
- VAN LENTEREN J.C., BIGLER F., 2009 - *Quality Control of Mass Reared Egg Parasitoids*. In: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, Consoli F., Parra J., Zucchi R. Ed., *Progress in Biological Control*, vol 9, Springer, Dordrecht, pp. 315-340.
- VET L.E.M., DICKE M., 1992 - *Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context*. - *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 141-172.
- VIEIRA C. R., MORAES M. C. B., BORGES M., SUJII E. R., LAUMANN R. A., 2013 - *Cis-Jasmone indirect action on egg parasitoids (Hymenoptera: Scelionidae) and its application in biological control of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae)*. - *Biological Control*, 64(1): 75-82.



## NATURAL SELECTION ON BUTTERFLY SEX SCENTS BY EGG PARASITIDS AND IMPLICATIONS FOR BIOLOGICAL CONTROL

NINA E. FATOUROS <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biosystematics Group, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

E-mail: nina.fatouros@wur.nl

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Chemical Ecology in Insect parasitoids”. Seduta pubblica dell’Accademia – Firenze, 17 febbraio 2023.

### SYNTHESIS OF LECTURE

Hymenopteran wasps that are specialized to parasitize eggs are one of the most common mortality factors in Hexapods. About half of all hexapod orders are attacked by such egg parasitoids, mostly known from orders that contain herbivorous species (FATOUROS *et al.*, 2020). To find minuscule eggs in complex environments, egg parasitoids commonly use an interplay between short- and long-range chemical cues emitted by the host and/or host plant (FATOUROS *et al.*, 2008; GREENBERG *et al.*, 2023). Two important long-range cues that have been identified for egg parasitoids are plant volatiles induced by herbivore egg deposition, so-called oviposition-induced plant volatiles (OIPVs) (HILKER e FATOUROS, 2015), and pheromones emitted by the adult host, sometimes used in combination with hitch-hiking on the latter (HUIGENS e FATOUROS, 2013). However, how and when a particular cue is

used varies, and a better understanding of this variability in egg parasitoid host-finding strategies is needed to further enhance the use of egg parasitoids in biological control of pest eggs (FATOUROS *et al.*, 2008; FATOUROS *et al.*, 2016).

We are studying minute *Trichogramma* wasps, the most used biological control agents worldwide, and their cabbage white butterfly hosts of the family Pieridae. Eggs of cabbage white butterflies have been shown to induce OIPVs in different *Brassica* species that attract different *Trichogramma* wasps (FATOUROS *et al.*, 2012; AFENTOULIS *et al.*, 2021). Moreover, previous research revealed that *Trichogramma* spies on their butterfly’s host anti-sex pheromones to subsequently hitch a ride on the female butterfly to egg-laying sites (FATOUROS e HUIGENS, 2012). Anti-sex pheromones or anti-aphrodisiacs are transferred from males to females to render females less attractive to conspecific males (ANDERSON *et al.*, 2003). A better understanding of whether *Trichogramma* egg parasitoids are selection factors on these *Pieris* butterfly anti-sex pheromones is needed for enhancing biological control.

To do so, we want to a) measure inter- and intraspecific variation in pheromones between and within butterfly species and differences in luring egg parasitoids, b) understand whether variation in pheromones is linked to local parasitoid selection pressure, c) understand whether there is genetic variation in response to pheromones, and d) identify whether laboratory selection on pheromone attraction leads to higher parasitism rates. Through a combination of behavioral tests, genetic analyses, fieldwork, and chemical analyses, we hope to improve our knowledge of host-finding strategies in these minute wasps. We are in need to find sustainable solutions for crops like cabbages that are cultivated in open fields where farmers largely depend on chemical control. The application of natural chemicals, such as insect pheromones, in combination with the selection of wasp genotypes that are attracted to them could be a sustainable and promising alternative to pesticides (GREENBERG *et al.*, 2023; PERI *et al.*, 2018).



Fig. 1 - *Trichogramma* egg parasitoid wasp hitch-hiking on a cabbage white butterfly (FATOUROS *et al.* 2020).

KEY WORDS: *Trichogramma*, pheromones, host location, plant volatiles, phoresy

## REFERENCES

- AFENTOULIS D.G., CUSUMANO A., GREENBERG L.O., CAARLS L., FATOUROS N.E., 2021 - *Attraction of Trichogramma wasps to butterfly oviposition-induced plant volatiles depends on Brassica species, wasp strain and leaf necrosis*. - *Front. Ecol. Evol.*, 9.
- ANDERSSON J., BORG-KARLSON A.K., WIKLUND C., 2003 - *Antiaphrodisiacs in pierid butterflies: A theme with variation!* - *Journal of Chemical Ecology*, 29: 1489-99.
- FATOUROS N.E., HUIGENS M.E., 2012 - *Phoresy in the field: natural occurrence of Trichogramma egg parasitoids on butterflies and moths*. - *BioControl*, 57: 493-502.
- FATOUROS N.E., DICKE M., MUMM R., MEINERS T., HILKER M., 2008 - *Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information*. - *Behav. Ecol.*, 19: 677-89.
- FATOUROS N.E., LUCAS-BARBOSA D., WELDEGERGIS B.T., PASHALIDOU F.G., VAN LOON J.J.A., DICKE M., HARVEY J.A., GOLS R., HUIGENS M.E., 2012 - *Plant Volatiles Induced by Herbivore Egg Deposition Affect Insects of Different Trophic Levels*. - *PLoS One*, 7.
- FATOUROS N.E., CUSUMANO A., DANCHIN E.G.J., COLAZZA S., 2016 - *Prospects of herbivore egg-killing plant defenses for sustainable crop protection*. - *Ecology and Evolution*, 6: 6906-18.
- FATOUROS N.E., CUSUMANO A., BIN F., POLASZEK A., VAN LENTEREN J.C., 2020 - *How to escape from insect egg parasitoids: a review of potential factors explaining parasitoid absence across the Insecta*. - *Proc. R. Soc. B.*, 287: 20200344.
- GREENBERG L.O., HUIGENS M.E., GROOT A.T., CUSUMANO A., FATOUROS N.E., 2023 - *Finding an egg in a haystack: variation in chemical cue use by egg parasitoids of herbivorous insects*. - *Current Opinion in Insect Science*, 55: 101002.
- HILKER M., FATOUROS N.E., 2015 - *Plant responses to insect egg deposition*. - *Annu. Rev. Entomol.*, 60: 493-515.
- HUIGENS M.E., FATOUROS N.E., 2013 - *A hitch-hiker's guide to parasitism: The chemical ecology of phoretic insect parasitoids*. ' In: E. Wajnberg and S. Colazza (eds.), *Chemical Ecology of Insect Parasitoids* (John Wiley & Sons, Ltd.: West Sussex).
- PERI E., MOUJAHED R., WAJNBERG E., COLAZZA S., 2018 - *Applied Chemical Ecology to Enhance Insect Parasitoid Efficacy in the Biological Control of Crop Pests*. In: *Chemical Ecology in Insects, Plants, and Microbes—Interactions and Applications* (INRA: France).

## RUOLO DELL'ECOLOGIA CHIMICA PER LA GESTIONE DEGLI IPERPARASSITOIDI NEL CONTROLLO BIOLOGICO

ANTONINO CUSUMANO <sup>a\*</sup> - JEFFREY A. HARVEY <sup>b,c</sup> - MITCHEL E. BOURNE <sup>a†</sup> - JETSKE G. DE BOER <sup>b,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Entomology, Wageningen University, P.O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands.

<sup>a</sup>Department of Terrestrial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands,

<sup>c</sup>VU University Amsterdam, Department of Ecological Sciences, Section Animal Ecology, De Boelelaan 1085, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands

<sup>d</sup>Aeres University of Applied Sciences, Faculty Wageningen, Mansholtlaan 18, 6708PB, Wageningen, The Netherlands

\* *Indirizzo attuale: Department of Agricultural, Food, and Forest Sciences, University of Palermo, Palermo, Italy*

† *Indirizzo attuale: National Centre for Vector Entomology, Institute of Parasitology, Vetsuisse and Medical Faculty, University of Zürich, Zürich, Switzerland*

Corresponding Author: Antonino Cusumano; E-mail: antonino.cusumano@unipa.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "Chemical Ecology in Insect parasitoids". Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 17 febbraio 2023.

### *Chemical ecology and hyperparasitoid management in biological control*

Hyperparasitoids are fourth-trophic level organisms which are ubiquitous in terrestrial food webs. There is increasing awareness that these natural enemies of parasitoid insects can interfere with biological control causing an increase of pest population densities, especially in greenhouse crops where augmentative biological control is used. Recent advances in the chemical ecology of hyperparasitoids may pave the way towards the manipulation of hyperparasitoid behavior to enhance biological control. In this manuscript, we propose to modify the behavior of hyperparasitoid insects through the use of chemical compounds (infochemicals) used in intra- and inter-specific communication. In particular, a "push-pull" strategy is discussed in order to remove (i.e. push) hyperparasitoids from agricultural crops and attract them (i.e. pull) into traps.

KEY WORDS: Push-pull, Infochemical-based strategies, Fourth trophic level organisms, Hyperparasitoid foraging, Multitrophic interactions, Herbivore-induced plant volatiles

### INTRODUZIONE

Gli insetti iperparassitoidi (o parassitoidi secondari), sono organismi appartenenti al quarto livello trofico i quali hanno come ospiti gli insetti parassitoidi. Questi organismi sono molto comuni nelle reti trofiche associate agli ecosistemi terrestri. Oltre agli iperparassitoidi "obbligati", ossia quelli che si sviluppano sempre a carico di parassitoidi, esistono anche gli iperparassitoidi "facoltativi", i quali possono sia svilupparsi a carico di un parassitoide primario oppure su un fitofago. Così come i loro ospiti parassitoidi, gli iperparassitoidi si distinguono in "ecto"-iperparassitoidi se si sviluppano all'esterno del corpo dell'ospite (anche se all'interno della mummia nel caso di iperparassitoidi associati agli afidi), e in "endo"-iperparassitoidi se si sviluppano all'interno del corpo dei loro ospiti parassitoidi (Fig. 1).

Gli iperparassitoidi mostrano notevoli adattamenti che consentono loro di utilizzare i parassitoidi come ospiti e, infatti, l'iperparassitismo è una strategia di grande successo: ad esempio alcuni parassitoidi sono attaccati da decine di specie di iperparassitoidi in natura (HOL-

LER *et al.*, 1993; KELLOGG *et al.*, 2003; HARVEY *et al.*, 2014) e possono falciare le popolazioni dei parassitoidi nel corso di poche generazioni (HOLLER *et al.*, 1993; SCHOOLER *et al.*, 2011). Di conseguenza, gli iperparassitoidi possono interferire con il controllo biologico degli insetti parassitoidi, in particolare in serra (controllo biologico aumentativo), ma anche in campo (controllo biologico classico) (MCDONALD e KOK, 1991; RHAINDS e MESSING, 2005). Attualmente non esiste una strategia valida di contenimento degli iperparassitoidi in agricoltura, e ciò è in parte dovuto a lacune nella ecologia degli iperparassitoidi. I primi studi sugli iperparassitoidi erano in gran parte descrittivi e si concentravano principalmente sulla caratterizzazione delle comunità di iperparassitoidi associate agli ospiti parassitoidi. Più recentemente sono stati compiuti notevoli progressi nel comportamento degli iperparassitoidi, in particolare sulla ricerca dell'ospite, processo principalmente guidato da segnali chimici (semiochimici o infochimici) (VÖLKL e SULLIVAN, 2000; BUITENHUIS *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2015; CUSUMANO *et al.*, 2019). Mentre l'idea di manipolare gli iperparassitoidi per migliorare il controllo biologico è stata suggerita

più di due decenni fa (MICA *et al.*, 1993; GRASSWITZ, 1998), i recenti progressi nell'ecologia chimica rendono ora possibile sviluppare strategie concrete di contenimento degli iperparassitoidi.

Sebbene i volatili delle piante indotti dall'attacco dei fitofagi (HIPVs) siano noti per essere segnali chimici chiave per la ricerca dell'ospite da parte dei parassitoidi associati ai fitofagi (MUMM e DICKE, 2010), poche sono le

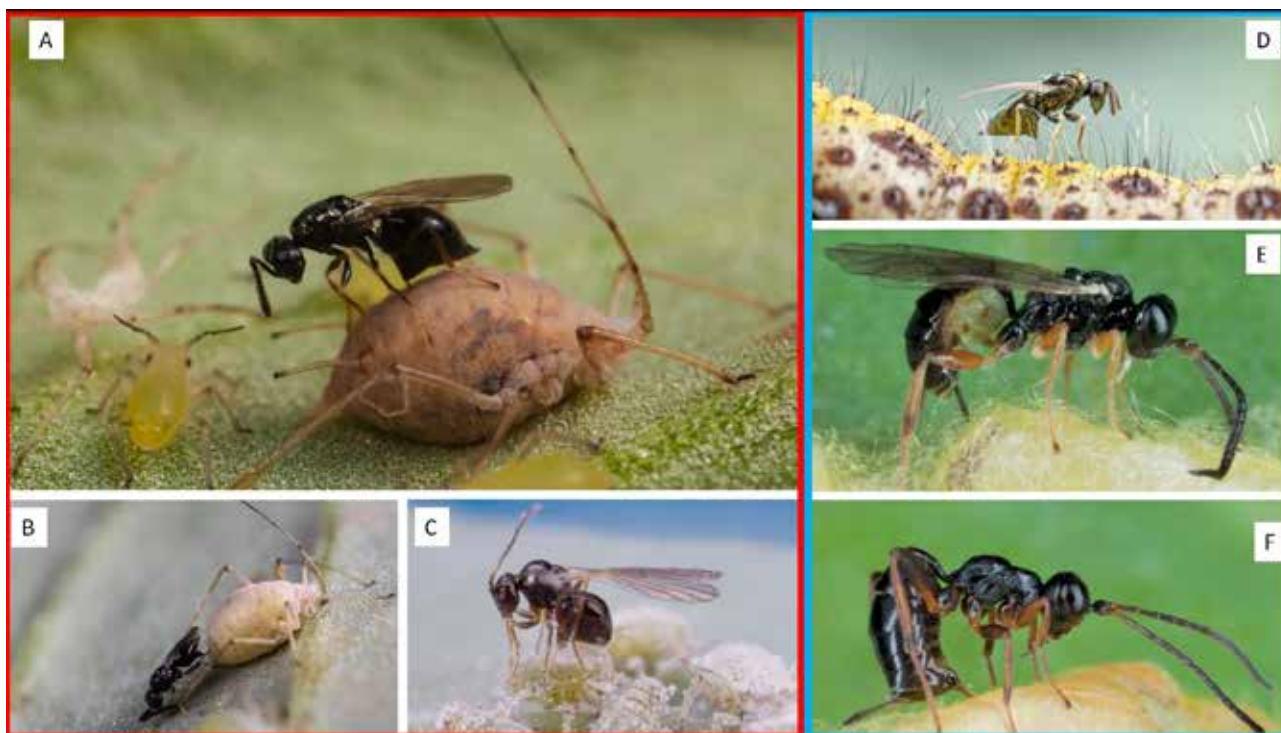


Fig. 1 - Esempi di iperparassitoidi obbligati (riquadro rosso: iperparassitoidi associati agli afidi; riquadro blu: iperparassitoidi associati ai bruchi). A) *Asaphes vulgaris* (Hymenoptera: Pteromalidae), foto di Nina Fatouros; B) *Dendrocerus aphidum* (Hymenoptera: Megaspilidae) foto di Nina Fatouros; C) *Alloxysta* sp. (Hymenoptera: Figitidae) foto di Hans Smid; D) *Baryscapus galactopus* (Hymenoptera: Eulophidae) foto di Hans Smid; E) *Lysibia nana* (Hymenoptera: Ichneumonidae) foto di Tibor Bukovinszky; F) *Gelis agilis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) foto di Tibor Bukovinszky.

In questo lavoro vengono illustrate le conoscenze attuali sull'ecologia chimica degli iperparassitoidi trattando in particolare (1) gli infochimici potenzialmente utili per manipolarne il comportamento e (2) possibili strategie di gestione degli iperparassitoidi basate sugli infochimici, quali la strategia “push-pull”. È possibile prevedere che tali strategie abbiano maggiori chances di successo nelle colture in serra rispetto al pieno campo, a causa dei vantaggi derivanti dall'operare in ambienti confinati e in condizioni ambientali controllate. Per ulteriori informazioni sull'ecologia dei parassitoidi obbligati si rimanda a CUSUMANO *et al.*, (2020); POELMAN *et al.*, (2022).

#### INFOCHIMICI UTILIZZATI DAGLI IPERPARASSITOIDI

Gli infochimici vengono utilizzati dagli insetti nella ricerca del partner, dell'ospite o del cibo e i (blend) composti chimici che guidano questi processi possono essere potenzialmente utilizzati per manipolare il comportamento degli iperparassitoidi (Fig. 2). Gli infochimici possono avere origini diverse e possono mediare sia le interazioni tra gli iperparassitoidi e altri organismi come segnali interspecifici (ad esempio composti volatili emessi dalle piante o segnali associati a fitofagi parassitizzati), sia le interazioni intraspecifiche (feromoni).

specie note di iperparassitoidi in grado di rispondere agli HIPVs. *Lysibia nana*, un ecto-iperparassitoide specifico di parassitoidi del genere *Cotesia*, preferisce gli HIPVs emessi da piante di cavolo attaccate da bruchi parassitizzati rispetto ai volatili emessi in risposta all'attacco di bruchi non parassitizzati (POELMAN *et al.*, 2012). La composizione chimica del blend di HIPVs cambia a seconda dello stato di parassitizzazione del fitofago, consentendo agli iperparassitoidi di localizzare i loro ospiti. È interessante notare che l'attrazione degli HIPVs da parte di *L. nana* avviene indipendentemente dall'identità dei fitofagi in cui si sviluppano le larve del parassitoide *Cotesia glomerata* (*Pieris brassicae* o *P. rapae*), dimostrando che l'influenza del parassitoide prevale sull'identità del fitofago in questo sistema multi-trofico (ZHU *et al.*, 2015; CUSUMANO *et al.*, 2019). Mentre gli HIPVs emessi in risposta all'attacco di fitofagi parassitizzati rappresentano segnali affidabili per la ricerca dell'ospite da parte di iperparassitoidi associati ai lepidotteri, al momento non esistono studi che dimostrino come tali stimoli chimici siano utilizzati dagli iperparassitoidi associati agli afidi, molti dei quali sono fitofagi di notevole interesse agrario. Studi futuri dovrebbero essere condotti in modo da verificare se l'utilizzo di HIPVs è ristretto agli iperparassitoidi associati ai lepidotteri, oppure se tale fenomeno esista an-

che per gli iperparassitoidi associati agli afidi, ipotesi più probabile anche se attualmente non dimostrata.

Studi che mettano in evidenza come gli iperparassitoidi utilizzino, durante il processo di localizzazione dell'ospite, infochimici derivanti dai fitofagi sono noti sia per gli iperparassitoidi associati ai bruchi che per quelli associati agli afidi. Ad esempio, l'endo-iperparassitoide *Baryscapus galactopus* utilizza gli odori corporei del fitofago per discriminare tra i bruchi non parassitizzati e quelli in cui si stanno sviluppando le larve dei parassitoidi ospiti (ZHU *et al.*, 2014). L'endo-iperparassitoide *Alloxysta victrix* risponde fortemente agli estratti apolari di afidi parassitizzati, mentre gli afidi non parassitizzati evocano risposte deboli. Ciò suggerisce che i composti apolari, quali gli idrocarburi cuticolari, possono essere coinvolti nel riconoscimento, da parte dell'iperparassitoide, degli afidi di *Myzus persicae* parassitizzati dall'ospite *Aphidius colemani* (GRASSWITZ, 1998).

in presenza della melata emessa dagli afidi (BUDENBERG, 1990; GRASSWITZ, 1998). Gli infochimici della melata sembrano avere un certo grado di specificità poiché alcune specie di iperparassitoidi non rispondono alla melata prodotta dalle cocciniglie, i quali sono fitofagi non-ospiti per i parassitoidi primari (BUITENHUIS *et al.*, 2004). Tuttavia, gli iperparassitoidi non sono in grado di discriminare tra la melata prodotta dagli afidi parassitizzati e quella prodotta da afidi non parassitizzati (BUITENHUIS *et al.*, 2004). L'importanza degli infochimici della melata nella gestione degli iperparassitoidi è quindi probabilmente limitata, rispetto a segnali più specifici come i composti cuticolari o gli HIPVs, questi ultimi hanno l'ulteriore vantaggio di essere percepiti su larga scala.

I feromoni sono un altro gruppo di infochimici potenzialmente interessanti per la gestione degli iperparassitoidi. I composti feromonalari per definizione regolano la comunicazione intraspecifica e sono importanti negli

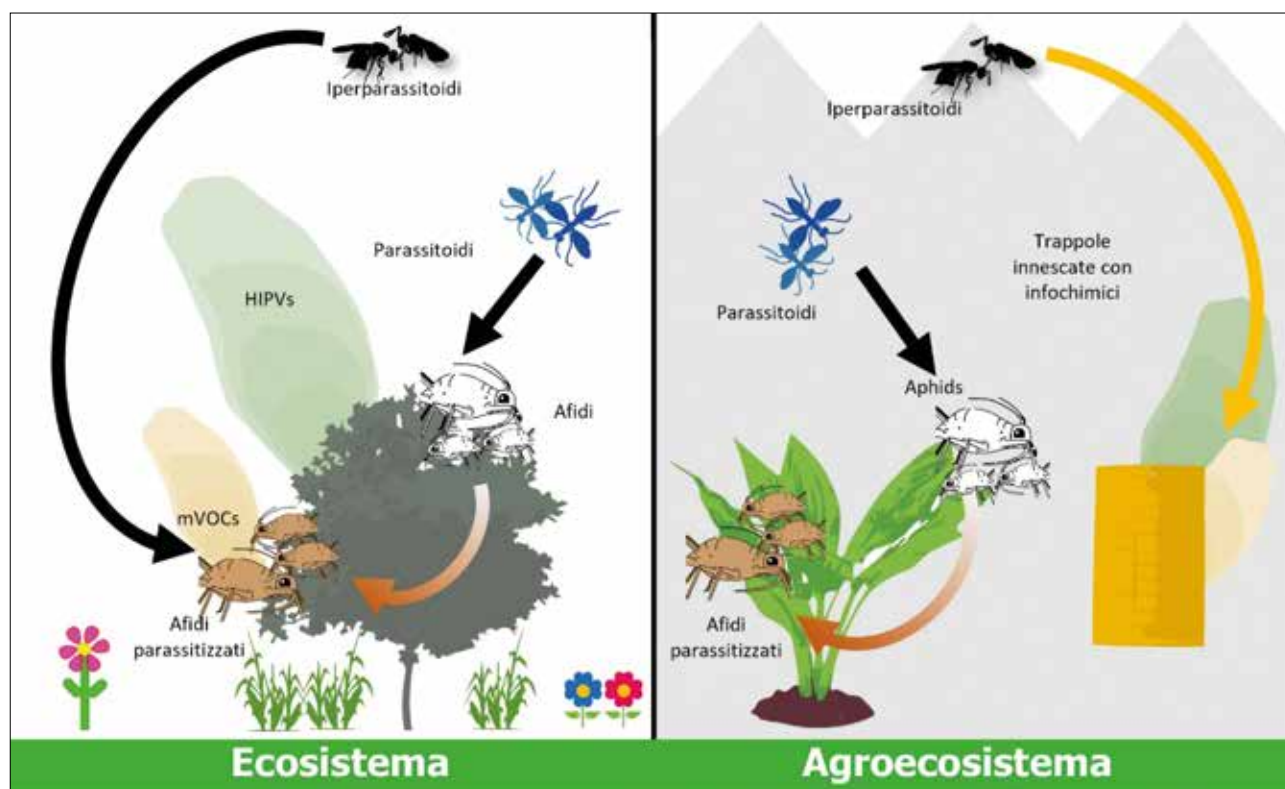


Fig. 2 - Processo di localizzazione degli ospiti da parte degli iperparassitoidi. A) In condizioni naturali, gli iperparassitoidi localizzano i loro ospiti parassitoidi utilizzando segnali chimici di origine vegetale (HIPVs) e segnali chimici associati ai fitofagi parassitizzati. B) Nell'agroecosistema, gli stessi infochimici potrebbero essere utilizzati nelle strategie di gestione degli iperparassitoidi per allontanarli dai fitofagi parassitizzati e attirarli verso dispositivi di attrazione quali trappole adesive. HIPVs = Volatili delle piante indotti dall'attacco dei fitofagi, mVOC = Composti organici volatili di origine microbica (Modificato da Cusumano *et al.*, 2020).

La melata, un prodotto di scarto degli afidi e di altri insetti fitomizi, può anche essere utilizzata dagli iperparassitoidi per localizzare l'ospite. La melata è una preziosa fonte di cibo che può prolungare la longevità delle specie iperparassitoidi dei generi *Asaphes* e *Dendrocerus* (DE BOER *et al.*, 2019), ma può anche indicare la presenza di ospiti di iperparassitoidi. Infatti, gli iperparassitoidi degli afidi di diverse famiglie (Megaspilidae, Alloxystidae, Encyrtidae) esibiscono un comportamento di arresto

insetti per la ricerca e il riconoscimento del partner, per l'aggregazione, per la marcatura di aree precedentemente visitate, e per prevenire il superparassitismo. Esiste una vasta letteratura sui feromoni dei fitofagi, in particolare dei lepidotteri (JACOBSEN, 1972; WITZGALL *et al.*, 2010; HANKS e MILLAR 2016), mentre sono meno noti i feromoni di insetti carnivori. Tuttavia, le informazioni limitate disponibili sugli iperparassitoidi sembrerebbero illustrare una certa complessità della comunicazione

intraspecifica, almeno in alcune specie. L'afide iperparassitoide *Alloxysta victrix* produce un feromone sessuale volatile il cui composto principale, 6-metil-5-epten-2-one (MHO, noto anche come sulcatone), sembra agire come un feromone sessuale e di distanziamento (MCHA *et al.*, 1993). Sorprendentemente, non ci sono prove che l'MHO svolga un ruolo nella comunicazione intraspecifica nella specie strettamente imparentata *Alloxysta brevis* (VÖLKL *et al.*, 1994). Sebbene l'(E)- $\beta$ -farnesene sia un noto feromone d'allarme per gli afidi, questo composto è risultato attrattivo per l'afide iperparassitoide *A. victrix* (SIRI, 1993), dimostrando – in alcuni iperparassitoidi – la capacità di intercettare la comunicazione feromonale tra altri organismi.

Infine, è noto che i composti organici volatili di origine microbica (mVOC) possono fungere da infochimici negli insetti (DAVIS *et al.*, 2013). La manipolazione della comunicazione chimica tra insetti e microrganismi potrebbe rappresentare una nuova frontiera per controllare i fitofagi in agricoltura (BECK e VANNETTE, 2017). Sfortunatamente, non si sa molto sul ruolo dei composti organici volatili di origine microbica (mVOC) nell'ecologia chimica degli organismi associati al quarto livello trofico. A tal proposito le ricerche future dovrebbero chiarire se gli mVOC costituiscano segnali affidabili per gli iperparassitoidi durante la ricerca del partner e/o dell'ospite e se tali composti chimici possano essere impiegati per sviluppare strategie di gestione degli iperparassitoidi.

#### LA STRATEGIA PUSH-PULL PER LA GESTIONE DEGLI IPERPARASSITOIDI NEL CONTROLLO BIOLOGICO

Gli infochimici sono utilizzati con successo nel controllo biologico degli insetti fitofagi per il monitoraggio, la cattura massale o la confusione sessuale (PICKETT *et al.*, 1997; RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2012). La maggior parte di queste strategie basate sugli infochimici fanno affidamento sui feromoni dei fitofagi bersaglio (WITZGALL *et al.*, 2010). I composti volatili emessi dalle piante, d'altro canto, sono stati utilizzati con maggior successo nelle strategie push-pull per manipolare il comportamento dei fitofagi e/o dei loro nemici naturali (KHAN *et al.*, 1997; COOK *et al.*, 2006; COOK *et al.*, 2007; PICKETT *et al.*, 2014; EIGENBRODE *et al.*, 2016).

Una strategia push-pull è una strategia a due fasi ove gli infochimici vengono usati per alterare il comportamento degli organismi bersaglio (i fitofagi o i loro nemici naturali) al fine di influenzarne la densità di popolazione nell'agroecosistema (COOK *et al.*, 2007). Quando l'organismo bersaglio è un insetto fitofago, composti repellenti o deterrenti vengono utilizzati per "allontanarlo" dalla coltura agraria di interesse (fase push) e contemporaneamente segnali attrattivi o stimolanti "attirano" il fitofago in altre aree quali ad esempio una trappola (fase pull). Nel caso dei parassitoidi, l'obiettivo della strategia push-pull è quello di combinare segnali chimici al fine di attirarli nella coltura di interesse dalle aree circostanti. L'implementazione push-pull ha in alcuni casi ottenuto successi considerevoli, ad esempio nella gestione delle piralidi

del mais e del sorgo nell'Africa sub-sahariana (KHAN e PICKETT, 2004). L'erba melassa, *Melinis minutiflora*, (componente push) emette composti quali (E)- $\beta$ -ocimene e (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene con attività repellente nei confronti dell'ovideposizione delle piralidi (KHAN *et al.*, 1997). L'erba di Napier, *Pennisetum purpureum*, (componente pull) viene utilizzata come coltura trappola in quanto le piralidi sono stimolate ad ovideporre su questa pianta nonostante l'elevata mortalità larvale conseguente alla schiusura delle uova (KAHN *et al.*, 2006). Un notevole vantaggio di una strategia push-pull, rispetto alle strategie basate su un singolo infochimico, è quello di sfruttare gli effetti combinati delle componenti attrattive e repellenti, le quali spesso agiscono sinergicamente sul comportamento degli insetti (COWLES e MILLER, 1992; NALYANYA *et al.*, 2000; DURAIMURUGAN e REGUPATHY, 2005). Infatti, sia la componente push che quella pull potrebbero non essere sufficientemente efficaci quando agiscono singolarmente, specialmente quando le riposte comportamentali indotte non risultano essere abbastanza intense da modificare la densità di popolazione degli insetti bersaglio. In questo lavoro mettiamo in evidenza come la strategia push-pull possa anche essere utilizzata per ridurre la densità di popolazione degli iperparassitoidi negli appezzamenti agricoli, minimizzando l'impatto sugli insetti carnivori utili. Diversi infochimici possono essere combinati per allontanare gli iperparassitoidi dai loro ospiti parassitoidi (fase push) e contemporaneamente attirarli all'interno di trappole (fase pull). In alternativa, se un composto chimico (o miscela di composti) possiede sia capacità attrattive nei confronti degli iperparassitoidi che capacità repellenti nei confronti dei parassitoidi primari, può essere utilizzato per attirare selettivamente gli iperparassitoidi all'interno di trappole (Fig. 3). Questa strategia push-pull alternativa, è simile alla cattura massale convenzionale, con la differenza che gli infochimici utilizzati hanno una duplice funzione: attrattiva nei confronti degli iperparassitoidi e repellente nei confronti dei parassitoidi primari.

I feromoni degli iperparassitoidi sono particolarmente adatti come componente push. Ad esempio, i feromoni di marcatura esterna dell'ospite, utilizzati dagli iperparassitoidi per prevenire il superparassitismo o per delimitare aree precedentemente esplorate, potrebbero interferire con il comportamento di ricerca degli iperparassitoidi, camuffando i fitofagi parassitizzati in risorse già utilizzate. Pertanto, un feromone di marcatura potrebbe essere erogato nei punti di rilascio dei parassitoidi primari, utilizzati quali agenti di controllo biologico, per proteggere questi ultimi dall'attacco degli iperparassitoidi durante l'introduzione nella serra. Questa strategia potrebbe essere importante per i parassitoidi ospiti di *Dendrocerus* spp. e *Asaphes* spp., iperparassitoidi noti per attaccare le mummie di afidi contenenti al loro interno i parassitoidi primari (MITSUNAGA *et al.*, 2014; DE BOER *et al.*, 2019). Gli infochimici con un raggio d'azione più ampio rispetto ai feromoni di marcatura sarebbero ancora più adatti come prima linea di difesa contro l'attacco degli iperparassitoidi. Tuttavia, ad oggi, tali composti feromonalmente non

sono noti negli iperparassitoidi, probabilmente a causa del fatto che tali organismi del quarto livello trofico sono poco studiati da un punto di vista bio-etologico.

I feromoni sono applicati con successo nel monitoraggio e nella cattura massale di insetti fitofagi (WITZGALL *et al.*, 2010). Ad esempio, le femmine dei coleotteri cerambicidi producono un feromone di aggregazione che attrae sia maschi che femmine conspecifiche (HANKS e MILLAR, 2016). Tali feromoni risultano particolarmente

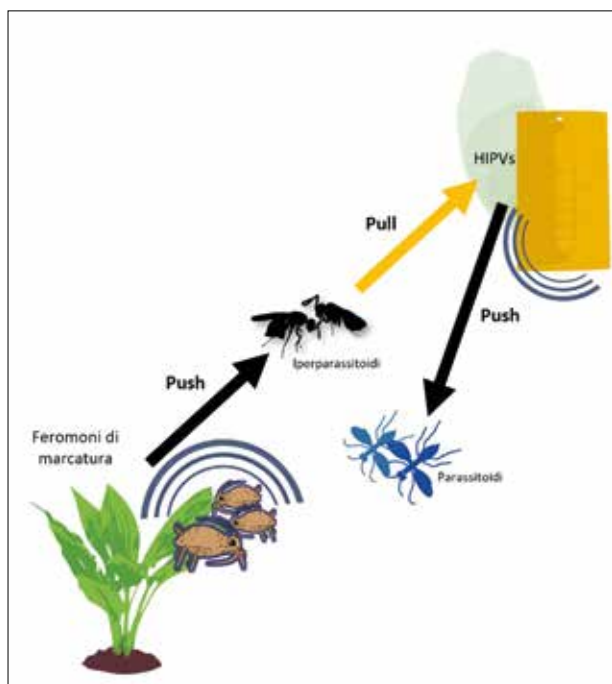


Fig. 3 - Possibile strategia push-pull in cui i feromoni di marcatura vengono utilizzati per allontanare gli iperparassitoidi dai fitofagi parassitizzati e gli HIPVs vengono utilizzati per attirare gli iperparassitoidi all'interno di trappole. Inoltre gli HIPVs emessi da piante attaccate da fitofagi parassitizzati hanno un effetto repellente nei confronti dei parassitoidi agenti di controllo biologico (Modificato da CUSUMANO *et al.*, 2020).

utili dal punto di vista applicativo perché agiscono su tutti gli individui della popolazione del fitofago. Sebbene non siano stati identificati feromoni di aggregazione negli iperparassitoidi, sono disponibili feromoni sessuali per le specie dei generi *Dendrocerus* e *Alloxysta*, ove i maschi sono attratti dalle femmine conspecifiche (MICHÁ *et al.*, 1993; SCHWORER *et al.*, 1999). I feromoni sessuali non sono adatti alla cattura massale, in quanto rimuoverebbero solo i maschi iperparassitoidi dalla coltura di interesse agrario, mentre tali infochimici potrebbero essere utilizzati nel monitoraggio con l'ausilio di trappole. Tuttavia, quando l'agente di controllo biologico viene attaccato da un complesso di iperparassitoidi, le trappole dovrebbero essere innescate con differenti composti feromonalmente. L'MHO, è un feromone sessuale in *Alloxysta victrix* altamente specifico perché tale composto chimico non risulta avere attività biologica nei confronti della specie congenerica *A. brevis* (MICHÁ *et al.*, 1993; VÖLKL *et al.*, 1994). Tuttavia, l'MHO induce la dispersione del

parassitoide di afidi *Aphidius uzbekistanicus*, interferendo quindi con l'efficienza di parassitizzazione di questo agente di controllo biologico (HOLLER *et al.*, 1994).

Gli HIPVs sono di potenziale interesse per le strategie push-pull data la loro capacità di indurre risposte comportamentali sia negli iperparassitoidi che nei loro ospiti parassitoidi. Studi sulle brassicacee hanno dimostrato che i volatili delle piante emessi in risposta all'attacco di bruchi fitofagi parassitizzati attraggono gli iperparassitoidi (POELMAN *et al.*, 2012) ed agiscono anche da repellenti per i parassitoidi primari (FATOUROS *et al.*, 2005). Si ritiene che la repellenza dei parassitoidi nei confronti di questi HIPVs riduca la competizione intraspecifica e migliori l'efficienza di ricerca, in quanto i parassitoidi eviterebbero di visitare piante infestate da fitofagi già parassitizzati. Poiché gli HIPVs emessi in risposta a fitofagi parassitizzati attraggono selettivamente gli iperparassitoidi associati ai bruchi, è auspicabile una loro implementazione nei programmi di controllo biologico. Inoltre, poiché le trappole innescate con HIPVs attirano principalmente iperparassitoidi femmine, è possibile prevedere che tali trappole possano portare ad un effettivo declino delle popolazioni di iperparassitoidi. Come illustrato precedentemente, altri infochimici inducono risposte comportamentali negli iperparassitoidi, ma poiché questi segnali (odori corporei di bruchi e idrocarburi cuticolari di afidi) sono percepiti a breve distanza, il loro valore applicativo è più limitato rispetto agli HIPVs, in quanto questi ultimi sono generalmente percepiti a distanze maggiori.

In conclusione, per controllare gli iperparassitoidi con strategie push-pull, sarebbe auspicabile combinare gli stimoli più promettenti attualmente disponibili (HIPVs come componente pull, feromoni come componente push) per ottenere molteplici finalità, quali: (a) protezione dei parassitoidi, il che è particolarmente importante quando lo stadio dell'agente di controllo biologico rilasciato nella coltura agraria è anche lo stadio suscettibile di attacco da parte degli iperparassitoidi; (b) attrazione degli iperparassitoidi adulti verso trappole innescate con infochimici; (c) repellenza dei parassitoidi primari nei confronti delle trappole innescate con gli stessi infochimici (Figura 3).

#### CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Gli studi sull'ecologia chimica degli iperparassitoidi obbligati hanno evidenziato che questi organismi appartenenti al quarto livello trofico rispondono a una varietà di segnali chimici emessi sia dalle piante che dagli insetti. Tuttavia, al fine di utilizzare gli infochimici nelle strategie di gestione degli iperparassitoidi per il controllo biologico, è necessaria una comprensione più approfondita della loro ecologia chimica. Colmare questo gap di conoscenze sarà sia difficoltoso che stimolante, data la diversità tassonomica degli iperparassitoidi in grado di attaccare specie di parassitoidi utilizzati quali agenti di controllo biologico. Allo stato attuale poco si conosce sugli infochimici che potrebbero essere utilizzati come "push" al fine di "allontanare" gli iperparassitoidi dai loro ospiti parassitoidi.

Infatti, le informazioni attuali sull'ecologia chimica degli iperparassitoidi sono frammentarie e sparse in diversi sistemi biologici, rendendo difficoltose possibili generalizzazioni. In particolare, non è ancora chiaro se gli HIPVs svolgano un ruolo chiave nella ricerca dell'ospite da parte degli iperparassitoidi e di conseguenza quale sia il vero potenziale applicativo di tali infochimici per lo sviluppo di tecniche push-pull. Ad oggi, è ben noto infatti che gli iperparassitoidi associati ai bruchi di lepidotteri sono in grado di discriminare tra HIPVs indotti da fitofagi parassitizzati e non, ma resta da dimostrare se tale discriminazione esista anche negli iperparassitoidi associati agli afidi.

In futuro, la ricerca dovrebbe concentrarsi nell'identificare le molecole biologicamente attive nel processo di localizzazione degli iperparassitoidi, focalizzandosi in particolare sugli iperparassitoidi associati agli afidi perché questi ultimi sono spesso in grado di interferire nel controllo biologico in serra (BLOEMHARD *et al.*, 2014). Al fine di raggiungere tale obiettivo, una possibile road-map dovrebbe includere le seguenti fasi: (1) caratterizzazione chimica di miscele di composti coinvolte nelle risposte comportamentali (attrazione/repellenza) degli iperparassitoidi; (2) studi di elettro-antennografia (EAG) e/o test comportamentali con composti chimici di sintesi per selezionare un pool di infochimici da utilizzare in test successivi; (3) test in serra (o di campo) con composti candidati precedentemente selezionati, inclusa la valutazione dell'impatto su organismi non target, in particolare sui parassitoidi utilizzati come agenti di controllo biologico. Attualmente sono già stati identificati diversi composti con attività feromonale negli iperparassitoidi associati agli afidi e questi infochimici potrebbero già essere testati in serra (fase 3). Sfortunatamente, composti attrattivi quali l'MHO (già disponibile in commercio) inducono anche un effetto non-target di dispersione dei parassitoidi, ed è quindi necessaria un'attenta analisi per valutare se i vantaggi derivanti dall'uso di trappole innescate con MHO superino gli svantaggi derivanti da una potenziale riduzione dell'efficienza dei parassitoidi.

Lo sviluppo di strategie di gestione degli iperparassitoidi trova migliori possibilità applicative in ambienti confinati come le serre, sia dal punto di vista economico che biologico. In ambienti confinati, è stato dimostrato che gli iperparassitoidi possono causare l'estinzione di popolazioni locali di parassitoidi usati quali agenti di controllo biologico (SCHOOLER *et al.*, 2011). Lo sviluppo di metodi di controllo biologico efficienti è quindi necessario soprattutto nell'agricoltura protetta, considerando l'alto reddito di tali colture, la progressiva riduzione di pesticidi utilizzabili, ed i rischi a cui sono esposti gli agricoltori che operano in ambienti confinati (VAN LENTEREN, 2000). Inoltre, le condizioni ambientali sono molto più variabili in campo aperto che in serra, e tale variabilità può essere un serio ostacolo all'implementazione di strategie di successo basate sugli infochimici. In effetti, esiste una vasta letteratura che dimostra come i parassitoidi e altri artropodi carnivori vengano attratti dagli infochimici in condizioni di laboratorio, ma gli studi in campo sono limitati, con insuccessi spesso dovuti alla complessità degli agroecosistemi di pieno cam-

po (LEWIS *et al.*, 1979; GROSS, 1981; MEINERS e PERI, 2013; BRUCE *et al.*, 2015). In serra, l'uso di infochimici non è stata ancora preso in considerazione in un contesto di controllo biologico, perché l'attenzione degli agricoltori si è concentrata sui parassitoidi del terzo livello trofico i quali sono rilasciati in un ambiente confinato, quindi con pochi rischi di dispersione nelle aree circostanti (MESSELINK *et al.*, 2014). Tuttavia, la crescente consapevolezza che gli iperparassitoidi possono seriamente limitare l'efficacia dei parassitoidi usati nel controllo biologico, potrebbe aprire nuovi scenari per l'implementazione di infochimici nelle serre.

In conclusione, in futuro potrebbe essere possibile gestire gli iperparassitoidi in serra attraverso approcci sostenibili, ma sono ancora necessari studi al fine di sviluppare strategie efficaci di tipo "push-pull". In questo lavoro, abbiamo voluto delineare delle linee di ricerca che potrebbero portare all'implementazione di strategie eco-compatibili in ambienti agricoli confinati, specialmente quando gli iperparassitoidi interferiscono nel controllo biologico aumentativo basato sul rilascio di parassitoidi degli afidi.

#### RIASSUNTO

Gli iperparassitoidi sono insetti del quarto livello trofico ampiamente presenti nelle reti trofiche terrestri, tuttavia sono organismi poco studiati. Vi è una crescente consapevolezza che questi nemici naturali degli insetti parassitoidi possono interferire con il controllo biologico comportando un incremento della densità di popolazione dei fitofagi. Ciò è particolarmente evidente in ambienti confinati quali le colture in serra ove si utilizza il controllo biologico aumentativo. Attualmente non esiste una strategia eco-sostenibile efficace che possa essere utilizzata per controllare gli iperparassitoidi. I recenti progressi nell'ecologia chimica di questi insetti rappresentano delle opportunità per manipolare il comportamento degli iperparassitoidi e consentire un efficiente controllo biologico. In questo manoscritto, vengono proposte strategie per modificare il comportamento degli insetti iperparassitoidi attraverso l'utilizzo di composti chimici impiegati nella comunicazione intra- ed inter-specifica (infochimici). In particolare, viene discussa la strategia "push-pull" al fine di allontanare (= push) gli iperparassitoidi dalle colture agrarie ed attrarli (= pull) in delle trappole.

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Erik H. Poelman (Wageningen University, Laboratory of Entomology) per le stimolanti discussioni sull'ecologia degli iperparassitoidi obbligati.

#### BIBLIOGRAFIA

BECK J.J., VANNETTE R.L., 2017 – *Harnessing insect-microbe chemical communications to control insect pests of agricultural systems*. - J. Agric. Food. Chem., 65: 23-28.



- BLOEMHARD C.M.J., VAN DER WIELEN M., MESSELINK G.J., 2014 – *Seasonal abundance of aphid hyperparasitoids in organic greenhouse crops in The Netherlands*. - IOBC-WPRS Bulletin, 102:15-19.
- BRUCE T.J.A., ARADOTTIR G.I., SMART L.E., MARTIN J.L., CAULFIELD J.C., DOHERTY A., SPARKS C.A., WOODCOCK C.M., BIRKETT M.A., NAPIER J.A., JONES H.D., PICKETT J.A., 2015 – *The first crop plant genetically engineered to release an insect pheromone for defence*. - Scientific Reports, 5:11183.
- BUDENBERG W.J., 1990 – *Honeydew as a contact kairomone for aphid parasitoids*. - Entomol. Exp. Appl., 55:139-148.
- BUITENHUIS R., MCNEIL J.N., BOIVIN G., BRODEUR J., 2004 – *The role of honeydew in host searching of aphid hyperparasitoids*. - J. Chem. Ecol., 30: 273-285.
- BUITENHUIS R., VET L.E.M., BOIVIN G., BRODEUR J., 2005 – *Foraging behavior at the fourth trophic level: a comparative study of host location in aphid hyperparasitoids*. - Entomol. Exp. Appl., 114: 107-117.
- COOK S.M., KHAN Z.R., PICKETT J.A., 2007 – *The use of push-pull strategies in integrated pest management*. - Ann. Rev. Entomol., 52: 375-400.
- COOK S.M., SMART L.E., MARTIN J.L., MURRAY D.A., WATTS N.P., WILLIAMS I.H., 2006 – *Exploitation of host plant preferences in pest management strategies for oilseed rape (Brassica napus)*. - Entomol. Exp. Appl., 119: 221-229.
- COWLES R.S., MILLER J.R., 1992 – *Diverting Delia antiqua (Diptera, Anthomyiidae) ovipositing with cull onions - Field studies on planting depth and a greenhouse test of the stimulo-deterrent concept*. - Environ. Entomol., 21: 453-460.
- CUSUMANO A., HARVEY J.A., DICKE M., POELMAN E.H., 2019 – *Hyperparasitoids exploit herbivore-induced plant volatiles during host location to assess host quality and non-host identity*. - Oecologia, 189: 699-709.
- CUSUMANO A., HARVEY J.A., BOURNE M.E., POELMAN E.H., DE BOER J.G., 2020 – *Exploiting chemical ecology to manage hyperparasitoids in biological control of arthropod pests*. - Pest Manag. Sci., 76: 432-443.
- DAVIS T.S., CRIPPEN T.L., HOFSTETTER R.W., TOMBERLIN J.K., 2013 – *Microbial volatile emissions as insect semiochemicals*. - J. Chem. Ecol., 39: 840-859.
- DE BOER J.G., SALIS L., TOLLENAAR W., VAN HEUMEN L. J.M., COSTAZ T.P.M., HARVEY J.A., KOS M., VET L.E.M., 2019 - *Effects of temperature and food source on reproduction and longevity of aphid hyperparasitoids of the genera Dendrocerus and Asaphes*. - BioControl; 64: 277-290.
- DURAIMURUGAN P., REGUPATHY A., 2005 – *Push-pull strategy with trap crops, neem and nuclear polyhedrosis virus for insecticide resistance management in Helicoverpa armigera (Hubner) in cotton*. - Am. J. Appl. Sci., 2: 1042-1048.
- EIGENBRODE S.D., BIRCH A.N.E., LINDZEY S., MEADOW R., SNYDER W.E., 2016 – *A mechanistic framework to improve understanding and applications of push-pull systems in pest management*. - J. Appl. Ecol., 53: 202-212.
- Fatouros N.E., Van Loon J.J.A., Hordijk K.A., Smid H.M., Dicke M., 2015 – *Herbivore-induced plant volatiles mediate in-flight host discrimination by parasitoids*. - J. Chem. Ecol., 31: 2033-2047.
- GRASSWITZ T.R., 1998 – *Contact kairomones mediating the foraging behavior of the aphid hyperparasitoid Alloxysta victrix (Westwood) (Hymenoptera: Charipidae)*. - J. Insect Behav., 11: 539-548.
- GROSS H.R., 1981 – *Employment of kairomones in the management of parasitoids*. In Semiochemicals: Their Role in Pest Control, ed. by Nordlund DA, Jones RL and Lewis WJ. John Wiley & Sons: New York, pp. 137-150.
- HANKS L.M., MILLAR J.G., 2016 – *Sex and aggregation-sex pheromones of cerambycid beetles: Basic science and practical applications*. - J. Chem. Ecol., 42: 631-654.
- HARVEY J.A., SNAAS H., MALCICKA M., VISSER B., BEZEMER T.M., 2014 – *Small-scale spatial resource partitioning in a hyperparasitoid community*. - Arthropod-Plant Interactions, 8: 393-401.
- HOLLER C., MICHA S.G., SCHULZ S., FRANCKE W., PICKETT J.A., 1994 – *Enemy-induced dispersal in a parasitic wasp*. Experientia, 50: 182-185.
- HOLLER C., BORGEMEISTER C., HAARDT H., POWELL W., 1993 – *The relationship between primary parasitoids and hyperparasitoids of cereal aphids: an analysis of field data*. - J. Anim. Ecol., 62: 12-21.
- JACOBSEN M., 1972 – *Insect sex pheromones*. Academic Press, New York.
- KHAN Z.R., AMPONG-NYARKO K., CHILISWA P., HASSANALI A., KIMANI S., LWANDE W., OVERHOLT W.A., PICKETT J.A., SMART L.E., WADHAMS L.J., WOODCOCK C.M., 1997 – *Intercropping increases parasitism of pests*. - Nature, 388: 631-632.
- KHAN Z.R., PICKETT J.A., 2004 – *The 'push-pull' strategy for stemborer management: a case study in exploiting biodiversity and chemical ecology*. In Ecological Engineering for Pest Management: Advances in Habitat Manipulation for Arthropods, ed. by Gurr GM, Wratten SD and Altieri MA. CABI: Wallington, Oxon, U.K., pp. 155-164.
- KHAN Z.R., MIDEGA C.A.O., HUTTER N.J., WILKINS R.M., WADHAMS L.J., 2006 – *Assessment of the potential of Napier grass (Pennisetum purpureum) varieties as trap plants for management of Chilo partellus*. - Entomol. Exp. Appl., 119: 15-22.
- KELLOGG S.K., FINK L.S., BROWER L.P., 2003 – *Parasitism of native luna moths, Actias luna (L.) (Lepidoptera: Saturniidae) by the introduced Compsilura concinnata (Meigen) (Diptera: Tachinidae) in central Virginia, and their hyperparasitism by trigonalid wasps (Hymenoptera: Trigonalidae)*. - Environ. Entomol., 32: 1019-1027.
- LEWIS W.J., BEEVERS M., NORDLUND D.A., GROSS H.R.J., HAGEN K.S., 1979 – *Kairomones and their use for management of entomophagous insects. IX. Investi-*

- gations of various kairomone treatment patterns for Trichogramma spp.* - J. Chem. Ecol., 5: 673-680.
- McDONALD R.C., KOK L.T., 1991 – *Hyperparasites attacking Cotesia glomerata (L.) and Cotesia rubecula (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae) in Southwestern Virginia.* - Biol. Control., 1: 170-175.
- MEINERS T., PERI E., 2013 – *Chemical ecology of insect parasitoids: essential elements for developing effective biological control programmes.* In Chemical ecology of insect parasitoids, ed. by Wajnberg E and Colazza S. Wiley-Blackwell: U.K., pp. 193–224.
- MESSELINK G.J., BENNISON J., ALOMAR O., INGEGNO B.L., TAVELLA L., SHIPP L., PALEVSKY E., WÄCKERS F.L., 2014 – *Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects.* - BioControl; 59: 377-393.
- MICHA S.G., STAMMEL J., HOLLER C., 1993 – *6-Methyl-5-heptene-2-one, A putative sex and spacing pheromone of the aphid hyperparasitoid, Alloxysta victrix (Hymenoptera, Alloxystidae).* - Eur. J. Entomol., 90: 439-442.
- MITSUNAGA T., NAGASAKA K., MORIYA S., 2014 – *Development and parasitization of an aphid's secondary parasitoid, Dendrocerus laticeps (Hymenoptera: Megaspilidae), on Aphidius colemani (Hymenoptera: Braconidae).* - Appl. Entomol. Zool., 49: 511-518.
- MUMM R., DICKE M., 2010 – *Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense.* - Can. J. Zool., 88: 628-667.
- NALYANYA G., MOORE C.B., SCHAL C., 2000 – *Integration of repellents, attractants, and insecticides in a "push-pull" strategy for managing German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) populations.* - J. Med. Entomol., 37: 427-434.
- PICKETT J.A., WADHAMS L.J., WOODCOCK C.M., 1997 – *Developing sustainable pest control from chemical ecology.* - Agric. Ecosyst. Environ., 64: 149-156.
- PICKETT J.A., WOODCOCK C.M., MIDEGA C.A.O., KHAN Z.R., 2014 – *Push-pull farming systems.* - Curr. Opin. Biotechnol., 26: 125-132.
- POELMAN E.H., BRUINSMAN M., ZHU F., WELDEGERGIS B.T., BOURSALT A.E., JONGEMA Y., VAN LOON J.J.A., VET L.E.M., HARVEY J.A., DICKE M., 2012 – *Hyperparasitoids use herbivore-induced plant volatiles to locate their parasitoid host.* - Plos Biology; 10: e1001435.
- POELMAN E.H., CUSUMANO A., DE BOER J.G., – *The ecology of hyperparasitoids.* – Annu. Rev. Entomol., 67: 143-161.
- RODRIGUEZ-SAONA C., BLAAUW B.R., ISAACS R., 2012 – *Manipulation of natural enemies in agroecosystems: habitat and semiochemicals for sustainable insect pest control.* In Integrated Pest Management and Pest Control: Current and Future Tactics, ed. by Larramendy ML and Soloneski S. InTech: Rijeka, Croatia, pp. 89-126.
- RODRIGUEZ-SAONA C.R., STELINSKI L.L., 2009 – *Behavior-modifying strategies in IPM: theory and practice.* In Integrated Pest Management: Innovation Development Process, ed. by Peshin R and Dhawan AK. Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 263-315.
- RHAINDS M., MESSING R.H., 2005 – *Spatial and temporal density dependence in a population of melon aphid, Aphis gossypii Glover (Homoptera: Aphididae), on established and sentinel taro plants.* - Appl. Entomol. Zool., 40: 273-282.
- SCHOOLER S.S., DE BARRO P., IVES A.R., 2011 – *The potential for hyperparasitism to compromise biological control: Why don't hyperparasitoids drive their primary parasitoid hosts extinct?* - Biol. Control., 58: 167-173.
- SCHWORER U., VÖLKL W., HOFFMANN K.H., 1999 – *Foraging for mates in the hyperparasitic wasp, Dendrocerus carpenteri: impact of unfavourable weather conditions and parasitoid age.* Oecologia, 119: 73-80.
- SIRI N., 1993 – *Analysis of host finding behaviour of two aphid hyperparasitoids (Hymenoptera: Alloxystidae, Megaspilidae).* Christian-Albrechts University, Kiel, Germany, PhD thesis.
- VÖLKL W., HUBNER G., DETTNER K., 1994 – *Interactions between Alloxysta brevis (Hymenoptera, Cynipoidea, Alloxystidae) and honeydew-collecting ants - How an aphid-hyperparasitoid overcomes ant aggression by chemical defense.* - J. Chem. Ecol., 20: 2901-2915.
- VAN LENTEREN J.C., 2000 – *A greenhouse without pesticides: fact or fantasy?* Crop Prot., 19: 375-384.
- VÖLKL W., SULLIVAN D.J., 2000 – *Foraging behaviour, host plant and host location in the aphid hyperparasitoid Euneura augarus.* - Entomol. Exp. Appl., 97: 47-56.
- WITZGALL P., KIRSCH P., CORK A., 2010 – *Sex pheromones and their impact on pest management.* - J. Chem. Ecol., 36:80-100.
- ZHU F., WELDEGERGIS B.T., LHIE B., HARVEY J.A., DICKE M., POELMAN E.H., 2014 – *Body odors of parasitized caterpillars give away the presence of parasitoid larvae to their primary hyperparasitoid enemies.* - J. Chem. Ecol., 40: 986-995.
- ZHU F., BROEKGAARDEN C., WELDEGERGIS B.T., HARVEY J.A., VOSMAN B., DICKE M., POELMAN E.H., 2015 – *Parasitism overrides herbivore identity allowing hyperparasitoids to locate their parasitoid host by using herbivore-induced plant volatiles.* - Mol. Ecol., 24: 2886-2899.

## ROOT ELICITORS ALTERING THE BEHAVIOUR OF FORAGING PARASITIODS

EMILIO GUERRIERI <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Portici - Italia*

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "Chemical Ecology in Insect parasitoids". Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 17 febbraio 2023.

### *Root elicitors altering the behaviour of foraging parasitoids*

Plants communicate through chemical signals, releasing and detecting messages for one another and their surroundings. It was previously demonstrated that uninfested *Vicia faba* (Fabaceae) plants maintained in the same pot together with plants infested by the pea aphids *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) became more attractive towards the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) than when placed in the same pot with healthy plants. Root exudates were collected from aphid infested plants using Solid-Phase Extraction (SPE) and both hydrophilic and lipophilic compounds were identified using bioassay-guided fractionation. Among the former, the non-protein amino acid L-DOPA, released from roots of *Acyrtosiphon pisum* aphid-infested *Vicia faba* plants, was found to be an active compound in triggering the production of VOCs released aboveground in uninfested plants responsible for the enhanced attractiveness towards the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. The same positive effect on *Aphidius ervi* was recorded treating uninfested plants with three small lipophilic volatile compounds isolated from the exudates of aphid infested plants: 1-Octen-3-ol, Sulcatone and Sulcatol. Root released compounds add to the list of plant elicitors of direct and indirect defences and constitute a further sustainable tool for reducing the pesticide-dependency of modern agriculture.

KEY WORDS: Root exudates, hydrophilic compounds, lipophilic compounds, Aphids

### INTRODUCTION

Plant communication with other organisms mainly relies on the release of constitutive or stress-induced chemical signals that travel both through the air headspace or the soil matrix (KARBAN, 2008; ERB *et al.*, 2015). In the rhizosphere, comprising the complex soil environment in close contact with plant roots, plants contribute a steady production of root exudates, including ions, free oxygen and water, enzymes, mucilage, and a variety of other secondary metabolites. Once released, root exudates can function as signals regulating plant-microbe (BADRI & VIVANCO, 2009), plant-animal (JOHNSON & RASMANN, 2015) and plant-plant interactions (BAIS *et al.*, 2006). Belowground plant-plant communication has been proven to mediate key ecological interactions, such as competition and facilitation, in both natural and applied systems, and several molecules have been identified as key agents of chemical communication (VAN DAM & BOUWMEESTER, 2016).

Belowground signaling (and in turn the elicitors involved) is, under several circumstances, more efficient than aboveground signaling because: the information can travel via exudates (liquid state) and volatile compounds (gaseous state), the incidence of wind, temperature, humidity and UV radiation, is far less subject to high fluctuations in respect to aboveground. Belowground communication is also enhanced by the presence mycorrhizal fungi, whose mycelia constitute a large web generating multiple interactions (Fig. 1).

The ecological impact of root elicitors is far from be-

ing unveiled. However, an alert signal travelling belowground could amplify an individual response up to a set of neighbouring individuals. Nonetheless, this phenomenon is likely to require roots to grow in close proximity, as it is the case for an agricultural system, or within a

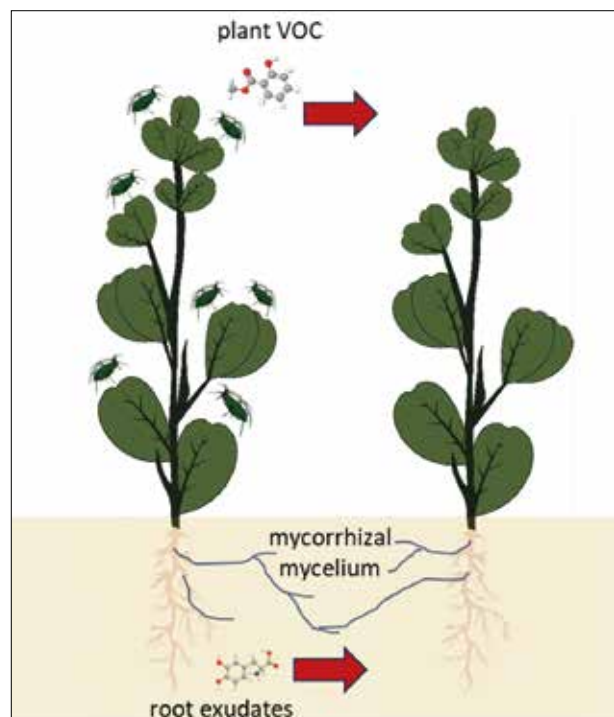


Fig. 1 - Schematic representation of plant-plant communication above and below ground.

grassland dominated by few plant species. Accordingly, a larger number of plant individuals warned against a sudden herbivore attack could be more efficient in facing it, by for instance attracting a large number of predators or parasitoids, than if only one individual would be sending the alert signal.

In a pioneering experiment conducted in hydroponic solution (Fig. 2), it was demonstrated that uninfested *Vicia faba* (Fabaceae) plants maintained in the same pot together with plants infested by the pea aphids *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) became more attractive towards the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) than when placed in the same pot with healthy plants (GUERRIERI *et al.*, 2002). This change in attractiveness was not observed when root contact was prevented among plants that had their aerial parts in close proximity, and thus freely exchanging aboveground volatile organic compounds (VOCs) (GUERRIERI *et al.*, 2002). These results were further confirmed using hydroponic growing conditions. Uninfested *V. faba* plants placed in hydroponic solution that was previously used to grow aphid-infested plants became attractive to *A. ervi* parasitoids, whereas placing them in the hydroponic solution of uninfested plants did not change their attractiveness (GUERRIERI *et al.*, 2002). It was therefore predicted that aphid-damaged plants would be induced to produce a unique blend of molecules that elicits a response in neighbouring plants if in contact through the soil matrix.

In order to characterize the elicitors involved in these interactions the hydroponic solution from uninfested (P) and infested (P+A) plants was collected and filtered using filter paper to remove any debris and small polar and lipophilic compounds from water organic compounds present in the solutions extracted by solid-phase extraction (SPE) (CASCONE *et al.*, 2023a, b).

#### BIOASSAY-GUIDED FRACTIONATION OF ROOT EXUDATES AND IDENTIFICATION OF HYDROPHILIC ELICITORS

The chemical signal present in P+A root exudate was identified by bioassay-guided fractionation giving three fractions of different polarities collected at 0-15min (Fraction 1), 15-40min (Fraction 2) and from 40-55 min (Fraction 3) (Fig. 2) (CASCONE *et al.*, 2023a).

These fractions were tested in wind tunnel for their effect in eliciting an indirect defensive response in terms of attractiveness towards the aphid parasitoid *Aphidius ervi* when added to the hydroponic solution of uninfested plants. Seven times more *A. ervi* oriented to and landed on *V. faba* plants treated with *fraction 1* (the most polar fraction) from P+A, compared with the similar HPLC fraction of P (Fig. 1C; G test,  $\chi = 45.297$ ,  $p < 0.001$ ; G test,  $\chi = 11.514$ ,  $p < 0.001$ ). No significant synergistic effects of combining fractions were observed for oriented flights and landings (Fig. 1C; G test,  $\chi = 3.306$ ,  $p = 0.069$ ; G test,  $\chi = 0.471$ ,  $p = 0.492$ ).

*Fraction 1* was then further fractionated into four subfractions of different polarities collected at 0-6min (Fraction 1a), 6-12 min (Fraction 1b), 12-24 min (Fraction 1c) and 24-55 min (Fraction 1d). Among them, both Fraction 1a and 1d subfractions showed to elicit the most significant effect of indirect defence in terms of oriented flights (Fig. 1D; G test,  $\chi = 38.339$ ,  $p < 0.001$ , G test,  $\chi = 43.625$ ,  $p < 0.001$ , respectively) and landings (Fig. 1D; G test,  $\chi = 20.723$ ,  $p < 0.001$ , G test,  $\chi = 14.748$ ,  $p < 0.001$ , respectively) in uninfested *V. faba* plants (Fig. 3)

Thus, by further analysing fraction 1a using peak enhancement by co-injection with enantiomerically pure authentic standards, L-DOPA (RT=4.276 min under our HPLC conditions) (Fig. 5) was identified as one key active compound mediating plant-plant communication. The estimated amount of exuded L-DOPA by

infested plants was 5.67  $\mu\text{g/g/day}$  and by uninfested plants was 4.95  $\mu\text{g/g/day}$  (ANOVA,  $df=1$ ,  $p=0.001$ ). Subsequent bioassays using pure compounds showed that about 5 times more *A. ervi* oriented to (G test,  $\chi = 48.643$ ,  $p < 0.001$ ) and about 3 times more landed on (G test,  $\chi = 16.794$ ,  $p < 0.001$ ), *V. faba* plants grown in hydroponic solution treated with L-DOPA relative to when treated with D-DOPA (at both concentrations of 0.1 ppm and 0.01 ppm) and relative to untreated *V. faba* plants (Fig. 6), indicating enantiomers-dependent activity. No dose-dependent effect was noted for L-DOPA in terms of oriented flights (Fig. 6; 0.01ppm: 35.4% vs 0.1ppm: 48.4%; G test,  $\chi = 3.378$ ,  $p = 0.066$ ) and landings (Fig. 6; 0.01ppm: 18.7% vs 0.1ppm: 24.7%; G test,  $\chi = 0.656$ ,  $p = 0.418$ ). These response patterns were subsequently confirmed by

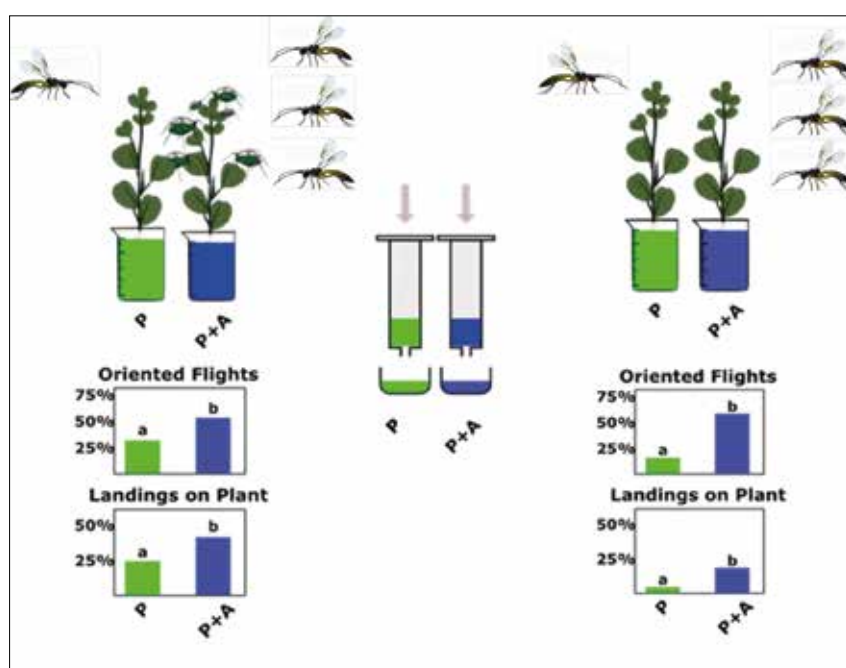


Fig. 2 - Evidence of the release of root elicitors by aphid infested plants

performing experiments with plants grown in soil and treated with synthetic L-DOPA at a dose of 0.1 ppm (Fig. 6; G test,  $\chi = 27.496$ ,  $p < 0.001$ ; G test,  $\chi = 11.121$ ,  $p < 0.001$ ).

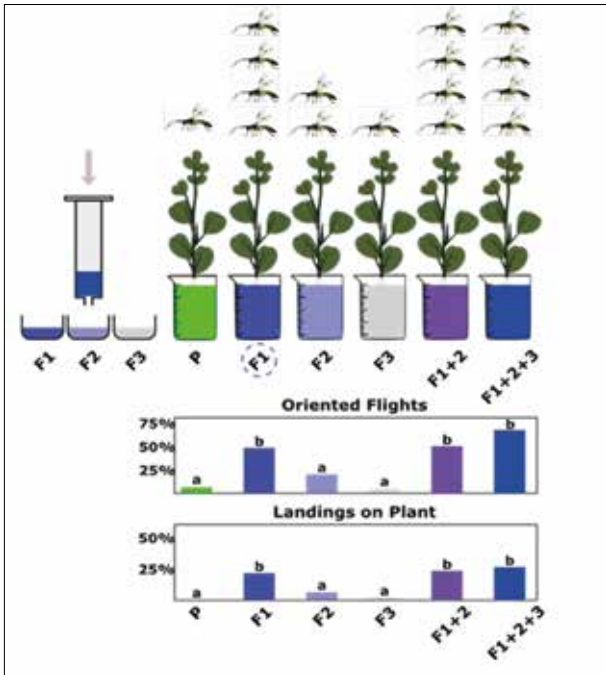


Fig. 3 - Effect of different fractions of hydrophilic extract on the foraging behaviour of *Aphidius ervi*.

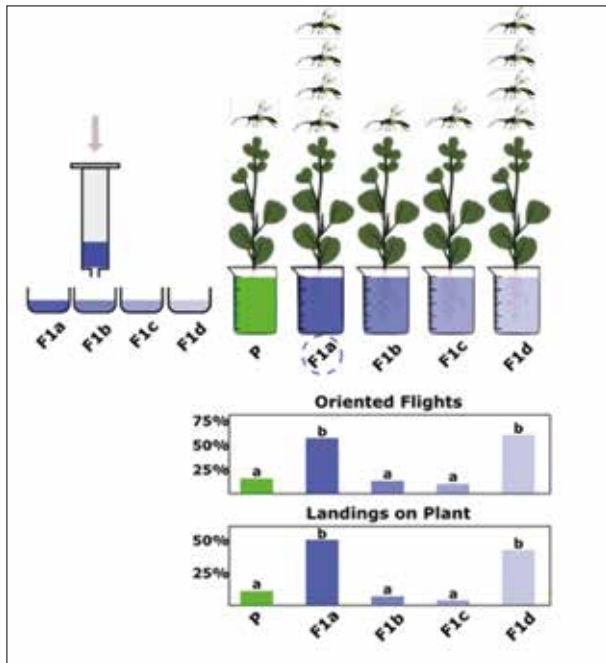


Fig. 4 - Effect of different subfractions of hydrophilic extract on the foraging behaviour of *Aphidius ervi*.

The higher attractiveness of uninfested *V. faba* plants towards *A. ervi* when treated with L-DOPA was related to the release of volatile organic compounds known to play a role in the foraging behaviour of this parasitoid. Across all VOCs collected L-DOPA-treated plants released 10

times and 5 times more methyl salicylate, 3 times and 4 times more of the sesquiterpene (E)-ocimene, 3 times and 7 times more (E)-caryophyllene than control (untreated) and D-DOPA treated plants, respectively (Fig. 7).

The involvement of a brain neurotransmitter in plant-plant communication is not that surprising considering that the leaves and pods of *V. faba* plants contain high quantities of L-DOPA (BURBANO *et al.* 1995), whose presence can affect the community of insect herbivores attacking these plants. Accordingly, it has been shown that L-DOPA is detrimental for most generalist herbivores, whilst it is exploited in different ways by specialists. For example, it was shown that *A. pisum* can sequester this compound, which was reported to provide benefits for wound healing and protection against UVA-radiation (HUANG *et al.*, 2011).

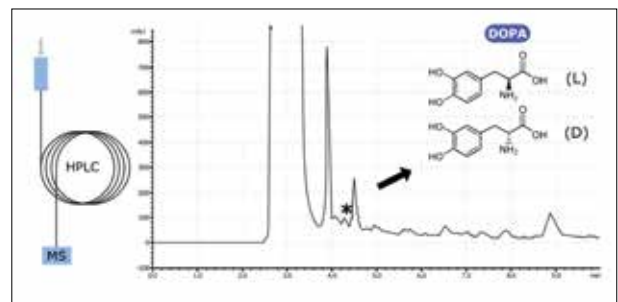


Fig. 5 - Identification of L-DOPA in the subfraction 1a of aphid-infested *Vicia faba* root exudates.

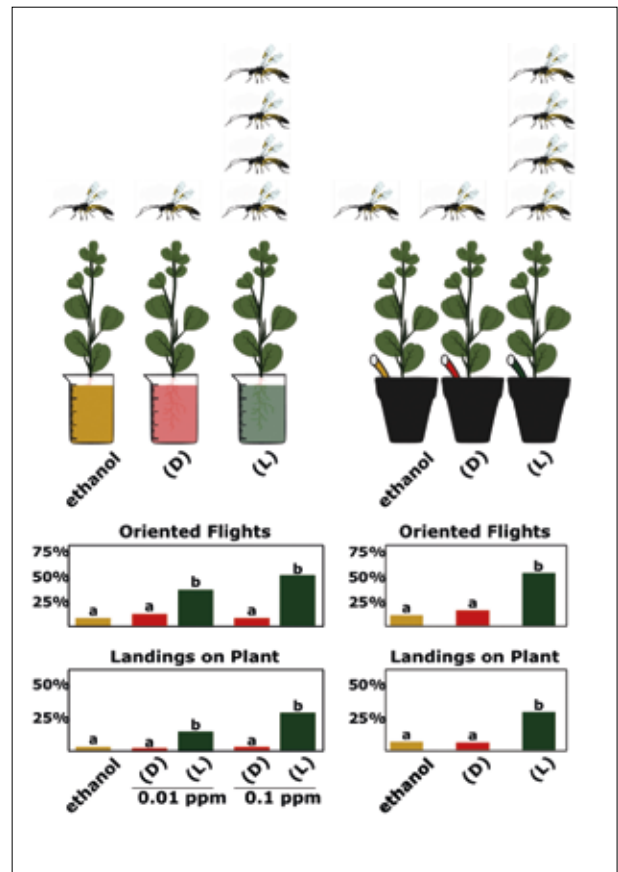


Fig. 6 - The eliciting effect of L-DOPA on *Aphidius ervi* foraging behaviour.

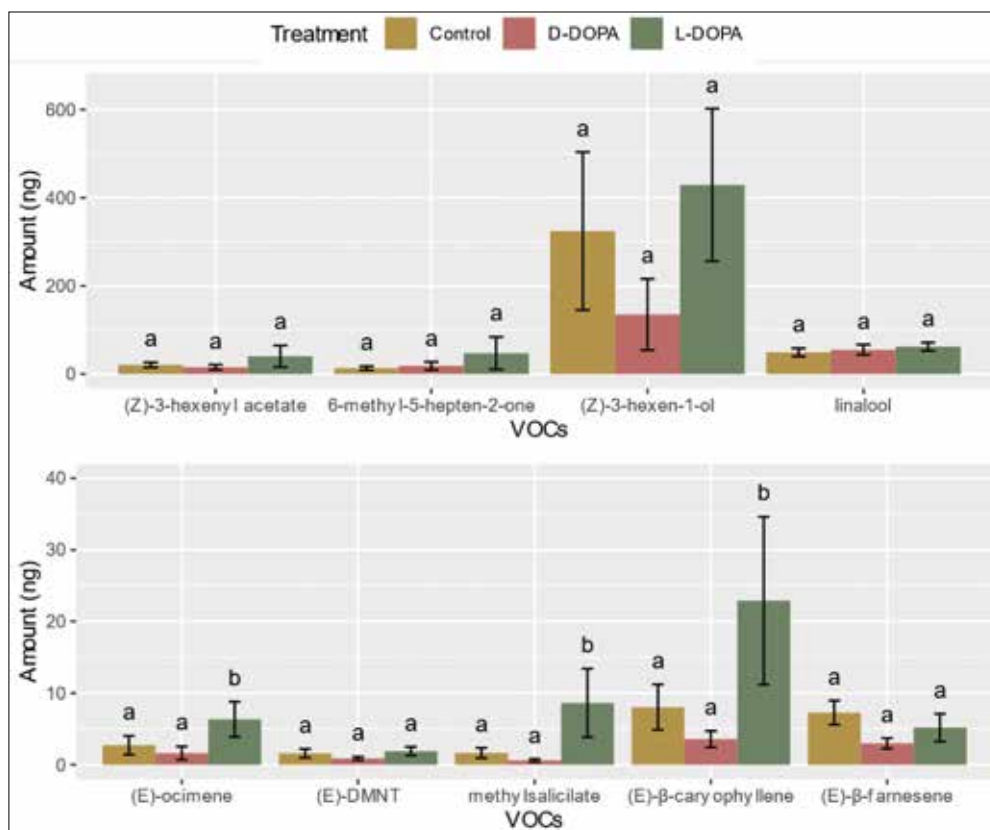


Fig. 7 - Differential effect of L-DOPA on the release of VOC by uninfested *V. faba* plants.

SVLM	Uninfested (n=8)	Infested by aphids (n=8)
	(µg±SE)	
Sulcatone	0.033±0.003	0.189±0.014
1-Octen-3-ol	0.145±0.034	0.258±0.045
Sulcatol	0.046±0.031	0.519±0.038

Fig. 8 - Relative quantities of SLVM released by *Vicia faba* plants.

BIOASSAY-GUIDED IDENTIFICATION OF LIPOPHILIC ELICITORS

From the hydroponic solution of aphid infested *Vicia faba* plants, three Small Lipophilic Volatile Compound were found to be released in significant higher quantities in respect to uninfested controls (Fig. 8): Sulcatone (KI 1346), 1-Octen-3-ol (KI 1449) and Sulcatol (KI 1465) (CASCONE *et al.*, 2023b).

The effect of these compounds on the attractiveness of uninfested broad bean plants towards *A. ervi* was always higher in respect to the control treatment (ethanol) and a synergistic effect of the combined application was recorded (Fig. 9).

In detail the SVLM (*R*)-1-Octen-3-ol (G test, of:  $\chi^2 =$

11.043,  $p = 0.001$ ; ls:  $\chi^2 = 7.132$ ,  $p = 0.008$ ) and (*R*)-Sulcatol (G test, of:  $\chi^2 = 35.72$ ,  $p < 0.001$ ; ls:  $\chi^2 = 27.217$ ,  $p < 0.001$ ) elicited a statistically significant higher response in terms of oriented flights (7 and 15 times more than ethanol control, respectively) and landings on source (9 and 27 times more than ethanol, respectively) by *A. ervi* in respect to the two (*S*)-enantiomers. The treatment with Sulcatone was statistically significant compared to the control only for the oriented flights (4 times more than ethanol) of the parasitoid (G test,  $\chi^2 = 5.154$ ,  $p = 0.023$ ). The racemic mixtures of Sulcatol a+b (G test, of:  $\chi^2 = 32.476$ ,  $p = 0$ ; ls:  $\chi^2 = 27.217$ ,  $p < 0.001$ ) and 1-Octen-3-ol d+e (G test, of:  $\chi^2 = 9.669$ ,  $p = 0.002$ ; ls:  $\chi^2 = 8.163$ ,  $p = 0.004$ ) elicited a statistically higher response in *A. ervi* compared with the control in terms of oriented flights (14 and 6 times more than ethanol, respectively) and landings (27 and 10 more than ethanol, respectively), but not different from the respective *R*-enantiomers (G test, of:  $\chi^2 = 0.095$ ,  $p = 0.758$ , ls:  $\chi^2 = 0$ ,  $p = 1$  / of:  $\chi^2 = 0.055$ ,  $p = 0.814$ , ls:  $\chi^2 = 0.039$ ,  $p$

$= 0.843$ ). Following the results with single compounds and racemic mixtures we tested the 3-compounds mixture comprising only the respective active (*R*)-enantiomers and Sulcatone. The mixture of (*R*)-1-Octen-3-ol, (*R*)-Sulcatol and Sulcatone caused an average of 5-fold significant increase in parasitoid oriented flight response compared to the single compounds (*i.e.* (*R*)-Sulcatol vs a+c+d, G test,  $\chi^2 = 37.64$   $p < 0.001$ ). Conversely, no synergistic effect of the 3-compound mixture on landings on source has been observed in respect to single compounds (*i.e.* G test, (*R*)-Sulcatol vs a+c+d:  $\chi^2 = 0.672$ ,  $p = 0.412$ ), but the value remained statistically higher in respect to ethanol (G test,  $\chi^2 = 35.054$ ,  $p < 0.001$ ).

A comparison of the proportion of the leaf VOCs

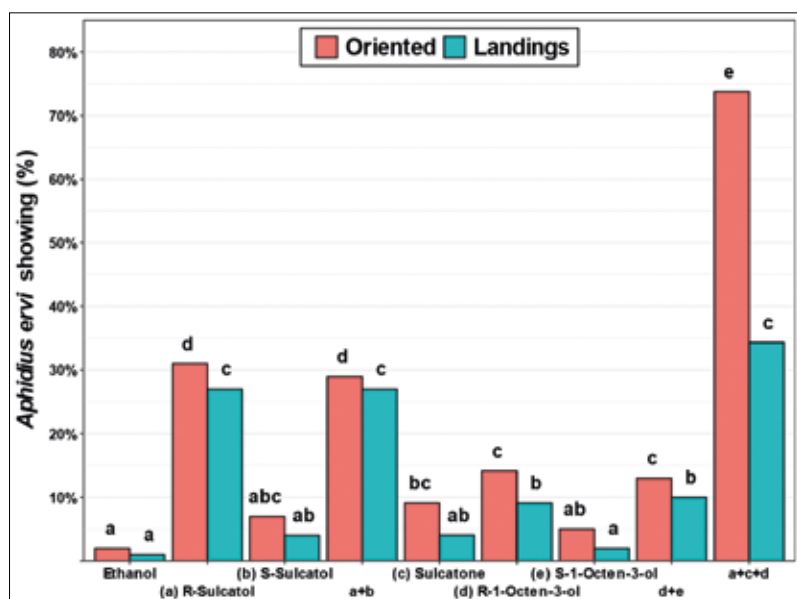


Fig. 9 - Foraging behaviour of *A. ervi* towards unfested *V. faba* plant treated with SLVM.

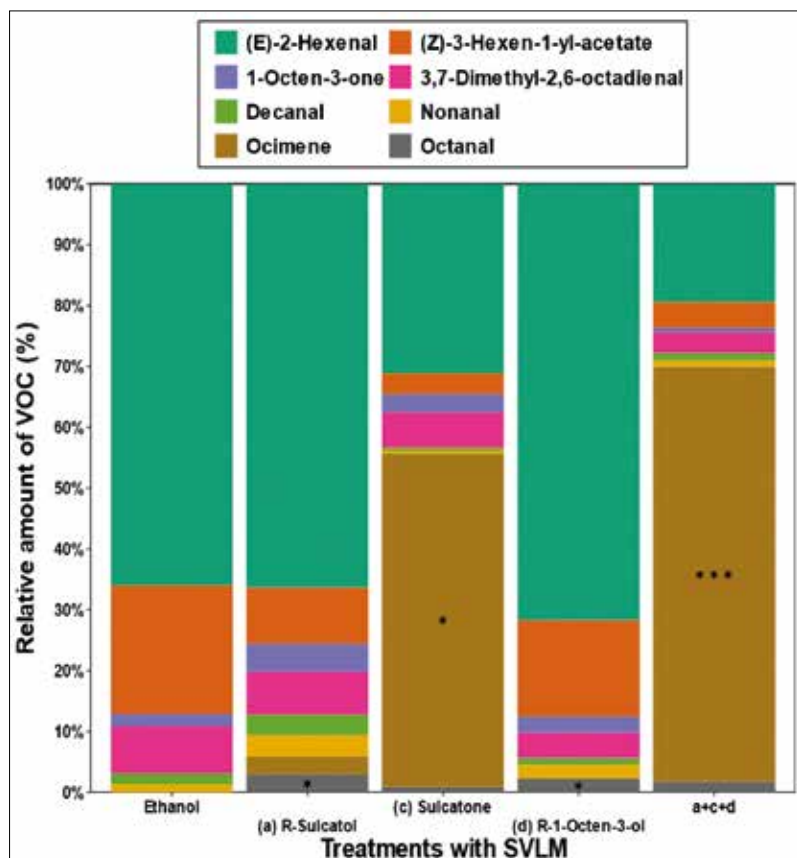


Fig. 10 - Relative release of VOC by *V. faba* plants treated with SLVM.

emitted by *V. faba* subjected to several treatments, with the proportion of VOCs emitted by relative control plants using Dirichlet regression (fig. 2), showed that (*R*)-Sulcatol increased the release of octanal ( $\beta = 2.145$ ,  $z = 2.34$ ,  $df = 33$ ,  $p = 0.019$ ), and Sulcatone treatment induced higher release of (*E*)-Ocimene ( $\beta = 2.405$ ,  $z = 2.447$ ,  $df = 33$ ,  $p = 0.014$ ) compared to the control. (*R*)-1-Octen-3-ol induce an increased emission of octanal ( $\beta = 2.03$ ,

$z = 2.192$ ,  $df = 33$ ,  $p = 0.028$ ), whereas the 3-compound mixture induced a higher release of (*E*)-ocimene ( $\beta = 3.292$ ,  $z = 3.358$ ,  $df = 33$ ,  $p = 0.001$ ) compared to treatments with single compounds (Fig. 10). These results clearly highlighted the role played by Sulcatone in triggering the release of a specific blend of VOCs, some of which are reported to be involved in the attraction of *A. ervi*. We refer in particular to the emission of (*E*)-Ocimene, a strong attractant for *A. ervi* (SASSO *et al.*, 2007; CASCONE *et al.*, 2015; TAKEMOTO and TAKABAYASHI, 2015), whose release is strictly correlated to the treatment with Sulcatone

#### SUMMARY AND FUTURE DIRECTIONS

The discovery of L-DOPA, a neurotransmitter precursor in animals, acting in the rhizosphere as a plant defensive pheromone supports the paradigm of divergent evolutionary outcomes for the activity of the same molecule, spanning the plant and animal kingdoms. Together with SLVM, this compound could represent a new frontier for the protection of agricultural systems less relying on pesticide input. In fact, elicitors of plant defence could be what pheromones have been in the late 90s. This hypothesis is supported by the high species-specificity that has been shown by the eliciting compounds identified so far.

Besides, among plant elicitors, those acting at root level could benefit of easier application, particularly if they are hydrophilic, hence compatible with vanguard agricultural systems (e.g. hydroponic).

Nonetheless, to achieve these goals, several methodological advances are required to sample root exudates in the field, also considering the role that soil microbiota plays in the degradation of these compounds. Besides, the cost of purified compounds is still prohibitive for an extensive application but the past experience with pheromones can be auspicious.

#### REFERENCES

- BADRI D.V., VIVANCO J.M., 2009 - *Regulation and function of root exudates*. - Plant, Cell Environ., 32: 666-681.
- BAIS H.P., WEIR T.L., PERRY L.G., GILROY S., VIVANCO J.M., 2006 - *The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms*. - Annu. Rev. Plant Biol., 57: 233-266.
- BURBANO C., CUADRADO C., MUZQUIZ M., CUBERO J.I.,

- 1995 - *Variation of favism-inducing factors (vicine, convicine and L-DOPA) during pod development in Vicia faba L.* - Plant Foods for Human Nutrition, 47: 265-274.
- CASCONE P., IODICE L., MAFFEI M.E., BOSSI S., ARIMURA G.I., GUERRIERI E., 2015 - *Tobacco overexpressing  $\beta$ -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants.* - J. Plant Physiol., 173: 28-32.
- CASCONE P., VUTS J., BIRKETT M. A., DEWHIRST S., RASMANN S., PICKETT J. A., GUERRIERI E., 2023a - *L-DOPA functions as a plant pheromone for belowground anti-herbivory communication.* - Ecology Letters, 26: 460-469.
- CASCONE P., VUTS J., BIRKETT M., RASMANN S., PICKETT J.A., GUERRIERI E., 2023b - *Small Volatile Lipophilic Molecules (SVLMs) induced belowground by aphid attack elicit a defensive response in neighbouring un-infested plants.* - Front. Plant Sci., 14: 1154587.
- ERB M., VEYRAT N., ROBERT C.A.M., XU H., FREY M., TON J. *et al.*, 2015 - *Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize.* Nature Communications: 6.
- GUERRIERI E., POPPY G.M., POWELL W., RAO R., PENNACCHIO F., 2002 - *Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*.* - J. Chem. Ecol., 28: 1703-1715.
- HUANG T., JANDER G., DE VOS M., 2011 - *Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and opportunities for further functional analysis.* - Phytochemistry, 72: 1531-1537.
- JOHNSON S.N., RASMANN S., 2015 - *Root-Feeding Insects and Their Interactions with Organisms in the Rhizosphere.* - Annu. Rev. Entomol., 60: 517-535.
- KARBAN R., 2008 - *Plant behaviour and communication.* - Ecol. Lett., 11: 727-739.
- SASSO R., IODICE L., DIGILIO M. C., CARRETTA A., ARIATI L., GUERRIERI E., 2007 - *Host-locating response by the aphid parasitoid *Aphidius ervi* to tomato plant volatiles.* - J. Plant Interact., 2: 175-183.
- TAKEMOTO H., TAKABAYASHI J., 2015 - *Parasitic wasps *Aphidius ervi* are more attracted to a blend of host-induced plant volatiles than to the independent compounds.* - J. Chem. Ecol., 41: 801-807.
- VAN DAM N.M., BOUWMEESTER H.J., - 2016 - *Metabologics in the rhizosphere: Tapping into belowground chemical communication.* - Trends Plant Sci., 21: 256-265.



## PHEROMONES IN THE *NASONIA* GROUP: BEHAVIOUR AND BIOCHEMISTRY

JOACHIM RUTHER <sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Regensburg, Institute of Zoology, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg, Germany

Corresponding Author: E-mail: joachim.ruther@biologie.uni-regensburg.de

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Chemical Ecology in Insect parasitoids”. Seduta pubblica dell’Accademia – Firenze, 17 febbraio 2023.

### *Pheromones in the Nasonia group: behaviour and biochemistry*

Sexual reproduction is a successful strategy found in the vast majority of animals on this planet, it results in offspring’s high genetic variation and a faster dispersal. Parasitic wasps of the genus *Nasonia* have proven to be an excellent insect model to study all aspects of pheromone communication. In this lecture, the current knowledge on the biosynthesis of male pheromones in *Nasonia* is summarized.

KEY WORDS: *Nasonia vitripennis*, male sex pheromone, de novo biosynthesis

### SYNTHESIS OF LECTURE

Sexual reproduction is a successful strategy found in the vast majority of animals on this planet. It results in offspring’s high genetic variation and a faster dispersal of beneficial as well as purging of deleterious mutations enabling faster reactions to the challenges of a changing environment (AZEVEDO *et al.*, 2006; HAMILTON *et al.*, 1990). However, sexual reproduction requires potential

partners to reliably find each other, which in many insects is enabled by chemical communication via sex pheromones (WYATT, 2014). Parasitic wasps of the genus *Nasonia* have proven to be an excellent insect model to study all aspects of pheromone communication (MAIR & RUTHER, 2019). The genus *Nasonia* consists of four species (*N. vitripennis*, *N. giraulti*, *N. longicornis* and *N. oneida*), with *N. vitripennis* occurring worldwide, while the occurrence of the other species is restricted to North

America. *N. giraulti* and *N. oneida* are sympatric with *N. vitripennis* in the east, while *N. longicornis* shares habitats with *N. vitripennis* in Western North America (MAIR & RUTHER, 2019). Mating between partners from different *Nasonia* species is possible, but Wolbachia-mediated cytoplasmic incompatibility prevents hybridisation in most species constellations (BORDENSTEIN & WERREN, 1998). Hence, species-specific mate finding is indispensable to avoid costly interspecific mating. Mate finding in *Nasonia* is mediated by male-derived sex pheromones which are highly attractive to virgin females (NIEHUIS *et al.*, 2013). After mating, however, females do no longer respond to the pheromone. In *N. vitripennis*, this behavioural switch is mediated by an oral male pheromone applied to the female’s antennae during courtship (RUTHER & HAMMERL, 2014) and subsequent dopamine release in the female’s brain (LENSCHOW *et al.*, 2018).

All *Nasonia* species use (4*R*,5*S*)-5-hydroxy-4-decanolide (RS) and 4-methylquinazoline (MQ) as pheromone

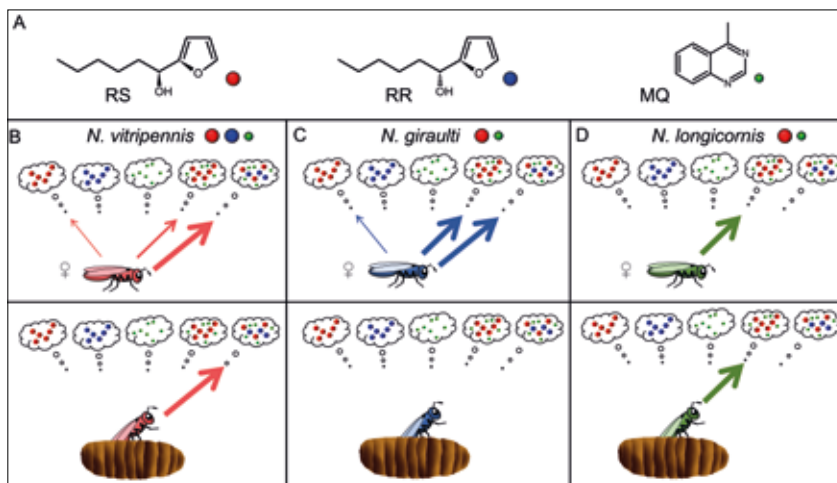


Fig. 1 - (A) Structures of the components of the male abdominal sex pheromones in the genus *Nasonia* (4*R*,5*S*)-5-hydroxy-4-decanolide (RS), (4*R*,5*R*)-5-hydroxy-4-decanolide (RR), and 4-methylquinazoline (MQ). (B–D) Scheme summarizing the female responses of the hitherto investigated species *Nasonia vitripennis* (NIEHUIS *et al.*, 2013; RUTHER *et al.*, 2014), *Nasonia giraulti* (NIEHUIS *et al.*, 2013; RUTHER *et al.*, 2014), and *Nasonia longicornis* (KURTANOVIC *et al.*, 2022) to the male sex pheromone components and combinations thereof. Pheromone composition of the different species is indicated by coloured dots near the species names. The upper panels show the response of 2-d-old virgin females excised from the hosts; the lower panels refer to females collected at the moment of emergence from the host. Reproduced from KURTANOVIC *et al.* (2022), *Frontiers in Ecology and Evolution* under the terms of the Creative Commons Attribution Licence (CC BY).

components (NIEHUIS *et al.*, 2013). These compounds are produced in the male rectal vesicle and applied to substrates by abdomen dipping behaviour (ABDEL-LATIEF *et al.*, 2008; STEINER & RUTHER, 2009). Only males on *N. vitripennis* produce an additional component, (4*R*,5*R*)-5-hydroxy-4-decanolide (RR), enabling species specificity of the chemical signal. *N. vitripennis* females prefer the conspecific three-component pheromone over the two-component blend of the other species, while *N. giraulti* females fail to discriminate the two blends (NIEHUIS *et al.*, 2013) (Fig. 1). However, this probably has no fitness consequences for *N. giraulti* females, because the vast majority of them mates already within the host (TRIENENS *et al.*, 2021). This makes a sex pheromone for long range attraction redundant given that mated females do not respond to the male pheromone anyway (RUTHER *et al.*, 2014).

Most females of *N. longicornis*, however, emerge as virgins from the host and therefore discriminate strongly against RR thus avoiding encounters with sympatric *N. vitripennis* males (KURTANOVIC *et al.*, 2022). The role of individual pheromone components in the sexual communication of the fourth species *N. oneida* is currently under investigation.

Stable isotope labelling studies revealed that the two lactones are derived from fatty acid metabolism (ABDEL-LATIEF *et al.*, 2008; BLAUL *et al.*, 2014). Recent studies (MULTERER *et al.*, 2022; PRAGER *et al.*, 2019; RUTHER *et al.*, 2021) also disproved the long-held assumption that, in the course of evolution, parasitic wasps have lost the ability to synthesise fatty acids and fat from carbohydrates (VISSER *et al.*, 2010). In fact, *N. vitripennis* females are well capable of replenishing diminishing fat reserves through de

Table 1. Outline of pheromone biosynthesis in *Nasonia vitripennis* and involved enzymes found in the pheromone gland of *N. vitripennis* males by a proteomics approach.

Biosynthetic step	Protein name	Reference
de novo biosynthesis of fatty acids from carbohydrates (lipogenesis)	<i>fatty acid synthase-like</i>	MULTERER <i>et al.</i> , 2022; PRAGER <i>et al.</i> , 2019; RUTHER <i>et al.</i> , 2021
	<i>fatty acid synthase</i>	
	<i>acetyl-CoA carboxylase</i>	
	<i>ATP-citrate synthase</i>	
desaturation	$\Delta 9$ -desaturase	SEMMELMANN <i>et al.</i> , 2019b
	$\Delta 12$ -desaturase <i>Nvit_D12a</i>	
epoxidation	<i>cytochrome P450?</i>	
epoxide hydrolysis	<i>epoxide hydrolase Nasvi-EH1</i>	ABDEL-LATIEF <i>et al.</i> , 2008
$\beta$ -oxidation	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i>	RUTHER <i>et al.</i> , 2020
	<i>very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase</i>	
	<i>medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase</i>	
	<i>enoyl-CoA hydratase</i>	
	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	
	<i>long-chain-fatty-acid-CoA ligase</i>	
	<i>carnitine O-palmitoyltransferase</i>	
<i>short-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>		
epimerization	<i>SDRs NV10127, NV10128/NV10129</i>	NIEHUIS <i>et al.</i> , 2013; RUTHER <i>et al.</i> , 2016; SEMMELMANN <i>et al.</i> , 2019a

novo synthesis from carbohydrates and even incorporate de novo produced fat into eggs (MULTERER *et al.*, 2022). Biosynthesis of RS and RR in *Nasonia vitripennis* starts from stearic acid and involves the action of two  $\Delta^9$ - and  $\Delta^{12}$ -desaturases (Nvit\_D12a) (SEMMELMANN *et al.*, 2019b) converting stearic acid into linoleic acid. A putative and hitherto uncharacterised P450 enzyme epoxidizes LA at position 12/13 and the resulting epoxide is hydrolysed by the epoxide hydrolase NasviEH1 (ABDEL-LATIEF *et al.*, 2008). Finally ubiquitous beta-oxidation enzymes cause chain shortening by eight carbon atoms and the resulting dihydroxy-decanoic acid cyclises spontaneously to form RR (RUTHER *et al.*, 2020). RR, the pheromone component unique in *N. vitripennis*, is produced in this species from RS by epimerisation catalysed by three short-chain dehydrogenases/reductases (NIEHUIS *et al.*, 2013; RUTHER *et al.*, 2016). All enzymes necessary to catalyse the outlined biosynthetic steps have been detected in the pheromone gland of *N. vitripennis* males by a proteomics approach (RUTHER *et al.*, 2020) (Table 1). Pheromone biosynthesis in *N. vitripennis* is under control of the transcription factor doublesex (*dsx*), and males in which *dsx* had been knocked down by RNA interference failed to synthesize the sex pheromone and became unable to attract females from a distance (WANG *et al.*, 2022). It remains to be investigated, which of the genes involved in pheromone biosynthesis in *N. vitripennis* are controlled by *dsx*.

The closest relatives of *Nasonia* wasps are thought to be species of the genera *Trichomalopsis* and *Urolepis* forming together with *Nasonia* the so-called “*Nasonia* group” (BURKS, 2009). Comparative pheromone studies involving *T. sarcophagae* and *U. rufipes* revealed that *T. sarcophagae* uses the two-component blend known from *N. giraulti*, *N. longicornis*, and *N. oneida* (NIEHUIS *et al.*, 2013). Males of *U. rufipes*, however, use a compound from a completely different metabolic pathway, namely the mevalonate pathway. They release the terpenoid (2*S*,6*S*)-2,6-dimethyl-7-octene-1,6-diol to attract virgin females (MELNIK *et al.*, 2020; RUTHER *et al.*, 2019). Remarkably, biosynthesis occurs in the same gland like in the *Nasonia* species and the pheromone is used in a similar manner. Hence, novel pheromone phenotypes in parasitic wasps of the *Nasonia* group have evolved by enzymatic modification (epimerisation) of existing pheromone components as well as by a switch between two basic metabolic pathways.

#### REFERENCES

ABDEL-LATIEF M., GARBE L.A., KOCH M., RUTHER J, 2008 - *An epoxide hydrolase involved in the biosynthesis of an insect sex attractant and its use to localize the production site.* - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105: 8914-8919.

AZEVEDO R.B.R., LOHAUS R., SRINIVASAN S., DANG K.K., BURCH C.L., 2006 - *Sexual reproduction selects for robustness and negative epistasis in artificial gene networks.* - Nature, 440: 87-90.

BLAUL B., STEINBAUER R., MERKL P., MERKL R., TSCHOCH-

NER H., RUTHER J., 2014 - *Oleic acid is a precursor of linoleic acid and the male sex pheromone in Nasonia vitripennis.* Insect Biochemistry and Molecular Biology, 51: 33-40.

BORDENSTEIN S.R., WERREN J.H., 1998 - *Effects of A and B Wolbachia and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility in Nasonia.* - Genetics, 148: 1833-1844.

BURKS R.A., 2009 - *Phylogenetics of Pteromalidae and Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a study of cranial bridges in Chalcidoidea*, Vol. Doctor of Philosophy: University of California Riverside, Riverside.

HAMILTON W.D., AXELROD R., TANESE R., 1990 - *Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review).* - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87: 3566-3573.

KURTANOVIC A., HOFFERBERTH J., RUTHER J., 2022 - *Male sex pheromone in the parasitoid wasp Nasonia longicornis: Chemical and behavioral analyses.* - Frontiers in Ecology and Evolution, 10: 1076398.

LENSCHOW M., CORDEL M., POKORNY T., MAIR M.M., HOFFERBERTH J., RUTHER J., 2018 - *The post-mating switch in the pheromone response of Nasonia females is mediated by dopamine and can be reversed by appetitive learning.* - Frontiers in Behavioral Neuroscience, 12: 14.

MAIR M.M., RUTHER J., 2019 - *Chemical ecology of the parasitoid wasp genus Nasonia (Hymenoptera, Pteromalidae).* - Frontiers in Ecology and Evolution, 7: 184.

MELNIK K., GRIMM C., WITTBRODT J., RUTHER J., SCHULZ S., 2020 - *Enantioselective synthesis and determination of the absolute configuration of the male sex pheromone of the parasitoid wasp Urolepis rufipes.* - Organic & Biomolecular Chemistry, 18: 3463-3465.

MULTERER M.T., WENDLER M., RUTHER J., 2022 - *The biological significance of lipogenesis in Nasonia vitripennis.* - Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 289: 20220208.

NIEHUIS O., BÜLLESBACH J., GIBSON J.D., POTHMANN D., HANNER C., NAVDEEP M., JUDSON A.K., GADAU J., RUTHER J., SCHMITT T., 2013 - *Behavioural and genetic analyses of Nasonia shed light on the evolution of sex pheromones.* - Nature, 494: 345-348.

PRAGER L., BRUCKMANN A., RUTHER J., 2019 - *De novo biosynthesis of fatty acids from  $\alpha$ -D-glucose in parasitoid wasps of the Nasonia group.* - Insect Biochemistry and Molecular Biology, 115: 103256.

RUTHER J., BRUCKMANN A., HOFFERBERTH J., 2020 - *Pheromone biosynthesis in Nasonia: Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* (ed. by G Blomquist & R Vogt) Academic Press, London, pp. 237-267.

RUTHER J., HAGSTRÖM Å.K., BRANDSTETTER B., HOFFERBERTH J., BRUCKMANN A., SEMMELMANN F., FINK M., LOWACK H., LABERER S., NIEHUIS O., DEUTZMANN R., LÖFSTEDT C., STERNER R., 2016 - *Epimerisation of chiral hydroxylactones by short-chain dehydrogenases/reductases accounts for sex pheromone evolution in*

- Nasonia. - Scientific Reports, 6: 34697.
- RUTHER J., HAMMERL T., 2014 - *An oral male courtship pheromone terminates the response of Nasonia vitripennis females to the male-produced sex attractant*. - Journal of Chemical Ecology, 40: 56-62.
- RUTHER J., MCCAW J., BÖCHER L., POTHMANN D., PUTZ I., 2014 - *Pheromone diversification and age-dependent behavioural plasticity decrease interspecific mating costs in Nasonia*. - PLoS ONE, 9: e89214.
- RUTHER J., PRAGER L., POKORNY T., 2021 - *Parasitic wasps do not lack lipogenesis*. - Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 288: 20210548.
- RUTHER J., WITTMAN T., GRIMM C., FEICHTNER F.S., FLEISCHMANN S., KIERMAIER J., KING B.H., KREMER W., KALBITZER H.R., SCHULZ S., 2019 - *Male sex pheromone of the parasitoid wasp Urolepis rufipes demonstrates biosynthetic switch between fatty acid and isoprenoid metabolism within the Nasonia group*. - Frontiers in Ecology and Evolution, 7: 26.
- SEMMELMANN F., HOFFERBERTH J., RUTHER J., STERNER R., 2019a - *Mapping key amino acid residues for the epimerase efficiency and stereospecificity of the sex pheromone biosynthetic short-chain dehydrogenases/reductases of Nasonia*. - Scientific Reports 9: 330.
- SEMMELMANN F., KABEYA N., MALCICKA M., BRUCKMANN A., BROSCHWITZ B., STRAUB K., MERKL R., MONROIG O., STERNER R., RUTHER J., ELLERS J., 2019b. - *Functional characterisation of two  $\Delta 12$ -desaturases demonstrates targeted production of linoleic acid as pheromone precursor in Nasonia*. - Journal of Experimental Biology, 222: jeb.201038.
- STEINER S., RUTHER J., 2009 - *Mechanism and behavioral context of male sex pheromone release in Nasonia vitripennis*. - Journal of Chemical Ecology, 35: 416-421.
- TRIENENS M., GIESBERS M., PANNEBAKKER B.A., VAN DE ZANDE L., BEUKEBOOM L.W., 2021 - *A re-assessment of within-host mating behavior in the Nasonia species complex*. - Entomologia Experimentalis et Applicata, 169: 1081-1091.
- VISSER B., LE LANN C., DEN BLANKEN F.J., HARVEY J.A., VAN ALPHEN J.J.M., ELLERS J., 2010 - *Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle*. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107: 8677-8682.
- WANG Y.D., SUN W.Z., FLEISCHMANN S., MILLAR J.G., RUTHER J., VERHULST E.C., 2022 - *Silencing Doublesex expression triggers three-level pheromonal feminization in Nasonia vitripennis males*. - Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 289: 20212002.
- WYATT T.D., 2014 - *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

CHIMICA ECOLOGICA E BIOTREMOLOGIA DELLE INTERAZIONI  
TRA PIANTA-FITOFAGO-PARASSITOIDE A SUPPORTO DEI PROGETTI DI CONTROLLO  
BIOLOGICO (IL CASO STUDIO DI *DROSOPHILA SUZUKII* VS *GANASPIS BRASILIENSIS*)

GIANFRANCO ANFORA<sup>a</sup> - LORENZO FELLIN<sup>a</sup> - ALBERTO SADDI<sup>a</sup> - RACHELE NIERI<sup>a</sup>  
CLAUDIO IORIATTI<sup>b</sup> - VALERIO MAZZONI<sup>b</sup> - MARCO VALERIO ROSSI STACCONI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro Agricoltura Alimenti Ambiente, Università di Trento, Via E. Mach 1, 38098 San Michele all'Adige – gianfranco.anfora@unitn.it

<sup>b</sup>Centro Ricerche e Innovazione, Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38098 San Michele all'Adige

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: “Chemical Ecology in Insect parasitoids”. Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 17 febbraio 2023.

*Chemical ecology and biotremology of plant-pest-parasitoid interactions to support biological control projects (the case study of *Drosophila suzukii* vs *Ganaspis brasiliensis*)*

The invasive pest *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) poses a severe threat to fruit crops globally, necessitating effective control measures. Classical biological control (CBC) employing the coevolved and specialized parasitoid *Ganaspis brasiliensis* (Ihering) (Hymenoptera: Figitidae) has emerged as a promising strategy for managing this pest. Our research focuses on elucidating the chemical ecology and biotremology of plant-pest-parasitoid interactions to enhance CBC efforts. Chemical analyses reveal specific volatile organic compounds emitted by infested fruits attract *G. brasiliensis*, aiding in host location. Furthermore, biotremology studies demonstrate that vibrations produced by *D. suzukii* larvae within fruits vary with larval age and infestation level, potentially serving as cues for parasitoid detection. These findings underscore the significance of comprehending multitrophic interactions to optimize CBC programs, contributing to sustainable pest management strategies and safeguarding fruit production worldwide. By integrating chemical ecology and biotremology, our research provides valuable insights for developing innovative and efficient biological control methods against *D. suzukii*, addressing critical challenges in agricultural pest management.

KEY WORDS: classical biological control, spotted wing drosophila, larval parasitoids, invasive alien species, risk assessment

INTRODUZIONE

Il moscerino asiatico dei piccoli frutti, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), attualmente rappresenta il fitofago più dannoso per numerose specie frutticole coltivate nelle aree recentemente invase, causando significative perdite economiche a livello globale (TAIT *et al.*, 2021). Il potenziale distruttivo di *D. suzukii* risulta elevato a causa della sua capacità di deporre le uova all'interno della frutta sana in fase di maturazione e prossima alla raccolta, penetrandone l'esocarpo con l'ovopositore particolarmente sclerificato (CINI *et al.*, 2012). Danni economici a carico di *D. suzukii* sono stati segnalati su drupacee (ciliegio, pesco, susino, albicocco), su piccoli frutti (mirtillo, lampone, mora, fragola), kiwi, cachi, fichi e vite (ASPLEN *et al.* 2015). A causa della sua complessa biologia ed ecologia la lotta è rivolta soprattutto a contrastare la presenza degli adulti e a proteggere il frutto in prossimità della raccolta. Nonostante i numerosi sforzi per sviluppare tecniche di controllo alternative, la difesa chimica costituisce ancora il principale strumento di contenimento, sebbene gli insetticidi impiegati non garantiscano un'efficacia completa (IORIATTI *et al.*, 2019; SHAWER, 2020). Le problematiche principali riguardano

l'attacco in prossimità dell'epoca di maturazione della frutta, le continue reinfestazioni dall'esterno dei frutteti, la durata del periodo di raccolta e la compresenza sul territorio di numerose colture e varietà ospiti. Tutti questi fattori limitano notevolmente le capacità di contenimento dei trattamenti chimici. Attualmente, quindi, l'approccio più promettente per l'implementazione di una strategia di lotta integrata che aumenti la sostenibilità e l'efficienza economica prevede l'importazione di parassitoidi larvali dalle regioni native del fitofago, Asia sud-orientale e orientale, data la mancanza di nemici naturali indigeni efficaci nelle aree invase (LEE *et al.*, 2019; TAIT *et al.*, 2021). Esplorazioni nelle aree di origine di *D. suzukii* alla ricerca dei parassitoidi coevoluti (DAANE *et al.*, 2016; GIORGINI *et al.*, 2019) e biosaggi in laboratori di quarantena sui parassitoidi raccolti (BIONDI *et al.*, 2021; DAANE *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2020) hanno posto le basi per il controllo biologico classico (CBC) di *D. suzukii*, identificando *Ganaspis brasiliensis* (Ihering) (Hymenoptera: Figitidae) come il candidato più adatto per i programmi CBC. Studi di laboratorio e semicampo hanno dimostrato inoltre che un gruppo genetico specifico di *G. brasiliensis*, noto come G1 (GIORGINI *et al.*, 2019; NOMANO *et al.*, 2017), mostra la più alta specificità di ospite, attaccan-

do esclusivamente larve L1 e L2 all'interno dei frutti, facendo anche ipotizzare l'esistenza di specie criptiche (GIROD *et al.*, 2018; SEEHAUSEN *et al.*, 2020; SEEHAUSEN *et al.*, 2022).

Queste scoperte hanno portato alla preparazione e sottomissione di studi del rischio e successive autorizzazioni ai rilasci di *G. brasiliensis* G1 da parte delle autorità competenti in Italia (LISI *et al.*, 2022) e negli Stati Uniti (BEERS *et al.*, 2022). In Italia un partenariato volontario di ricercatori provenienti da undici regioni e province autonome ha istituito quindi un programma triennale di CBC. I rilasci iniziali nel nord Italia hanno dimostrato la capacità di *G. brasiliensis* di disperdersi, svernare e parassitizzare specificamente *D. suzukii* (FELLIN *et al.*, 2023), incoraggiando il proseguimento del progetto di CBC e l'integrazione di questo agente di controllo biologico nei programmi IPM attuali contro *D. suzukii*.

A fronte dell'importanza e delle ricadute dei progetti di CBC di *D. suzukii*, è apparso quindi cruciale approfondire gli studi sui segnali che regolano il comportamento di ricerca dell'ospite di *G. brasiliensis* G1, le cui conoscenze sono ancora frammentarie. La decifrazione dei rapporti multitrofici pianta-ospite-parassitoide è infatti importante per ottimizzare i programmi di lotta biologica classica in corso, caratterizzare le specie criptiche oggetto di studio e migliorarne le performance in allevamento e in campo.

Nel presente lavoro sono quindi riassunti alcuni risultati preliminari ottenuti dal gruppo di entomologi operante a San Michele all'Adige, composto da ricercatori dell'Università di Trento e della Fondazione Edmund Mach. Parte di queste ricerche sono incluse in più ampi progetti in corso che prevedono numerose collaborazioni nazionali e internazionali. Sperimentazioni sono condotte sia considerando aspetti di chimica ecologica, con l'obiettivo di verificare l'attività biologica di composti volatili emessi da frutti infestati da larve di *D. suzukii* nei confronti di *G. brasiliensis* G1, sia applicando tecniche di biotremologia per caratterizzare l'influenza delle vibrazioni emesse dalle larve dell'ospite in attività trofica nei frutti nei confronti di femmine ovideponenti del parassitoide.

#### CHIMICA ECOLOGICA

In questa parte dello studio, l'obiettivo è verificare se segnali chimici sono sfruttati dalle femmine di *G. brasiliensis* G1 per individuare le larve ospiti all'interno dei frutti infestati nello stadio adatto alla parassitizzazione (L1 ed L2). A tale scopo è stato utilizzato un paradigma modello costituito da un olfattometro a doppia scelta in cui sono stati messi a confronto rispetto a femmine ovideponenti G1 mirtilli sani e mirtilli infestati con larve di *D. suzukii* in diverse fasi di sviluppo, seguiti dalla raccolta e caratterizzazione dei composti organici volatili (VOCs) rilasciati dai substrati saggiati. I risultati hanno mostrato una chiara scelta dipendente dal tempo da parte delle femmine di G1 tra frutti infestati e sani in relazione allo sviluppo concomitante delle larve di *D. suzukii* e alla degradazione della frutta. L'attrazione significativa

verso i frutti infestati è stata registrata infatti durante le fasi iniziali dell'infestazione (corrispondente agli stadi L1 ed L2), seguita da una fase repellente coincidente con la degradazione dei frutti causata dalla crescita e dall'alimentazione delle larve. Tramite estrazione dei composti volatili utilizzando la tecnica del closed loop stripping analysis (CLSA) e successive analisi chimiche con gas cromatografo accoppiato a spettrometro di massa (GC-MS) è stato possibile appurare che l'attrattività dei frutti infestati da larve giovani di *D. suzukii* nei confronti di *G. brasiliensis* G1 è associata alla presenza di specifici VOCs indotti dall'ospite rilasciati dai mirtilli infestati (potenziali caïromoni). Al contrario, la repellenza dei frutti deteriorati che ospitavano larve di *D. suzukii* in fase più avanzata di sviluppo era associata alla emissione di composti tipici dei processi di fermentazione. Tali risultati confermano e delucidano le osservazioni precedenti circa l'elevata specificità di G1 legata alla sua capacità di parassitizzare esclusivamente larve giovani di *D. suzukii* in frutti ospiti ancora in fase di maturazione in pianta. La conoscenza dei composti volatili coinvolti nelle relazioni multitrofici tra piante, fitofagi e parassitoidi può essere utile per discriminare le specie criptiche e selezionare correttamente l'agente di controllo biologico. Inoltre, nel caso specifico, tali semiochimici potrebbero essere utilizzati per la manipolazione e il miglioramento delle performance di *G. brasiliensis* G1 in laboratorio (es. allevamento massale; ROSSI STACCONI *et al.*, 2022) e in campo.

#### BIOTREMOLOGIA

Le larve di *D. suzukii* che si muovono e nutrono all'interno della polpa dei frutti sono in grado di indurre vibrazioni, che potrebbero fungere da segnali di riconoscimento dell'ospite e attrazione a corto raggio da parte dei suoi predatori e parassitoidi (FELLIN *et al.*, 2024). Tali vibrazioni potrebbero anche essere considerate per sviluppare un metodo di rilevamento non invasivo e del tutto innovativo della presenza di *D. suzukii* in frutti freschi destinati al commercio. Abbiamo quindi utilizzato un vibrometro laser per rilevare e caratterizzare le vibrazioni accidentali prodotte dalle larve di *D. suzukii* all'interno di mirtilli freschi a cinque diversi tempi rispetto all'inizio dell'infestazione dei frutti (48, 96, 168, 216 e 264 ore) allo scopo di valutare se l'età delle larve (ore dopo l'esposizione) influenza lo spettro e l'ampiezza delle vibrazioni. Per valutare anche l'effetto del livello di infestazione, l'esperimento è stato ripetuto su mirtilli con un diverso numero di uova iniziali ed è stato osservato il numero di pupe e adulti sviluppati a fine ciclo. Le registrazioni da mirtilli infestati sono caratterizzate dalla presenza di una serie di impulsi a banda larga (intervallo di frequenza 0,1–2 kHz) senza un modello temporale regolare, in un intervallo di ampiezza compreso tra 12,1 e 946  $\mu\text{m/s}$  (velocità di oscillazione del substrato). Inoltre, l'analisi ha rivelato la possibilità di distinguere tra diverse età del fitofago e vari livelli di infestazione. L'analisi spettrale delle registrazioni ha rilevato che l'ampiezza delle vibrazioni aumenta gradualmente fino a 168–216

ore dopo l'infestazione, per poi diminuire fino alla comparsa dell'adulto, consentendo la determinazione degli stadi di sviluppo delle larve. Inoltre, le larve di *D. suzukii* hanno evidenziato uno sviluppo più rapido in mirtili poco infestati rispetto a quelli molto infestati. Questa osservazione si è riflessa nelle registrazioni delle vibrazioni, poiché i mirtili poco infestati hanno mostrato un picco di ampiezza in una fase più precoce rispetto a quelli molto infestati.

Da notare che le vibrazioni derivano dall'attività trofica e dai movimenti delle larve di *D. suzukii* all'interno dei frutti e che i valori di ampiezza e frequenza delle stesse sono potenzialmente percepibili dalla maggior parte degli insetti. Future ricerche con potenziali implicazioni pratiche nel campo della lotta biologica avranno l'obiettivo di verificare se tali vibrazioni, analogamente ad altri parassitoidi, siano utilizzate da *G. brasiliensis* G1 come ulteriori segnali a corto raggio per l'individuazione degli stadi dell'ospite suscettibili alla parassitizzazione. Inoltre, poiché attualmente la rilevazione delle larve di *D. suzukii* nella frutta è limitata a metodi distruttivi e le strategie di controllo post-raccolta dipendono pesantemente dall'uso di sostanze chimiche o dal freddo per inibire la schiusa delle uova e la crescita delle larve, il lavoro condotto può aprire la strada allo sviluppo di metodi di monitoraggio e controllo innovativi basati sull'interferenza con i segnali vibrazionali.

#### CONCLUSIONI

Le ricerche presentate indicano che lo sviluppo di programmi di lotta integrata e biologica sicuri ed efficienti può essere accelerato e supportato da un approccio sperimentale multimodale, che includa tra le altre discipline la chimica ecologica e la biotremologia (NIERI *et al.*, 2022), consentendo così di descrivere adeguatamente le relazioni multitrofiche tra pianta, fitofago e parassitoide. Riteniamo infatti che nei progetti di CBC in corso e futuri sia auspicabile considerare attentamente le complesse relazioni ecologiche dell'agente di biocontrollo durante la fase di valutazione del suo status tassonomico, della gamma di ospiti e delle probabilità di insediamento e diffusione (studio del rischio).

#### RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato parzialmente supportato dal progetto "Success of Specialist versus generalist parasitoid in Hampering the spread of an Invasive pest (SUSHI)", bando PRIN 2022, finanziato dal Ministero Italiano dell'Università e della Ricerca (MUR) (n°: 20227ZYCH3 CUP master B53D2301184 0006);

#### BIBLIOGRAFIA

ASPEN M.K., ANFORA G., BIONDI A., CHOI D.S., CHU D., DAANE K.M., GIBERT P., GUTIERREZ A.P., HOELMER K.A., HUTCHISON W.D., ISAACS R., JIANG Z., KÁRPÁTI Z., KIMURA M.T., PASCUAL M., PHILIPS C.R., PLANTAMP

- C., PONTI L., VÉTEK G., VOGT H., WALTON V.M., YU Y., ZAPPALÀ L., DESNEUX N., 2015 - *Invasion biology of spotted wing Drosophila (Drosophila suzukii): a global perspective and future priorities.* - J. Pest Sc., 88: 469-494.
- BEERS E.H., BEAL D., SMYTHEMAN P., ABRAM P.K., SCHMIDT-JEFFRIS R., MORETTI E., DAANE K.M., LOONEY C., LUE C.H., BUFFINGTON M., 2022 - *First records of adventive populations of the parasitoids Ganaspis brasiliensis and Leptopilina japonica in the United States.* - J. Hym. Res., 91: 11–25.
- BIONDI A., WANG X., DAANE K.M., 2021 - *Host preference of three Asian larval parasitoids to closely related Drosophila species: implications for biological control of Drosophila suzukii.* - J. Pest. Sci., 94: 273–283.
- CINI A., IORIATTI C., ANFORA G., 2012 - *A review of the invasion of Drosophila suzukii in Europe and a draft research agenda for Integrated Pest Management.* - Bull. Insectol., 65: 149-160.
- DAANE K.M., WANG X-G., BIONDI A., MILLER B., RIEDL H., SHEARER P.W., GUERRIERI E., GIORGINI M., BUFFINGTON M., VAN ACHTERBERG K., SONG Y., KANG T., YI H., JUNG C., LEE D.W., CHUNG B-K., HOELMER K.A., WALTON V.M., 2016 - *First exploration of parasitoids of Drosophila suzukii in South Korea as potential classical biological agents.* - J. Pest. Sci., 89: 823–835.
- DAANE K.M., WANG X., HOGG B.N., BIONDI A., 2021 - *Potential host ranges of three Asian larval parasitoids of Drosophila suzukii.* - J. Pest Sci., 94: 1171–1182.
- FELLIN L., GRASSI A., PUPPATO S., SADDI A., ANFORA G., IORIATTI C., ROSSI-STACCONI M.V., 2023 - *First report on classical biological control releases of the larval parasitoid Ganaspis brasiliensis against Drosophila suzukii in northern Italy.* - Biol. Control, 68: 1-12.
- FELLIN L., BERTAGNOLLI G., MAZZONI V., ANFORA G., AGOSTINELLI C., ROSSI STACCONI M.V., NIERI R., 2024 - *Detection and characterization of incidental vibrations from Drosophila suzukii in infested fruits.* - J. Pest Sci., DOI: 10.1007/s10340-023-01711-8
- GIORGINI M., WANG X.G., WANG Y., CHEN F.S., HOUARDY E., ZHANG H.M., ZONG-QI C., HONG-YIN C., LIU C-X., CASCONI P., FORMISANO G., CARVALHO G.A., BIONDI A., BUFFINGTON M., DAANE K.M., HOELMER K.A., GUERRIERI E., 2019 - *Exploration for native parasitoids of Drosophila suzukii in China reveals a diversity of parasitoid species and narrow host range of the dominant parasitoid.* - J. Pest Sci., 92: 509-522.
- GIROD P., BOROWIEC N., BUFFINGTON M., CHEN G., FANG Y., KIMURA M.T., PERIS-FELIPO F. J., RIS N., WU H., XIAO C., ZHANG J., AEBI A., HAYE T., KENIS M., 2018 - *The parasitoid complex of D. suzukii and other fruit feeding Drosophila species in Asia.* - Sci. Rep., 8: 1–8.
- IORIATTI C., ANFORA G., GRASSI A., PUPPATO S., ROSSI STACCONI M. V., 2019 - *Current status of the Drosophila suzukii control in Europe.* - Acta Hort., 1277: 387-396.

- LEE J. C., WANG X., DAANE K.M., HOELMER K.A., ISAACS R., SIAL A.A., WALTON V.M., 2019 - *Biological control of spotted-wing Drosophila (Diptera: Drosophilidae)—current and pending tactics.* - J. Integr. Pest Manag., 10: 13.
- LISI F., BIONDI A., CAVALLARO C., ZAPPALÀ L., CAMPO G., ROVERSI P. F., SABBATINI PEVERIERI G., GIOVANNINI L., TAVELLA L., TORTORICI F., BARDELLA S., CARLI C., BOSIO G., MORI N., TONINA L., ZANINI G., CARUSO S., VACCARI G., MASETTI A., BITTAU B., BARISELLI M., SCHMIDT S., FALAGIARDA M., BERTIGNONO L., BONFANTI R., GIORGINI M., GUERRIERI E., TROPIANO F.G., VERRASTRO V., BASER N., IBN AMOR A., ENDRIZZI S., TESSARI L., PUPPATO S., IORIATTI C., GRASSI A., ANFORA G., FELLIN L., ROSSI STACCONI M.V., 2022 - *Current status of Drosophila suzukii classical biological control in Italy.* - Acta Hort., 1354: 193–200.
- NIERI R., ANFORA G., MAZZONI V., ROSSI STACCONI M.V., 2022 - *Semiochemicals, semiophysicals and their integration for the development of innovative multi-modal systems for agricultural pests' monitoring and control.* – Entomol. Gen., 42: 167-183.
- NOMANO F.Y., KASUYA N., MATSUURA A., SUWITO A., MITSUI H., BUFFINGTON M.L., KIMURA M.T., 2017 - *Genetic differentiation of Ganaspis brasiliensis (Hymenoptera: Figitidae) from East and Southeast Asia.* - Appl. Entomol. Zool., 52: 429–437.
- ROSSI STACCONI M.V., WANG X., STOUT A., FELLIN L., DAANE K.M., BIONDI A., STAHL J.M., BUFFINGTON M.L., ANFORA G., HOELMER K.A., 2022 - *Methods for rearing the parasitoid Ganaspis brasiliensis, a promising biological control agent for the invasive Drosophila suzukii.* – J. Visual. Exp., 184: e63898
- SEEHAUSEN M.L., RIS N., DRISS L., RACCA A., GIROD P., WAROT S., BOROWIEC N., TOŠEVSKI I., KENIS M., 2020 - *Evidence for a cryptic parasitoid species reveals its suitability as a biological control agent.* - Sci. Rep., 10: 19096.
- SEEHAUSEN M.L., VALENTI R., FONTES J., MEIER M., MARAZZI C., MAZZI D., KENIS M., 2022 - *Large-arena field cage releases of a candidate classical biological control agent for spotted wing drosophila suggest low risk to non-target species.* - J. Pest. Sci., 95: 1057-1065.
- SHAWER R., 2020 - *Chemical Control of Drosophila suzukii.* In: Garcia, F.R.M. (eds) *Drosophila suzukii Management.* Springer, Cham., pp. 133-142.
- TAIT G., MERMER S., STOCKTON D., LEE J., AVOSANI S., ABRIEUX A., ANFORA G., BEERS E., BIONDI A., BURRACK H., CHA D., CHIU J.C., CHOI M.Y., CLOONAN K., CRAVA C.M., DAANE K.M., DALTON D.T., DIEPENBROCK L., FANNING P., GANJISAFFAR F., GÓMEZ M.I., GUT L., GRASSI A., HAMBY K., HOELMER K.A., IORIATTI C., ISAACS R., KLICK J., KRAFT L., LOEB G., ROSSI STACCONI M.V., NIERI R., PFAB F., PUPPATO S., RENDON D., RENKEMA J., RODRIGUEZ-SAONA C., ROGERS M., SASSU F., SCHÖNEBERG T., SCOTT M.J., SEAGRAVES M., SIAL A.A., VAN TIMMEREN S., WALLINGFORD A., WANG X.G., YEH D.A., ZALOM F.G., WALTON V.M., 2021 - *Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae): a decade of research towards a sustainable integrated pest management program.* - J. Econ. Entomol., 114: 1950-1974.
- WANG X., BIONDI A., DAANE K.M., 2020 - *Functional responses of three candidate asian larval parasitoids evaluated for classical biological control of Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae).* – J. Econ. Entomol., 113: 73–80.



## GUSTO E OLFATTO: UNA TEORIA UNIFICATRICE

ERNESTO MOLLO <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 80078 Pozzuoli, Italia*

*E-mail: emollo@icb.cnr.it*

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Chemical Ecology in Insect parasitoids”. Seduta pubblica dell’Accademia – Firenze, 17 febbraio 2023.

### *Taste and smell: a unifying chemosensory theory*

This lecture summarizes a position paper published in *The Quarterly Review of Biology* proposing unifying all chemosensory modalities into a single sense (MOLLO *et al.*, 2022). It provides evidence that the spatial, molecular, and anatomical features on which the differentiation between gustation (taste) and olfaction (smell) is constructed are not consistent with each other, and are troublesome even when individually considered. The differentiation is essentially based on invalid and/or anthropomorphic criteria, generating an unnatural categorization of chemosensory processes that hinders the development of a reasonable narrative on the evolution of chemosensory systems. This biased view of the chemosensory world also hampers our efforts for a better understanding of the complex and interconnected ways all living organisms get and share chemical information crucial to many different biological activities across diverse environmental conditions. The paper thus envisages a rupture with what emerges as one of the most deeply rooted confirmation biases in the scientific literature.

KEY WORDS: chemical senses, receptors, ligands, chemosensory systems, evolution of chemosensation, chemical ecology

La capacità di rilevare segnali chimici, che consente a tutti gli organismi viventi di ottenere e condividere informazioni cruciali per una varietà di attività biologiche, è tradizionalmente suddivisa in due modalità sensoriali: gusto e olfatto. Tuttavia, i criteri comunemente adottati per separare *a priori* i due sensi chimici sono contraddittori ed eccessivamente antropomorfi. Dal punto di vista “spaziale”, l’olfatto è tradizionalmente considerato un senso a distanza che aiuta nella navigazione e nell’orientamento in un mezzo fluido esterno (aria o acqua), permettendo di valutare distribuzioni di segnali chimici nel tempo e nello spazio. Al contrario, il gusto è considerato un senso di contatto che permette il rilevamento delle sostanze chimiche già entrate in bocca. Varie evidenze in letteratura chiariscono, tuttavia, che una tale differenziazione non si armonizza con la reale distribuzione dei segnali chimici nei diversi ambienti naturali (MOLLO *et al.*, 2014; MOLLO *et al.*, 2017; GIORDANO *et al.*, 2017). In realtà, gli organismi viventi sono esposti a molecole chemosensoriali che sono distribuite in modo differenziale nei diversi ambienti, contribuendo alla distribuzione eterogenea delle specie in una varietà di habitat (MOLLO *et al.*, 2022). Ma anche l’idea che il gusto e l’olfatto, essendo “sensi chimici”, debbano essere distinti sulla base delle strutture delle molecole che interagiscono con specifiche proteine chemosensoriali, non ha carattere universale. Essa è falsificata dall’esistenza in natura di composti che innescano contemporaneamente sensazioni olfattive, gustative e chemestetiche (MOLLO *et al.*, 2022). Ciò implica che i termini “odore” e “gusto”, essendo applicabili agli stessi oggetti chimici concreti, perdano di fatto il loro significato. Infine, c’è da considerare che la ragione principale per una differenziazione gusto-olfatto è strettamente antropomorfa: essa risiede nel fatto che gli

esseri umani impiegano due diversi organi per rilevare i segnali chimici che provengono dall’ambiente circostante: il naso e la lingua. In particolare, le papille gustative sulla lingua sono gli organi primari del gusto nell’uomo, mentre l’epitelio olfattivo nella parte posteriore della cavità nasale è responsabile per il rilevamento degli odori. Tali strutture anatomiche forniscono, rispettivamente, informazioni su oggetti distanti e su materiali già presenti in bocca, generando impulsi che viaggiano lungo nervi sensoriali, olfattivi e gustativi, fino al cervello, dove vengono elaborati dinamicamente e tradotti in comportamenti adattativi. Questa differenziazione antropomorfa tra i sensi chimici, tuttavia, non può essere estesa alla grande varietà di sistemi anatomici chemosensoriali nel regno animale, nonostante i meccanismi di trasduzione ed elaborazione del segnale non siano esclusivi della specie umana (MOLLO *et al.*, 2022). Essa non tiene conto, inoltre, che le complesse capacità umane di percepire e integrare informazioni sensoriali provenienti dall’ambiente, si sono affermate gradualmente in natura (MOLLO *et al.*, 2019). Paradossalmente, la differenziazione gusto-olfatto basata su criteri anatomico-fisiologici non si applica completamente anche alla stessa specie umana se si considera l’espressione ectopica di geni chemosensoriali in organi interni, e le capacità chemiotattiche sia degli spermatozoi che delle cellule del sistema immunitario. In realtà, una suddivisione del mondo chemiosensoriale in due sensi chimici (o quattro se si includono chemestesi e vomerolfatto) si oppone all’idea di una evoluzione graduale dei sistemi sensoriali a partire da forme di vita prive di complesse reti neurali, laddove analisi strutturali comparative sui recettori chemiosensoriali negli insetti, negli eucarioti unicellulari e nelle piante indicano una loro origine comune nell’ultimo antenato

eucariotico comune (BENTON 2015; BENTON *et al.*, 2020). Purtroppo, invece, tale rappresentazione dicotomica viene comunemente estesa a qualsiasi forma di vita senziente, dagli organismi unicellulari a quelli multicellulari, dagli organismi acquatici a quelli terrestri, a causa di un bias cognitivo che porta ad attribuire tratti umani ad entità biologiche non umane (MOLLO *et al.*, 2022). Ciò produce problemi teorici e pratici nel campo della ricerca sulla comunicazione chimica, portando a rappresentazioni imprecise della realtà. Nell'insieme, tali considerazioni hanno spinto a proporre una rottura con la tradizionale dicotomia gusto-olfatto, che emerge come uno dei bias antropomorfi più profondamente radicati nella letteratura scientifica (MOLLO *et al.*, 2022). Tale pregiudizio ostacola profondamente gli sforzi di ricerca per una migliore comprensione dell'evoluzione dei processi di comunicazione chimica, specialmente durante la transizione dalla vita acquatica a quella terrestre, ma anche nel passaggio dalla vita unicellulare alla multicellularità. Inoltre, l'abitudine intellettuale di differenziare le due modalità sensoriali ha favorito modelli di pensiero pregiudizievole nella classificazione dei geni e dei recettori sensoriali, nella nomenclatura morfologica e zoologica, e nella progettazione ed interpretazione degli esperimenti, favorendo pregiudizi di selezione nella scelta dei segnali chimici da includere negli studi.

Si propone quindi di unificare tutte le modalità chemosensoriali all'interno di un quadro teorico più complesso che si opponga alla nomenclatura attuale, considerando opportunamente il diversificato e interconnesso insieme di modalità di chemiosensazione che partono tutte da interazioni tra ligandi e recettori, due entità chimiche che ricorrono entrambe in un'immensa varietà strutturale in natura.

#### REFERENCES

- BENTON R., 2015 - *Multigene family evolution: perspectives from insect chemoreceptors*. - Trends in Ecology and Evolution, 30: 590–600. <https://doi.org/10.7554/eLife.62507>
- BENTON R., DESSIMOZ C., MOI D., 2020 - *A putative origin of the insect chemosensory receptor superfamily in the last common eukaryotic ancestor*. - eLife, 9: e62507. <https://doi.org/10.7554/eLife.62507>
- GIORDANO G., CARBONE M., CIAVATTA M.L., SILVANO E., GAVAGNIN M., GARSON M.J., CHENEY K.L., MUDIANTA I.W., RUSSO G.F., VILLANI G., MAGLIOZZI L., POLESE G., ZIDORN C., CUTIGNANO A., FONTANA A., GHISELIN M. T., MOLLO E., 2017 - *Volatile secondary metabolites as aposematic olfactory signals and defensive weapons in aquatic environments*. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114: 3451–3456. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614655114>
- MOLLO E., AMODEO P., GHISELIN M.T., 2019 - *Can intelligence gradually evolve in a shell?*. - Trends in Ecology and Evolution, 34: 689–690. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.04.014>
- MOLLO E., BOERO F., PEÑUELAS J., FONTANA A., GARSON M.J., ROUSSIS V., CERRANO C., POLESE G., CATTANEO A.M., MUDIANTA I.W., GENTA-JOUVE G., TAGLIALATELLA-SCAFATI O., APPENDINO G., AMODEO P., GHISELIN M.T., 2022 - *Taste and smell: A unifying chemosensory theory*. - The Quarterly Review of Biology, 97: 69–94. <https://doi.org/10.1086/720097>
- MOLLO E., FONTANA A., ROUSSIS V., POLESE G., AMODEO P., GHISELIN M.T., 2014. - *Sensing marine biomolecules: smell, taste, and the evolutionary transition from aquatic to terrestrial life*. - Frontiers in Chemistry, 2: 92. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00092>
- MOLLO E., GARSON M.J., POLESE G., AMODEO P., GHISELIN M.T., 2017 - *Taste and smell in aquatic and terrestrial environments*. - Natural Product Reports, 34: 496–513. <https://doi.org/10.1039/C7NP00008A>