



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE (DAFNAE)**

Tesi di laurea triennale in Scienze e Tecnologie Alimentari

**Effetti sulla fitness di popolazioni di *Bactrocera oleae* (Rossi)
(Diptera, Tephritidae) derivate da frutti trattati con
antimicrobici**

Fitness effects of *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera, Tephritidae)
populations derived from antimicrobial treated fruits

Relatore: Prof. Martinez Sañudo Isabel

Correlatore: Dott.ssa. Carofano Ivana

Laureando:

VALENTE DANIELE

Matricola n.

1221720

Anno accademico 2022-2023

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	3
1.1 BACTROCERA OLEAE.....	3
1.2 CICLO BIOLOGICO.....	4
1.3 DANNI.....	5
1.4 TIPI DI CONTENIMENTO	7
1.4.1. Monitoraggio	7
1.4.2 Lotta chimica.....	7
1.5 SIMBIOSI NELLA MOSCA DELL'OLIVO	9
1.6 SCOPO DEL LAVORO.....	10
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	12
2.1 ALLEVAMENTO DELLE MOSCHE.....	12
2.2 PRODOTTI TESTATI.....	13
2.2.1 Dentamet®.....	13
2.3 TRATTAMENTO DELLE OLIVE INFESTATE CON PRODOTTI ANTIMICROBICI	14
2.4 CAMPIONAMENTO DELLE PUPE	14
2.5 ANALISI STATISTICHE.....	14
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	15
CAPITOLO 4: CONCLUSIONE	16
BIBLIOGRAFIA	17
SITOGRAFIA	23

RIASSUNTO

La mosca dell'olivo, *Bactrocera oleae* è un importante fitofago del settore olivicolo, causa di notevoli perdite economiche nell'intero bacino del Mediterraneo. Questo insetto può essere contenuto con vari metodi, come l'uso di insetticidi chimici, la cattura massale o le strategie attract & kill. La sostenibilità e l'efficacia di tali tecniche negli ultimi anni sono state messe in discussione. Gli scienziati sono alla ricerca di metodi alternativi di contenimento per la mosca dell'olivo, quali l'uso di repellenti, agenti di controllo biologico o tecniche di sterilizzazione degli insetti. Recentemente diverse ricerche si sono concentrate sulla possibilità di interrompere la simbiosi in fitofagi ospitanti un battere simbiote primario. La lotta agli insetti dannosi attraverso la manipolazione dei loro simbionti prende il nome di "controllo simbiotico" (CS).

La mosca dell'olivo è strettamente associata con il battere simbiote *Candidatus Erwinia dacicola*. Tale simbiote aumenta la fitness dell'insetto ospite e ne consente lo sviluppo larvale sfruttando la polpa dell'oliva ricca di polifenoli. La femmina trasmette verticalmente il simbiote alle uova durante l'ovideposizione. Al momento della schiusa, le larve di prima età acquisiscono i simbionti dalla superficie dell'uovo e i batteri ingeriti durante questo periodo passano al tratto intestinali dove proliferano nei ciechi gastrici della larva.

Questo studio ha avuto come oggetto la verifica sperimentale della possibilità di impiego di sostanze antimicrobiche al fine di eliminare i batteri simbionti depositati sul corion delle uova. Diversi prodotti commerciali noti per la loro attività antimicrobica sono stati scelti per trattare delle olive infestate. L'effetto di tali prodotti sulla fitness della mosca e la capacità di completare il ciclo di sviluppo è stato successivamente valutato.

ABSTRACT

The olive fruit fly *Bactrocera oleae*, is the most destructive pest of olives in the Mediterranean basin. Its control usually relies on the use of chemical insecticides and the application of mass capture or attract & kill techniques. In the last few years, however, the sustainability and effectiveness of those methods are being questioned. Scientists are looking for alternative control strategies against the olive fruit fly, such as the use of repellents, biological control agents or sterilization techniques. Recently, several researches have focused on the possibility of disrupting the symbiosis in insects strictly associated with bacterial symbionts. The control of insect pests through the manipulation of their symbiotic bacteria is known as “symbiotic control”.

The olive fly harbors a primary symbiont *Candidatus Erwinia dacicola*. The symbiont increases the fitness of the adult fly and allows the survival of the larva living in the harsh environment of unripe olives. Females transmit vertically the symbionts to the progeny during oviposition. They smear the egg surface with bacteria and, upon hatching, the larva ingests the symbiotic bacteria through nibbling the egg surface. The association between olive fly and the hereditary symbiont is essential for the fly lifespan making the interruption of the vertical transmission of symbiont a promising strategy for *B. oleae* control. This study aimed to explore the possibility to disrupt the vertical symbiont transmission by treating the eggs surface with putative antimicrobial products. Commercial products known for their antimicrobial activity were chosen to treat infested olives. The effect of the applied products on the fitness of the fly and the ability to complete their development was subsequently evaluated.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 *Bactrocera oleae*

Bactrocera oleae, detta anche mosca dell'olivo, è un dittero della famiglia dei Tefritidi. È noto nel settore dell'olivicoltura per i danni economici che il suo ciclo biologico causa, ed è presente nelle regioni in cui vengono coltivati olivi, come la regione mediterranea (Figura 1).

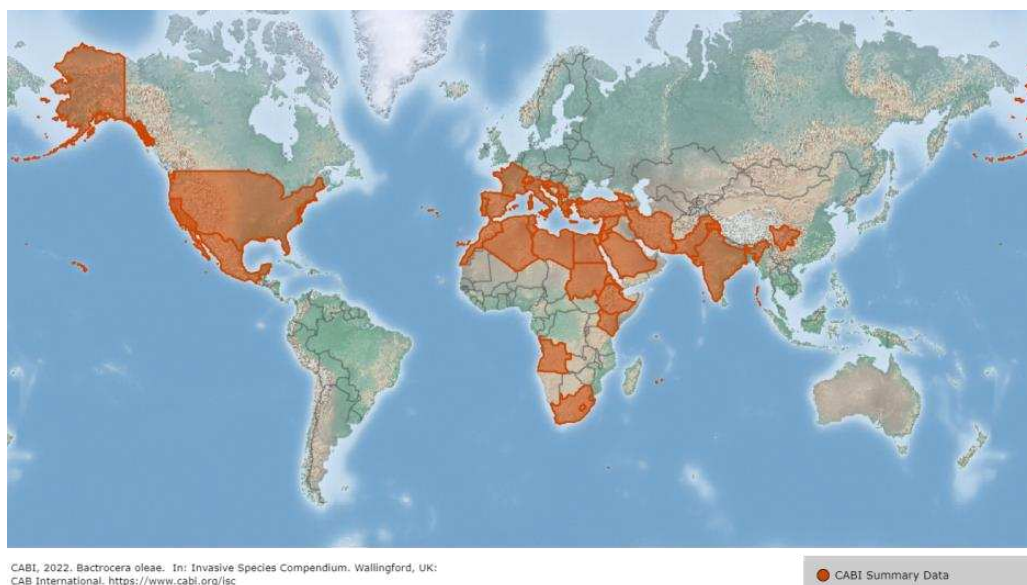


Figura 1: Mappa globale dei paesi infestati da *B. oleae*.
(tratto da <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17689#toDistributionMaps>)

L'adulto in media ha un corpo di 5 mm e le ali di colore ialino presentano per ciascuna estremità una macchietta marrone-nera (Rotundo e Germinara, 2014). Gli occhi sono verdi-blu con riflessi metallici, il torace e l'addome dell'adulto sono invece di colore nero con macchie marroni-gialle (Tremblay, 2005) (Figura 2). A differenza del maschio, la femmina è dotata di un ovopositore seghettato, con cui può forare la buccia delle olive anche non mature per incubare le uova che non saranno visibili dall'esterno (Tremblay, 2005) (Figura 2).

Le uova di colore bianco opaco hanno una lunghezza di circa 0,74 mm, sono larghe circa 0,21 mm e sono leggermente ricurve (Genç, 2014).

La larva è apode, dotata di un apparato masticatore ed un capo microcefalo. Alla maturità è di colore bianco-giallastro e raggiunge la lunghezza di 6-7 mm circa (Tremblay, 2005).

La pupa è a forma di barilotto, di colore bruno con leggere solcature trasversali e misura circa 3,5-4,5 mm (Tremblay, 2005).

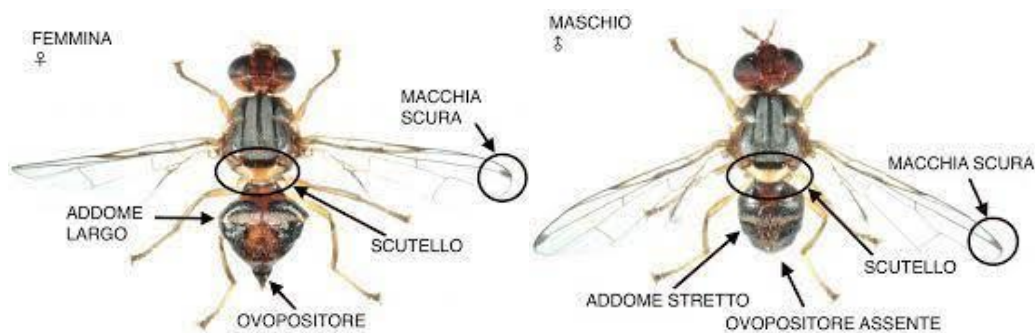


Figura 2: Esemplare adulto di *B. oleae* a sinistra femmina e a destra maschio.

(tratto da <http://www.consulenzeagronomiche.it/mosca-olivo/>)

1.2 Ciclo biologico

La mosca dell'olivo è una specie omodinamica, ovvero in grado di svilupparsi per tutto l'anno in condizioni ambientali e alimentari favorevoli, ma in generale mostra due picchi riproduttivi distinti: a fine inverno e a fine estate (Bagnoli e Iannotta, 2012). Il numero di generazione che può compiere varia da zero a sette, in base all'area geografica in cui si trova e a diversi fattori ambientali quali umidità, temperatura, vento, disponibilità delle olive, colore del frutto, volume e la forma della drupa, ecc (Daane e Johnson, 2010). In Medio Oriente generalmente *B. oleae* produce dalle 3-5 generazioni se favorite da condizioni climatiche più miti, mentre in Europa dalle 2-5 generazioni (Malheiro *et al.*, 2015).

Verso fine giugno ed inizio luglio la femmina depone normalmente un uovo per drupa, ad eccezione di rari anni particolarmente infestati, in cui è possibile rilevare più uova per oliva. Poi a causa delle temperature più elevate e delle scarse precipitazioni riprende a ovideporre da metà agosto ed inizio settembre. Vi è tuttavia da osservare che i cambiamenti climatici in corso hanno portato ad attacchi precoci delle colture (Gutierrez *et al.*, 2021). In natura una singola femmina di *B. oleae* è in grado di produrre fino a 12 uova al giorno, per un totale di 200-250 uova nel corso della propria vita. Le uova non schiudono sotto i 7,5-10° C e nemmeno sopra i 30-32°C (Malheiro *et al.*, 2015), mentre si registra un tasso di mortalità delle pupe del 48% circa a 30°C (Daane e Johnson, 2010). Gli adulti a temperature estive superiori ai 35°C non sono attivi (Genç, 2016).

A temperature ottimali, lo sviluppo delle uova, delle larve e delle pupe può impiegare rispettivamente fino a 1, 8 e 9 giorni (Daane e Johnson, 2010), ma la

larva generalmente si può sviluppare in un lasso di tempo compreso tra gli 8 e 37 giorni (Malheiro *et al.*, 2015). La larva si nutre della polpa dell'oliva, all'interno della quale scava una galleria sub superficiale. Nei giorni seguenti la larva effettua la muta e passa a larva di seconda età (di colore bianco giallastro) e successivamente larva di terza età; entrambe producono gallerie tortuose e profonde all'interno dell'oliva. Prima di impupare, la larva costruisce una nicchia vicino al nocciolo e apre un foro di 1,5-2 mm verso l'esterno del frutto che usa per uscire lasciandosi cadere sul terreno (Giacalone, 2011).

La pupa sverna in inverno nel terreno ad una profondità compresa tra 3 e 10 cm, per poi sfarfallare in primavera e a causa dell'assenza di olive, l'adulto è costretto a migrare in cerca di fonti zuccherine di varie origini. Le successive generazioni appaiono verso metà estate e lo sviluppo di quest'ultime è favorito dalla disponibilità di olive, arrivando a completare una generazione in 30-35 giorni (Vossen *et al.*, 2006). L'adulto in condizioni ottimali è in grado di vivere dai 2-6 mesi in base alle temperature e risorse alimentari a disposizione.

1.3 Danni

La mosca dell'olivo causa ogni anno perdite ingenti sia per quantità che per qualità del raccolto di olive. Le stime suggeriscono che le ferite e l'azione infestante delle larve siano causa di una perdita del 15-30% della quantità di prodotto annuo (Al-Dmour *et al.*, 2021; Sinno *et al.*, 2020) e di una perdita di circa 5-15% della resa d'olio (Mraicha *et al.*, 2010).

I danni apprezzabili ad una prima analisi sono le ferite per l'ovideposizione e il canale scavato dalla larva, fondamentale per la sua respirazione all'interno dell'oliva (Figura 3).

Un esempio delle possibili conseguenze di questi danni è l'aborto della drupa a causa della disidratazione, prima che possa essere raccolta. Inoltre, la ferita può essere sito di entrata di numerosi batteri, lieviti e funghi patogeni per la pianta (Byron e Gillett, 1999) che possono formare una forte marcescenza e dunque costringere lo scarto del prodotto durante la raccolta.

L'infestazione causa indirettamente anche una serie di alterazioni biochimiche nell'oliva con conseguenze sulla qualità dell'olio. Le olive infestate a causa dell'attività deteriorante dei microrganismi patogeni sono soggette all'aumento della acidità a causa della produzione di enzimi idrolitici e lipolitici degli stessi

(Mraicha *et al.*, 2010; Vossen *et al.*, 2006). L'acidità di un olio è un indice importante per la classificazione delle qualità d'olio d'oliva; quindi, un aumento della quantità di acido oleico dal 2% fino al 10% è molto rilevante (www.ersa.fvg.it). Inoltre, le ferite sono causa dell'ossidazione e della diminuzione dei composti fenolici e delle componenti volatili totali contenute nel prodotto finale, oltre che dell'aumento dei perossidi. Nelle olive più mature si riscontrano maggiori danni, a causa di un maggior contenuto di componenti volatili e polifenoli (Mraicha *et al.*, 2010; Gucci *et al.*, 2012).

Un'altra conseguenza dei danni è la progressiva degradazione dei carotenoidi in proporzione alla infestazione delle drupe in feofitina, che diminuisce il loro potenziale antiossidante nell'olio durante la conservazione (Mraicha *et al.*, 2010).

Tutte queste condizioni portano al deperimento organolettico dell'olio, conferendogli un sapore stantio, ammuffito, vinoso e rancido (Valencic *et al.*, 2020).



Figura 3: Danni visibili sulla drupa a causa della ovideposizione di *B. oleae*. (tratto da http://ersa.regione.fvg.it/cms/aziende/monitoraggi/organismi/schede/06_Bactrocera-oleae-Mosca-delloolivo.html)

1.4 Tipi di contenimento

1.4.1. Monitoraggio

Il primo passo per il contenimento della mosca dell'olivo è il monitoraggio, che generalmente avviene attraverso trappole a feromoni, ad attrattivi alimentari o cromotropiche, per poter decidere la convenienza dell'eventuale intervento.

Il monitoraggio è fondamentale per definire la densità della popolazione di un determinato infestante e la periodicità con cui quest'ultimo si manifesta. Una volta ottenute queste informazioni è possibile determinare se l'infestazione supera la soglia economica d'intervento. Il trattamento deve essere eseguito solo con la presenza di una densità di popolazione del patogeno in grado di determinare perdite economiche superiori al costo del trattamento (Letardi e Rapagnani, 2015). La soglia di intervento viene valutata prendendo in esame 100 drupe/ha, in particolare selezionando le olive più esterne sulla chioma dell'albero, nonché le più facilmente accessibili all'attacco del fitofago (www.regione.abruzzo.it).

1.4.2 Lotta chimica

La lotta può essere di tipo preventivo o curativo. La lotta preventiva si pone il fine di ridurre la popolazione di mosche adulte, in modo da diminuire il numero di ovideposizioni e di conseguenza limitare la presenza di larve e di danni alle drupe. Il secondo tipo di lotta ha invece un fine curativo verso le larve.

Le tecniche di lotta preventive considerano l'utilizzo di strategie a basso impatto ambientale e per questo c'è un forte interesse nel loro sviluppo. Per queste strategie è previsto l'uso di esche alimentari, in genere attrattivi ammoniacali per la cattura massale, oppure sostanze avvelenate che vengono spruzzate sulla chioma dell'albero e poi assorbite per contatto o ingerite dalle mosche. Esiste anche la strategia dell'"attract and kill", che permette di attirare con feromoni o attrattivi alimentari le mosche in appositi dispositivi impregnati di insetticida (Bagnoli e Iannotta, 2012).

Per diminuire la propensione dell'insetto alla ovideposizione nella drupa trattata, è possibile utilizzare anche dei repellenti e antiovideponenti, come ad esempio gli oli essenziali, sali di rame ed argille, che causano una modifica del colore o dell'odore dell'oliva percepiti dall'insetto (Checchia *et al.*, 2022). Questi

repellenti possono avere inoltre una azione battericida nei confronti di microrganismi che l'adulto di *B. oleae* utilizza come fonte di nutrimento e che le giovani larve usano per permettere il processo digestivo (Belcari *et al.*, 2005).

E' dimostrato che *B. oleae* è attirata da molecole prodotte dai batteri sulla superficie delle drupe, come *Pseudomonas putida* (Sacchetti *et al.*, 2007). Questa informazione è utilizzabile per sviluppare battericidi specifici per eliminare i batteri produttori di sostanze attrattive sull'oliva, ma in futuro potrebbero essere utilizzate anche come metodi di contrasto che sfruttano tecniche di disorientamento (Mazzon *et al.*, 2019).

Vi è infatti da dire, che tecniche come quelle del maschio sterile, o l'uso di microrganismi entomopatogeni come la Wolbachia (Apostolaki *et al.*, 2011), non sono ancora tecnologicamente avanzate per poter essere sufficienti alla riduzione della popolazione in maniera efficace e mantenendo costi sostenibili.

La lotta curativa si attua con l'applicazione di larvicidi ad azione penetrante a base di sostanze quali il dimetoato, fosmet e imidacloprid. Questi consentono l'uccisione delle larve e successivamente permettono alle gallerie scavate nelle drupe di cicatrizzarsi, limitando l'entrata di microrganismi responsabili di fermentazioni e altri processi deterioranti (www.ersa.fvg.it). Negli ultimi anni la lotta curativa ha dovuto affrontare una doppia serie di critiche. In primo luogo, è stata messa in discussione a causa della presenza di residui tossici lasciati dai larvicidi per la sicurezza di operatori e consumatori. In secondo luogo, c'era sempre il rischio di colpire anche artropodi non target dei trattamenti. Inoltre, se la rotazione costante degli insetticidi utilizzati non veniva applicata correttamente, si rischiava di far sviluppare popolazioni di insetti resistenti.

Tali problematiche sono state recepite anche dalla Commissione Europea, che con il regolamento di esecuzione (UE) 2019/1090 del 26 giugno 2019, ha disapprovato l'utilizzo del dimetoato (Checchia *et al.*, 2022), per eliminare il rischio di esposizione a questa sostanza attiva, in quanto è un agente mutageno in vivo. Inoltre, anche il neonicotinoide imidacloprid è stato revocato per tossicità nei confronti di insetti impollinatori, organismi acquatici e uccelli (Dallago e Baldessari, 2018).

1.5 Simbiosi nella mosca dell'olivo

La simbiosi è definita come associazione intima e protratta tra due o più organismi di specie differenti. Ci sono diversi tipi di relazioni simbiotiche: quelle in cui possono trarne un vantaggio entrambi gli individui, quelle in cui trae vantaggio solamente uno dei due organismi senza arrecare danno all'altro oppure quelle in cui l'organismo può trarre benefici anche a discapito dell'altro individuo (Paracer e Ahmadjian, 2000). Il termine “primari” invece si riferisce al fatto che l'organismo colonizzato non è in grado di sopravvivere senza la presenza di questi batteri simbiotici (Gonella *et al.*, 2012).

La simbiosi batterica tra microrganismi e insetti è molto diffusa (Buchner, 1965; Moran & Baumann, 2000; Von Dohlen *et al.*, 2001): la mosca dell'olivo è infatti strettamente associata al batterio simbiote *Candidatus Erwinia* (Capuzzo *et al.*, 2005). È interessante notare come la composizione dei batteri simbiotici in diverse popolazioni italiane di *B. oleae* sia costante anche in più regioni, prendendo in esame campioni anche a più di 800 km di distanza, in più periodi stagionali (Savio *et al.*, 2012). Oltre a ciò, è importante considerare il rapporto che questa relazione tra mosca e simbiote ha con l'ambiente: è infatti dimostrato che le mosche allevate in laboratorio perdono il loro rapporto simbiotico con *Ca. E. dacicola*, anche se in rari casi non facilmente riproducibili, è possibile ottenere un trasferimento del simbiote per via orizzontale, mescolando popolazioni allevate in laboratorio con popolazioni selvatiche (Livadaras *et al.*, 2021).

Il simbiote primario *Ca. E. dacicola* si trova principalmente nel bulbo esofageo e qui si può moltiplicare e arrivare nell'intestino, mentre nella larva è localizzabile nel ceco gastrico (Siden-Kiamos *et al.*, 2022). Il simbiote e gli altri batteri sono trasmessi verticalmente dalla madre alla progenie: quando le uova escono dall'ovopositore della madre, queste passano attraverso il retto dove si trovano le sacche rettali che distribuiscono masse di batteri sul corion delle uova. I batteri, a seguito della schiusa, vengono ingeriti dalla giovane larva e trasferiti nel proprio canale alimentare e potrà in seguito beneficiare del simbiote (Sacchetti *et al.*, 2019).

La presenza di *Ca. E. dacicola* è essenziale per il benessere della mosca ed è stato dimostrato che eliminare o ridurre questi batteri simbiotici comporta una diminuzione della fertilità e della vitalità degli adulti (Estes *et al.*, 2014). Infatti,

questo batterio simbiote permette la sintesi di vitamine e aminoacidi necessari per lo sviluppo delle larve e per la produzione di uova nell'adulto in condizioni di carenza di aminoacidi essenziali (Estes *et al.*, 2014; Siden-Kiamos *et al.*, 2022). Un'ulteriore funzione svolta da *Ca. E. dacicola* è la detossificazione di sostanze antimicrobiche secondarie, come l'oleuropeina, un glicoside fenolico presente nelle olive acerbe (Ben-Yosef *et al.*, 2015). Inoltre, la mancanza dei batteri simbiotici facilita l'infezione della larva con microrganismi potenzialmente patogeni per l'individuo stesso (Koskinioti *et al.*, 2020).

Negli ultimi anni si sta sviluppando un nuovo tipo di approccio per il controllo degli organismi nocivi, basato sulla stretta dipendenza dell'insetto rispetto al suo simbiote, nota come controllo simbiotico (CS). In effetti, la sopravvivenza e l'evoluzione degli insetti è fortemente influenzata dai microrganismi con i quali si associa (Engel e Moran, 2013). Il controllo simbiotico consiste nell'eliminazione o riduzione del contenuto di batteri simbiotici oppure dall'interruzione della simbiosi durante la trasmissione verticale (dalla madre alla prole) (Gonella *et al.*, 2020).

Tutto ciò include l'uso o anche lo sviluppo di nuove sostanze che possano interrompere tali simbiosi. Tra le sostanze già utilizzate il rame, uno dei fungicidi più utilizzati per le colture, è stato proposto come antimicrobico da Tzanakakis (1985) e la sua attività battericida contro il simbiote della mosca dell'olivo è stata riportata in due recenti lavori (Bigiotti *et al.* 2019; Sinno *et al.*, 2020).

Un altro prodotto che ha dimostrato avere una buona attività antimicrobica è il Dentamet[®], un biocomplesso di zinco, rame e acido citrico. Il trattamento delle uova della cimice asiatica, *Halyomorpha halys*, con questo prodotto ha provocato un'elevata mortalità dei primi stadi di sviluppo dell'insetto (Gonella *et al.*, 2019).

1.6 Scopo del lavoro

Il controllo sostenibile delle popolazioni di *B. oleae* è un tema molto importante per le filiere olivicole italiane a causa delle gravi perdite economiche per il settore oleario e delle olive da tavola.

A causa del surriscaldamento globale che ha permesso alla mosca dell'olivo di colonizzare nuove regioni (Gutierrez *et al.*, 2021) e della revoca, per il loro

impatto negativo sull'ambiente e sull'uomo, delle principali sostanze utilizzate nella lotta contro la mosca quali il dimetoato e l'imidacloprid, gli scienziati stanno cercando delle alternative efficaci e sostenibili al controllo delle popolazioni di *B. oleae*.

Negli ultimi anni si sta sviluppando un approccio chiamato controllo simbiotico, volto ad interrompere il rapporto tra gli insetti dannosi e il loro simbiote primario con l'utilizzo di prodotti sostenibili per l'ambiente e per l'uomo.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di testare un prodotto già registrato in olivicoltura come fertilizzante, al fine di valutare la sua efficacia antimicrobica nel disturbare la trasmissione verticale di *Ca. E. dactylopii*. In condizioni naturali il batterio simbiote rimane sul corion dell'uovo in attesa di essere acquisito dalla larva neonata, quindi esposto all'ambiente circostante. Sfruttando questa particolarità il prodotto sarà applicato direttamente su olive, dove è appena avvenuta l'ovideposizione.

L'efficacia del prodotto è stata valutata analizzando la percentuale di impupamento rispetto ad altri prodotti e al controllo non trattato.

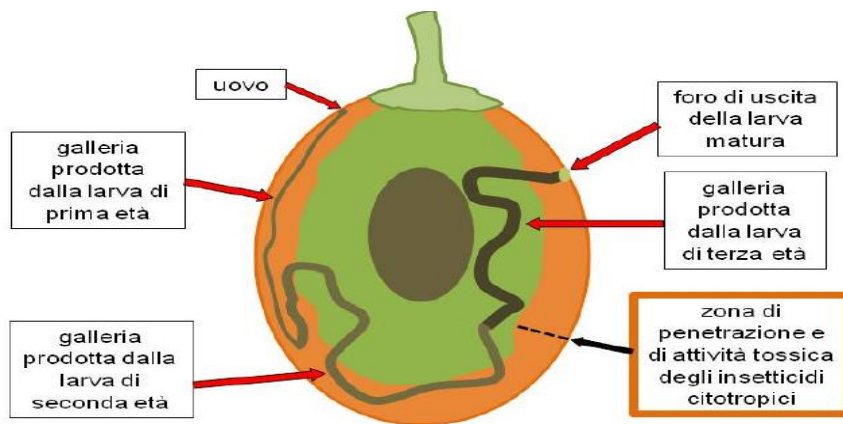


Figura 4: Schema del percorso di alimentazione di una larva di *B. oleae* a partire dall'uovo (tratto da climaesostenibilita.it).

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

2.1 Allevamento delle mosche

Le olive utilizzate per il mantenimento degli allevamenti e per gli esperimenti sono state raccolte a mano da olivi che non hanno subito trattamenti fitosanitari nell'arco dell'anno per eliminare le interferenze di eventuali prodotti chimici. Le olive sono state raccolte tra i mesi di agosto e settembre, presso oliveti del Veneto (Legnaro e Verona), Abruzzo e Basilicata. Le olive raccolte in campo sono state accuratamente selezionate in laboratorio, assicurando che fossero prive di fori da *B. oleae*, marcescenze o altri danni meccanici.

Le olive infestate sono state posizionate in una cassetta al di sopra di un vassoio contenente farina di mais per facilitare l'impupamento delle larve mature (Figura 5). Le pupe raccolte tramite setacciamento della farina sono state poi trasferite all'interno di gabbie "Bug Dorm" di 30 x 30 x 30 (Figura 6). Gli adulti sfarfallati sono stati allevati a temperatura di circa 25°C. L'alimentazione delle mosche consisteva in una dieta secca a base di zucchero e lievito liofilizzato in rapporto 4:1, mentre l'acqua era sempre disponibile tramite un abbeveratoio. L'allevamento è stato mantenuto ed allargato ponendo olive nelle "Bug Dorm" contenenti mosche sessualmente mature per permettere l'ovideposizione e la successiva raccolta delle pupe.



Figura 5: Vassoio per l'impupamento delle larve.



Figura 6: Allevamenti di *B. oleae* presso il laboratorio di entomologia ad Agripolis.

2.2 Prodotti testati

Al fine di interrompere la trasmissione verticale del simbiote della mosca dell'olivo, e valutare l'effetto sulla fitness della mosca dell'olivo, è stato scelto di utilizzare un prodotto con potenziale effetto antimicrobico, commercialmente chiamato Dentamet[®], ad una concentrazione di 5,47 mg/hL. Tale prodotto è stato previamente testato con successo su batteri simbiotici di altre specie come la cimice asiatica, *Halyomorpha halys* (Gonella et al., 2019).

Come controllo negativo sono state analizzate olive non trattate e olive trattate con acqua. Inoltre, è stato utilizzato l'ipoclorito di sodio 1% (candeggina) noto per l'alto potere battericida.

2.2.1 Dentamet[®]

Il Dentamet[®] è un fertilizzante a base di zinco al 4% e rame al 2% complessata ad acido citrico (sotto forma di idracido). Viene utilizzato per correggere situazioni di carenza di questi due importanti microelementi coinvolti nei sistemi enzimatici delle piante. Essendo molecole a basso peso molecolare e avendo un pH di 2,5, permette di essere assorbito facilmente per via fogliare e radicale, permanendo nella zona delle radici per circa 2 settimane. Inoltre, Dentamet[®] stimola la sintesi di sostanze naturali di difesa (pre-inibitine) contro situazioni di stress ambientale e da cause parassitarie. L'idracido di acido citrico viene

ottenuto grazie ad un processo fermentativo simile a quello dell'*Aspergillus niger*; dunque, è di utilizzo sicuro per l'uomo e l'ambiente ed è consentito impiego in agricoltura biologica (www.agriduemiladelprete.it; www.fertilgest.com).

2.3 Trattamento delle olive infestate con prodotti antimicrobici

Come materia prima sono state selezionate delle olive sane e successivamente inserite in contenitori assieme a femmine sessualmente mature per un tempo di circa 24 ore per permettere l'ovideposizione. Sono state inserite un numero di olive circa doppio rispetto a quello delle femmine. Trascorse le 24 ore sono state poi selezionate le olive con massimo 3 punture grazie all'ausilio di stereoscopi.

Le olive sono state poste su setacci di metallo e i prodotti spruzzati fino al gocciolamento, muovendo il setaccio per garantire l'uniformità del trattamento, assicurandosi che le olive fossero completamente bagnate. E' stato scelto di applicare i prodotti mediante nebulizzazione per ricreare al massimo possibile una situazione simile al campo. Gli esperimenti sono stati replicati 5 volte per un totale di 195 punture.

2.4 Campionamento delle pupe

Le olive utilizzate negli esperimenti sono state controllate a partire dal tredicesimo giorno per osservare e quantificare il numero di pupe fuoriuscite.

Nel periodo compreso tra il trattamento e il campionamento delle larve e delle pupe, le olive venivano osservate ed eliminate se mostravano segni evidenti di marciume e muffa.

2.5 Analisi Statistiche

I dati relativi alla sopravvivenza delle pupe sono stati confrontati per capire se c'erano differenze significative tra le tesi testate (Dentamet[®], candeggina e acqua) e il controllo non trattato. I dati relativi alla sopravvivenza delle larve sono stati analizzati secondo il modello binomiale (R Core Team, 2021). La variabile di risposta è stata il numero di larve che hanno raggiunto lo stadio di pupa (pupation rate) rispetto al numero di punture iniziali, mentre la variabile categorica ha considerato il numero di tesi (4 livelli: non trattato, candeggina, acqua e Dentamet[®]).

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di verificare l'effetto di un prodotto antibatterico, il Dentamet[®], sulla percentuale di impupamento (pupation rate).

Gli esperimenti condotti hanno evidenziato che l'utilizzo del Dentamet[®] ha ridotto significativamente ($P < 0,05$) la percentuale di impupamento delle larve rispetto al non trattato. Va ricordato che la percentuale di impupamento è comunque sottostimata in tutte e 4 le tesi in quanto calcolata sul numero di punture dell'oliva e non sul numero reale di uova. È noto infatti che la mosca dell'olivo non sempre punge l'oliva per la deposizione (punture sterili). Invece non ci sono state differenze significative tra il non trattato e le altre due tesi (acqua e ipoclorito di sodio) (Fig. 7).

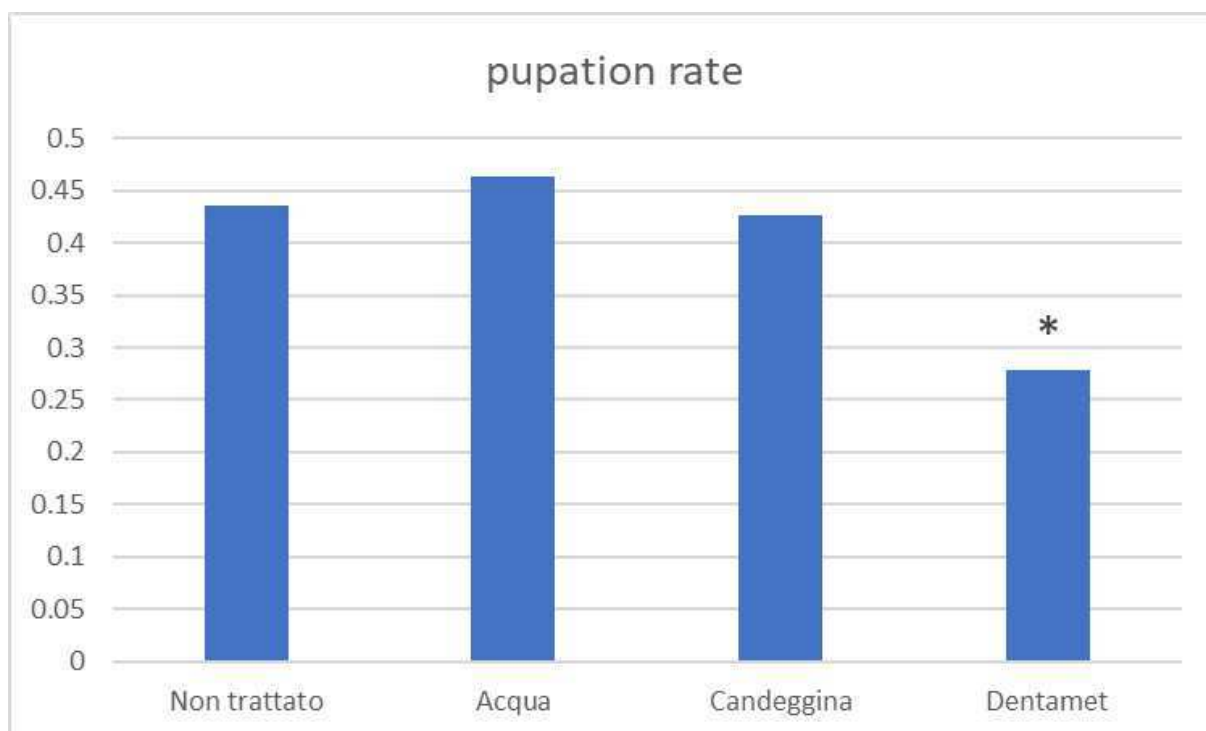


Figura 7: Media del numero di larve impupate per ogni sostanza testata. $P < 0,05$; differenze significative rispetto al non trattato.

Il Dentamet® è un formulato di composti noti per la loro azione battericida, quali rame (Bigiotti *et al.*, 2019; Lamichhane *et al.*, 2018), zinco (Carvalho *et al.*, 2019; Agarwal *et al.*, 2018) e acido citrico (Neal *et al.*, 2012). L'applicazione di questo prodotto sulle uova di un altro organismo nocivo, *Halyomorpha halys*, ha riportato risultati simili sulla sopravvivenza dei primi stadi di sviluppo dell'insetto. Inoltre è stata osservata una diminuzione della concentrazione del batterio simbiote dopo i trattamenti che avrebbe comportato la diminuzione della fitness della cimice asiatica (Gonella *et al.*, 2019).

Poiché *Ca. E. dacicola* è essenziale per *B. oleae*, specialmente durante lo sviluppo larvale nell'oliva acerba (Ben-Yosef *et al.*, 2015), la riduzione della percentuale di larve che hanno raggiunto lo stadio di pupa, potrebbe essere stata influenzata dalla diminuzione o assenza del simbiote. Sono previste ulteriori analisi mediante il ricorso a PCR quantitativa (qPCR) al fine di verificare e quantificare la presenza del simbiote nelle larve e pupe ottenute da uova trattate con il prodotto.

Per quanto riguarda la candeggina, prodotto con noto potere antimicrobico, l'effetto non significativo può essere stato causato dalla bassa concentrazione di prodotto utilizzata in questo studio oppure da una limitata capacità di raggiungere le uova all'interno delle olive durante e dopo il trattamento. Le analisi previste per verificare la presenza/assenza del simbiote dopo i trattamenti permetteranno di capire l'efficacia dell'attività antimicrobica di questo prodotto a questa concentrazione.

CAPITOLO 4: CONCLUSIONE

B. oleae è un importante fitofago che causa nel settore olivicolo delle grandi perdite quantitative e qualitative principalmente nelle zone mediterranee.

Al fine di testare strategie di lotta alternative all'uso dei fitofarmaci, il presente lavoro ha testato l'effetto antimicrobico del Dentamet®, un fertilizzante già registrato su olivo in agricoltura convenzionale e biologica, nei confronti del simbiote *Ca. E. dacicola* e di conseguenza nella fitness della mosca dell'olivo.

Le analisi hanno evidenziato un effetto negativo del prodotto sullo sviluppo di *B. oleae* in particolare sulla percentuale di larve che riescono a raggiungere lo stadio pupale. Alla luce di questi risultati, è possibile considerare il Dentamet® un valido candidato per futuri test in condizioni reali in campo. Vi sono, tuttavia, diverse variabili che dovranno essere considerate in campo per un'azione efficace del prodotto simbioticida, come il tempo di esposizione, la stabilità dei prodotti, e numero di applicazioni.

In conclusione, il presente lavoro suggerisce come l'applicazione di prodotti antimicrobici come il Dentamet® può rappresentare una valida strategia per ridurre la presenza di popolazioni della mosca dell'olivo ed inoltre, questa metodologia potrebbe essere estesa anche ad altri fitofagi strettamente associati a batteri simbiotici.

BIBLIOGRAFIA

Agarwal, H., Menon, S., Kumar, S. V., & Rajeshkumar, S. (2018). Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chemico-biological interactions*, 286, 60-70.

Al-Dmour, S., AL-Zyoud, F., & Al-Absi, K. (2021). Changes in Chemical and Physical Quality Attributes of Olives as Influenced by Chemical Control of the Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera, Tephritidae) in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 17(3), 321-332.

Apostolaki, A., Livadaras, I., Saridaki, A., Chrysargyris, A., Savakis, C., & Bourtzis, K. (2011). Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with

Wolbachia: towards a symbiont-based population control strategy. *Journal of Applied Entomology*, 135(7), 546-553.

Bagnoli B., Iannotta N., 2012 - Principali insetti fitofagi e relativi metodi di controllo integrato. Vol. XIV della Collana dell'Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olivo.

Belcari, A., Sacchetti, P., Rosi, M. C., & Del Pianta, R. (2005). The use of copper products to control the olive fly (*Bactrocera oleae*) in central Italy. *IOBC WPRS BULLETIN*, 28(9), 45.

Ben-Yosef, M., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., & Yuval, B. (2015). Symbiotic bacteria enable olive fly larvae to overcome host defences. *Royal Society open science*, 2(7), 150170.

Bigiotti, G., Pastorelli, R., Belcari, A., & Sacchetti, P. (2019). Symbiosis interruption in the olive fly: Effect of copper and propolis on *Candidatus Erwinia dacicola*. *Journal of Applied Entomology*, 143(4), 357-364.

Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience Publishers, Inc., New York.

Byron, M. A., & Gillett-Kaufman, J. L. (1999). Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* (Rossi)(Insecta: Diptera: Tephritidae). Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension.

Carvalho, R., Duman, K., Jones, J. B., & Paret, M. L. (2019). Bactericidal activity of copper-zinc hybrid nanoparticles on copper-tolerant *Xanthomonas perforans*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.

Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A., & Girolami, V. (2005). 'Candidatus *Erwinia dacicola*', a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1641-1647.

Checchia, I., Perin, C., Mori, N., & Mazzon, L. (2022). Oviposition Deterrent Activity of Fungicides and Low-Risk Substances for the Integrated Management of the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Insects*, 13(4), 363.

Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual review of entomology*, 55(1), 151-169.

Dallago, G., & Baldessari, M. (2018). Afidi e neonicotinoidi: soluzioni a confronto: Cantina sociale di Trento, Trento, 14 novembre 2018. Fondazione Edmund Mach.

Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735.

Estes, A. M., Segura, D. F., Jessup, A., Wornoayporn, V., & Pierson, E. A. (2014). Effect of the symbiont *Candidatus Erwinia dacicola* on mating success of the olive fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 34(S1), S123-S131.

Genc, H. (2014). Embryonic development of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae), in vivo. *Turkish Journal of Zoology*, 38(5), 598-602.

Genç, H. (2016). Infestations of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)(Diptera: Tephritidae), in different olive cultivars in Çanakkale, Turkey. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 10(7), 439-442.

Giacalone C. (2011) Il controllo di *Bactrocera oleae* (Rossi) e di altri carpofagi negli oliveti biologici in Sicilia e Sud Africa. Tesi di Dottorato, pp. 5.

Gonella, E., Orrù, B., & Alma, A. (2019). Egg masses treatment with micronutrient fertilizers has a suppressive effect on newly-emerged nymphs of

the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*. *Entomol. Gen*, 39, 231-238.

Gonella, E., Orrù, B., Marasco, R., Daffonchio, D., & Alma, A. (2020). Disruption of Host-Symbiont Associations for the Symbiotic Control and Management of Pentatomid Agricultural Pests—A Review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 547031.

Gucci, R., Caruso, G., Canale, A., Loni, A., Raspi, A., Urbani, S., ... & Servili, M. (2012). Qualitative changes of olive oils obtained from fruits damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi). *HortScience*, 47(2), 301-306.

Gonella, E., & Alma, A. (2012). Simbiosi negli artropodi e potenziali applicazioni. *Simbiosi negli artropodi e potenziali applicazioni*, 41-61..

Gutierrez, A. P., Ponti, L., Neteler, M., Suckling, D. M., & Cure, J. R. (2021). Invasive potential of tropical fruit flies in temperate regions under climate change. *Communications biology*, 4(1), 1-14.

Koskinioti, P., Ras, E., Augustinos, A. A., Beukeboom, L. W., Mathiopoulos, K. D., Caceres, C., & Bourtzis, K. (2020). Manipulation of insect gut microbiota towards the improvement of *Bactrocera oleae* artificial rearing. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(6-7), 523-540.

Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3), 1-18.

Letardi, A., & Rapagnani, M. R. (2015). Gestire in modo efficiente gli input chimici ed energetici in agricoltura, riducendo l'inquinamento ambientale.

Livadaras, I., Koidou, V., Pitsili, E., Moustaka, J., Vontas, J., & Siden-Kiamos, I. (2021). Stably inherited transfer of the bacterial symbiont *Candidatus Erwinia dacicola* from wild olive fruit flies *Bactrocera oleae* to a laboratory strain. *Bulletin of Entomological Research*, 111(3), 379-384.

Mazzon, L., Martinez Sañudo, I., e Vincenzo, Girolami. (2019). Relazioni dei ditteri tefritidi con i batteri simbiotici del tratto intestinale.

Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LXVII, 2019: 63-72

Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2015). A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: From the tree to the table. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 226-242.

Moran, N. A., & Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Current opinion in microbiology*, 3(3), 270-275.

Mraicha, F., Ksantini, M., Zouch, O., Ayadi, M., Sayadi, S., & Bouaziz, M. (2010). Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3235-3241.

Neal, J. A., Marquez-Gonzalez, M., Cabrera-Diaz, E., Lucia, L. M., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., ... & Castillo, A. (2012). Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Food Research International*, 45(2), 1123-1128.

Paracer, S., & Ahmadjian, V. (2000). *Symbiosis: an introduction to biological associations*. Oxford University Press.

R Core Team. 2021 R: a language and environment for statistical computing, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. URL <https://www.R-project.org/>

Rotundo G., Germinara G. S. (2014) Controllo della Mosca delle olive con prodotti di origine vegetale, pp. 1, 17

Sacchetti, P., Landini, S., Granchietti, A., Camèra, A., Rosi, M. C., & Belcari, A. (2007). Attractiveness to the olive fly of *Pseudomonas putida* isolated from the foregut of *Bactrocera oleae*. *IOBC WPRS BULLETIN*, 30(9), 37.

Sacchetti, P., Pastorelli, R., Bigiotti, G., Guidi, R., Ruschioni, S., Viti, C., & Belcari, A. (2019). Olive fruit fly rearing procedures affect the vertical transmission of the bacterial symbiont *Candidatus Erwinia dacicola*. *BMC biotechnology*, 19(2), 1-13.

Savio, C., Mazzon, L., Martinez-Sañudo, I., Simonato, M., Squartini, A., & Girolami, V. (2012). Evidence of two lineages of the symbiont ‘*Candidatus Erwinia dacicola*’ in Italian populations of *Bactrocera oleae* (Rossi) based on 16S rRNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(1), 179-187.

Scortichini, M. (2022). The Epidemiology and Control of “Olive Quick Decline Syndrome” in Salento (Apulia, Italy). *Agronomy*, 12(10), 2475.

Siden-Kiamos, I., Koidou, V., Livadaras, I., Skoufa, E., Papadogiorgaki, S., Papadakis, S., ... & Vontas, J. (2022). Dynamic interactions between the symbiont *Candidatus Erwinia dacicola* and its olive fruit fly host *Bactrocera oleae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103793.

Sinno, M., Bézier, A., Vinale, F., Giron, D., Laudonia, S., Garonna, A. P., & Pennacchio, F. (2020). Symbiosis disruption in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi), as a potential tool for sustainable control. *Pest Management Science*, 76(9), 3199-3207.

Tremblay E. (2005) *Entomologia applicata*, Liguori Editore, vol. 3, parte seconda, 2a edizione, pp. 133, 135, 136, 145.

Tzanakakis M.E. (1985) Considerations on the possible usefulness of olive fruit fly symbiotoxicides in integrated control in olive groves.

Valenčič, V., Butinar, B., Podgornik, M., & Bučar-Miklavčič, M. (2020). The Effect of Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* (Rossi) Infestation on Certain Chemical Parameters of Produced Olive Oils. *Molecules*, 26(1), 95.

Von Dohlen, C. D., Kohler, S., Alsop, S. T., & McManus, W. R. (2001). Mealybug β -proteobacterial endosymbionts contain γ -proteobacterial symbionts. *Nature*, 412(6845), 433-436.

Vossen, P., Varela, L., & Devarenne, A. (2006). Olive fruit fly. University of California Cooperative Extension,- Sonoma County <http://cesonoma.ucdavis.edu/files/27231.pdf>.

Xue, R., Cui, E. L., Hu, G. Q., & Zhu, M. Q. (2022). The composition, physicochemical properties, antimicrobial and antioxidant activity of wood vinegar prepared by pyrolysis of *Eucommia ulmoides* Oliver branches under different refining methods and storage conditions. *Industrial Crops and Products*, 178, 114586.

SITOGRAFIA

http://www.ersa.fvg.it/cms/aziende/monitoraggi/organismi/schede/06_Bactrocera-oleae-Mosca-dellolivo.html

<https://www.regione.abruzzo.it/system/files/agricoltura/fitosanitario/difesa-integrata/approfondimenti-tecnici/la-mosca-dell-olivo.pdf>

<https://store.agriduemiladelprete.it/difesa/41-dentamet-miscela-rame-zinco-potente-disinfettante.html>

<https://fertilgest.imagelinetwork.com/it/formulati/Dentamet/18489>