

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di agronomia animali alimenti risorse naturali e
ambiente (DAFNAE)

Tesi di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Possibilità di controllo simbiotico di *Bactrocera oleae* (Rossi) attraverso l'applicazione di antimicrobici su frutti infestati da uova

Possibility of symbiotic control of *Bactrocera oleae* (Rossi) through
application of antimicrobials on egg-infested fruit

Relatore:

Prof. Luca Mazzon

Correlatori:

Dott.ssa Ivana Carofano

Dott.ssa Isabel Martinez-Sañudo

Laureanda
Sara Bernardi
Matricola n.
2023795

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Indice

Riassunto	1
Abstract.....	2
1 Introduzione.....	3
1.1 <i>Bactrocera oleae</i>	3
1.1.1 Classificazione e morfologia.....	3
1.1.2 Ciclo Biologico	4
1.1.3 Diffusione e danni	6
1.1.4 Metodi di contenimento	8
1.2 Le simbiosi batteriche negli insetti.....	10
1.2.1 Simbiosi di <i>Bactrocera oleae</i>	11
2 Scopo del lavoro	13
3 Materiali e metodi.....	14
3.1 Allevamento di <i>Bactrocera oleae</i>	14
3.2 Schema sperimentale.....	15
3.3 Prodotti testati	16
3.4 Valutazione degli effetti del Dentamet®.....	17
3.5 Analisi molecolari	17
3.6 Analisi dei dati.....	18
4 Risultati.....	20
4.1 Effetto dei trattamenti su <i>Ca. Erwinia dacicola</i>	20
4.1.1 Larve di prima età (L1).....	20
4.1.2 Larve di terza età (L3)	20
4.1.3 Adulti	21
4.1.4 Power analysis	22
5 Discussione.....	24
6 Bibliografia.....	26
7 Sitografia.....	31

Riassunto

Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae) è tra i principali fitofagi dell'olivo nel bacino del Mediterraneo, responsabile di importanti perdite produttive ed economiche. Il suo controllo è tradizionalmente mediato dall'utilizzo di insetticidi di sintesi, ma con le recenti normative che mirano ad una riduzione dei fitofarmaci per salvaguardare la salute umana e l'ambiente, la ricerca di nuovi metodi di controllo è passata in primo piano. Le alternative disponibili come la cattura massale o i dispositivi "Attract and kill" sono state spesso discusse per i loro effetti non sempre soddisfacenti. Tra le nuove alternative oggetto di studio, il controllo simbiotico potrebbe avere dei risvolti positivi per contenere le infestazioni di *B. oleae* in un'ottica di gestione sostenibile. È noto, infatti, che la mosca dell'olivo, in tutte le fasi del suo sviluppo, possiede una simbiosi stretta con il batterio *Candidatus Erwinia dacicola*. La simbiosi del tefritide con tale batterio è di estrema importanza per tutti gli stadi dell'insetto. Per quanto riguarda le larve, il batterio concorre alla detossificazione dell'oleuropeina, un glucoside fenolico tossico presente naturalmente nella polpa delle olive. Successivamente, durante la fase adulta del dittero, il batterio svolge un ruolo fondamentale nella degradazione di composti azotati altrimenti inaccessibili alla mosca. Il ruolo chiave del simbiote per la fitness dell'ospite ha quindi dato il via a nuovi studi per il controllo del fitofago basato sulla manipolazione della simbiosi. In questo lavoro di tesi si è indagato in laboratorio l'effetto antimicrobico di Dentamet® spruzzato direttamente sulle olive infestate con lo scopo di interrompere la trasmissione verticale di *Ca. Erwinia dacicola*. Sono state effettuate analisi genetiche attraverso la tecnica PCR quantitativa, o "Real Time qPCR", che ha permesso di quantificare il DNA del simbiote presente negli stadi di larva di prima e terza età e adulto della mosca dell'olivo. Dai risultati emersi non ci sono state differenze significative tra i trattamenti e il non trattato. Questo può essere dovuto alle concentrazioni di Dentamet® troppo basse rispetto alla modalità di applicazione scelta. Si osserva comunque una tendenza di diminuzione del simbiote nelle larve di prima età, mentre nello stadio di larva di terza età e adulti si ha un incremento di *Ca. Erwinia dacicola* rispetto al non trattato. L'aumento del simbiote nel tempo può essere dovuto ad una mancanza di batteri competitori dovuta al trattamento. Questo potrebbe aver favorito la moltiplicazione di *Ca. Erwinia dacicola* a scapito di altre specie batteriche.

Abstract

Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae) is the most destructive pest of olives in the Mediterranean basin, responsible for important productive and economic losses. Its control is traditionally mediated using synthetic insecticides, but with recent regulations aimed at reducing pesticides to safeguard human health and the environment, there's a growing demand for finding alternative control methods. Available alternatives such as mass capture or attract-and-kill devices have often been discussed for their not always satisfactory effects. Among the new alternatives under study, symbiotic control could have positive implications for containing *B. oleae* infestations from a sustainable management perspective. Indeed, it is known that the olive fly, at all stages of its development, is strictly associated with the bacterium *Candidatus* *Erwinia dacicola*. The symbiosis with this bacterium is essential for the fly lifespan. In the larval stages, the bacterium contributes to the detoxification of oleuropein, a toxic phenolic glycoside naturally present in olive pulp. Subsequently, during the adult stage, the symbiotic bacterium plays a key role in the breakdown of nitrogen compounds otherwise inaccessible to the olive fruit fly. The importance of *Ca. Erwinia dacicola* for the host fitness opens new possibilities for *B. oleae* control based on symbiosis manipulation.

In this thesis work, the antimicrobial effect of Dentamet® sprayed directly on the infested olives was investigated. The purpose of the study was to disrupt the vertical transmission of *Ca. Erwinia dacicola* in the egg stage.

Genetic analyses were performed using quantitative PCR technique, or "Real-Time qPCR". The PCR analysis allowed quantification of the symbiont DNA present in the first and third instar larvae and in the olive fruit fly adults. No significant differences of the *Ca. E. dacicola* titer were observed between treated and untreated samples. The Dentamet® dose and the application mode chosen for these experiments could have influenced these results. However, a decreasing trend of the symbiont load was observed in the first instar larvae. On the contrary, the bacterial load in the third instar larvae and in the adults, was slightly higher in treated samples respect to the untreated ones. Treatments could have reduced the load of other associated bacteria and without competition the primary symbiont could have multiplied over time at the expense of the other bacterial species.

1 Introduzione

1.1 *Bactrocera oleae*

1.1.1 Classificazione e morfologia

Bactrocera oleae (Rossi, 1790) è un dittero Tephritidae appartenente alla subfamiglia Dacinae che include alcuni dei carpfagi di maggior importanza economica, comprese le specie dei generi *Dacus* e *Ceratitis* (Kent M. Daane & Marshall W. Johnson, 2010).

L'adulto ha una lunghezza di 4-5 mm; il capo è fulvo con occhi verde metallico e antenne brune appena più corte del capo. Il torace dorsalmente è di colore grigio e presenta tre linee longitudinali più scure; lo scutello è giallo e l'addome è di colore giallo brunastro con macchie nere di grandezza variabile sui primi quattro segmenti. Le ali sono trasparenti con una macchia apicale scura (Fig. 1.1 A) (Tremblay, 2005). Le femmine sono caratterizzate da un evidente ovopositore nero in grado di perforare l'esocarpo delle drupe ancora immature (Fig. 1.1 B). Le uova sono fusiformi, lisce, di colore bianco opaco; la lunghezza varia tra 0,7 e 1 mm e la larghezza tra 0,12 e 0,18 mm. È presente un piccolo tubercolo micropilare per la respirazione dell'embrione (Fig. 1.1 C) (Tremblay, 2005).

Le larve sono apode, con apparato masticatore che presenta delle mandibole nere ad uncino sporgenti dal capo. Sono presenti tre stadi larvali: la prima età è quasi trasparente, di 1-2 mm di lunghezza con apparato boccale appena sclerotizzato. La seconda età è di forma cilindrica, misura 3-4 mm con apparato boccale parzialmente sclerotizzato. La terza età è di forma conica allungata con la parte anteriori allungata e quella posteriore tondeggiante; l'apparato boccale è completamente sclerotizzato, la lunghezza della larva matura è di 7-8 mm (Fig.1.2 A) (Tremblay, 2005).

La pupa ha lunghezza di 3,5-4,5 mm, di forma cilindroide, il colore varia dal giallo al marrone scuro (Fig. 1.2 B) (Tremblay, 2005).





Fig. 1.1 A: maschio adulto; **B:** femmina adulta; **C:** uovo di *B. oleae* (foto di Federico Marangoni)

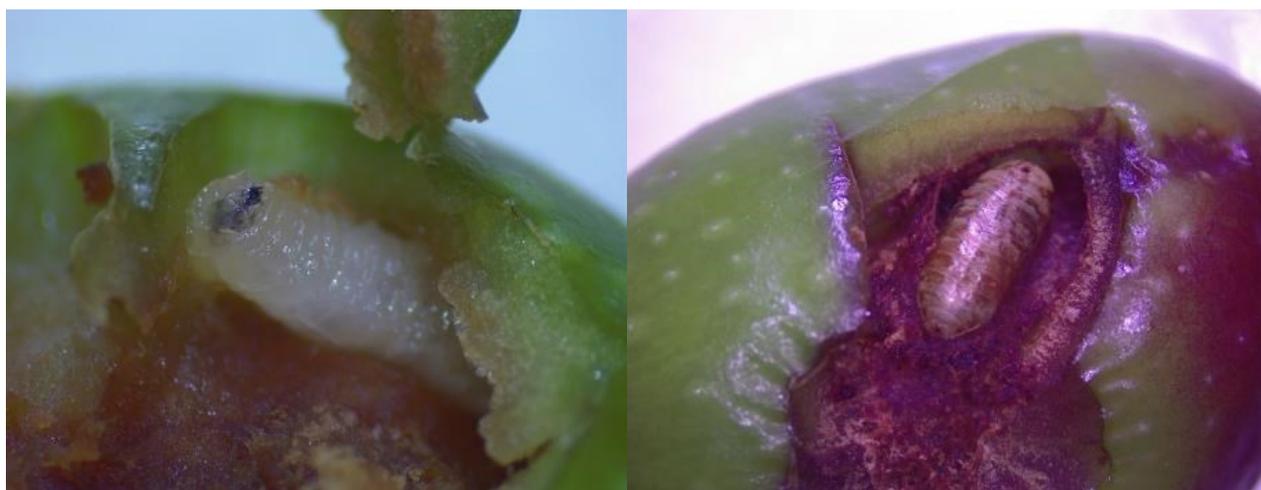


Fig. 1.2: A: larva di terza età con mandibole ad uncino (nere); **B:** pupa di *B. oleae* (foto di Federico Marangoni)

1.1.2 Ciclo Biologico

La mosca dell'olivo è considerata una specie omodinama, ovvero capace di svilupparsi per tutto l'anno se le condizioni ambientali e alimentari sono favorevoli, ma mostra in realtà due picchi riproduttivi distinti, uno a fine inverno e l'altro a fine estate (Bagnoli & Iannotta, 2012). Lo svernamento è trascorso solitamente allo stadio di pupa a pochi centimetri di profondità nel terreno, ma può avvenire anche allo stadio larvale nelle drupe rimaste in pianta o da adulto in zone riparate (De Cristofaro *et al.*, 1995).

L'attività di volo degli adulti inizia con temperature di 13-14°C mentre la riproduzione con temperature di 16-17°C (Bagnoli & Iannotta, 2012). Le femmine svernanti completano una generazione già a inizio primavera a carico delle eventuali drupe rimaste sulle piante (Marchini *et. Al.*, 2017; Bagnoli & Iannotta,

2012). La maggior presenza del fitofago si ha dalla fase di indurimento del nocciolo (Luglio) fino alla raccolta delle olive (Novembre). Le generazioni che si susseguono durante questo periodo variano a seconda delle condizioni climatiche, e in particolare della temperatura. La presenza della mosca è maggiore quando il periodo estivo è caratterizzato da piogge frequenti e temperature miti che favoriscono le continue ovideposizioni (Bagnoli & Iannotta, 2012). Le femmine hanno massima attività di deposizione a temperature di 20-27°C e umidità relativa alta, arrivando a deporre fino a 300 uova (Genç & Nation, 2008). Valori di temperatura limite, al di sotto dei 6-7°C e superiore i 33-34°C, determinano l'inattività degli adulti e periodi prolungati con alte temperature ne determinano la morte, in particolare sia di adulti che di larve (Angeli *et al.*, 2020).

L'incontro tra i sessi e la riproduzione sono mediati dall'emissione da parte della femmina del feromone sessuale costituito da 1,7-dioxaspiro (5,5) undecano e da altri comportamenti pre-copula che comprendono l'emissione di suoni (da strofinio delle ali su appositi pettini addominali) da parte dei maschi (De Cristofaro *et al.*, 2001; Benelli *et al.*, 2012). L'ovideposizione inizia 4-6 giorni dopo l'accoppiamento: la femmina, dopo aver scelto l'oliva, guidata da stimoli visivi e chimici (Rizzo *et al.*, 2012), perfora con l'ovopositore la drupa (Fig. 1.3) creando una camera profonda 0,5 mm dove verrà ovideposto un singolo uovo, generalmente uno per frutto. Durante questa fase l'insetto succhia il liquido dalla ferita di ovideposizione per rigurgitarlo *in situ* al fine di marcare l'oliva con sostanze repellenti per le altre femmine (Bagnoli & Iannotta, 2012). Il cosiddetto "bacio della ferita" è un comportamento protettivo dei siti di ovideposizione tipico dei Tephritidae che ha lo scopo di ridurre la competizione larvale (Benelli & Canale, 2016). Sulle olive non ancora invaiate la puntura dell'ovopositore appare come una macchia triangolare di 1,5 mm che imbrunisce dopo pochi minuti (Fig. 1.4 A)



Fig. 1.3: Femmina di *B. oleae* durante l'ovideposizione (foto di Ivana Carofano)

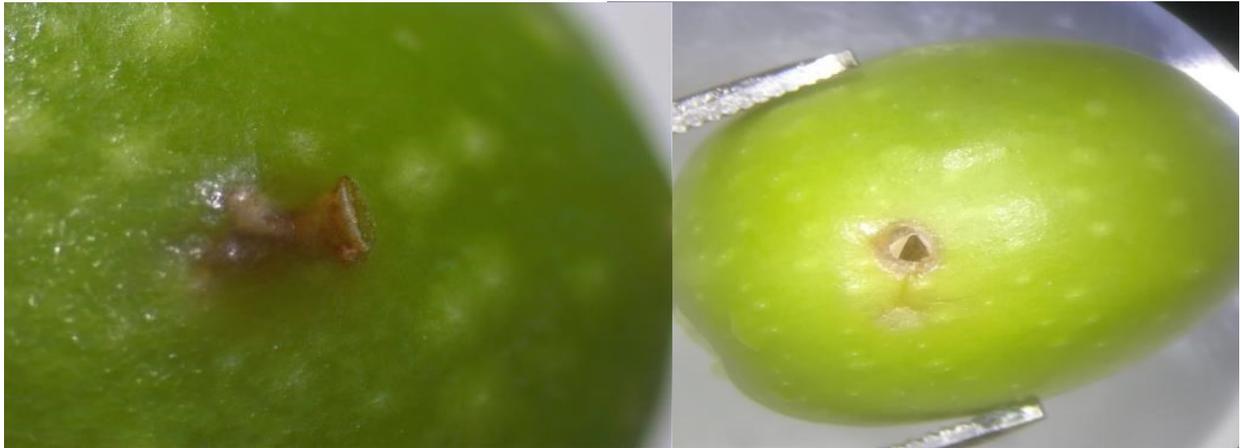


Fig. 1.4 A: Puntura di ovideposizione (foto di Federico Marangoni); B: foro di uscita della larva (foto di Ivana Carofano)

La schiusura delle uova avviene in 2-4 giorni dall'ovideposizione, le larve carpofaghe scavano una galleria nella polpa completando lo sviluppo larvale in 12-15 giorni. La larva di terza età, prima di impuparsi, scava una camera e un foro verso l'esterno di 1.5-2 mm, chiuso da un sottile strato di epidermide del frutto (Fig. 1.4 B). Lo stadio di pupa può avvenire o all'interno dell'oliva, o la larva può lasciarsi cadere nel terreno dove si impuperà a 3-6 cm di profondità (Giacalone, 2011; Bagnoli & Iannotta, 2012). Questa fase può durare 8-10 giorni o fino a 6 mesi nel periodo invernale (Vossen & Devarenne, 2012). Gli adulti, al contrario delle larve carpofaghe, si nutrono di sostanze zuccherine: melata di omotteri, essudati di piante e nettare di fiori che forniscono la quota di carboidrati (Bateman, 1972; Fletcher, 1987). La frazione proteica è invece un fattore limitante per *B. oleae*, in quanto la risorsa principale di azoto nella dieta è fornita dagli escrementi di uccelli e l'azoto in essi presente è legato ad acido urico, urea e Sali di ammonio (Ben-Yosef *et al.*, 2014; O'dell *et al.*, 1960; Tsahar *et al.*, 2005). Gli insetti non sono in grado di degradare purine e urea; pertanto, la dieta della mosca dell'olivo tende ad essere sbilanciata a favore di aminoacidi non essenziali o contenenti composti azotati non accessibili (Ben-Yosef *et al.*, 2014). Questo pone delle limitazioni soprattutto per le femmine che necessitano di quantità proteiche maggiori rispetto ai maschi per la produzione di uova (Ben-Yosef *et al.*, 2014).

1.1.3 Diffusione e danni

La mosca dell'olivo si è distribuita in gran parte delle zone di coltivazione dell'olivo. Oltre al bacino del Mediterraneo, è presente in Centro e Sud Africa, Medio Oriente, Isole Canarie e recentemente è stata accidentalmente introdotta in Messico e California (Figura 1.5) (Rice *et al.*, 2003; Nardi *et al.*, 2005).

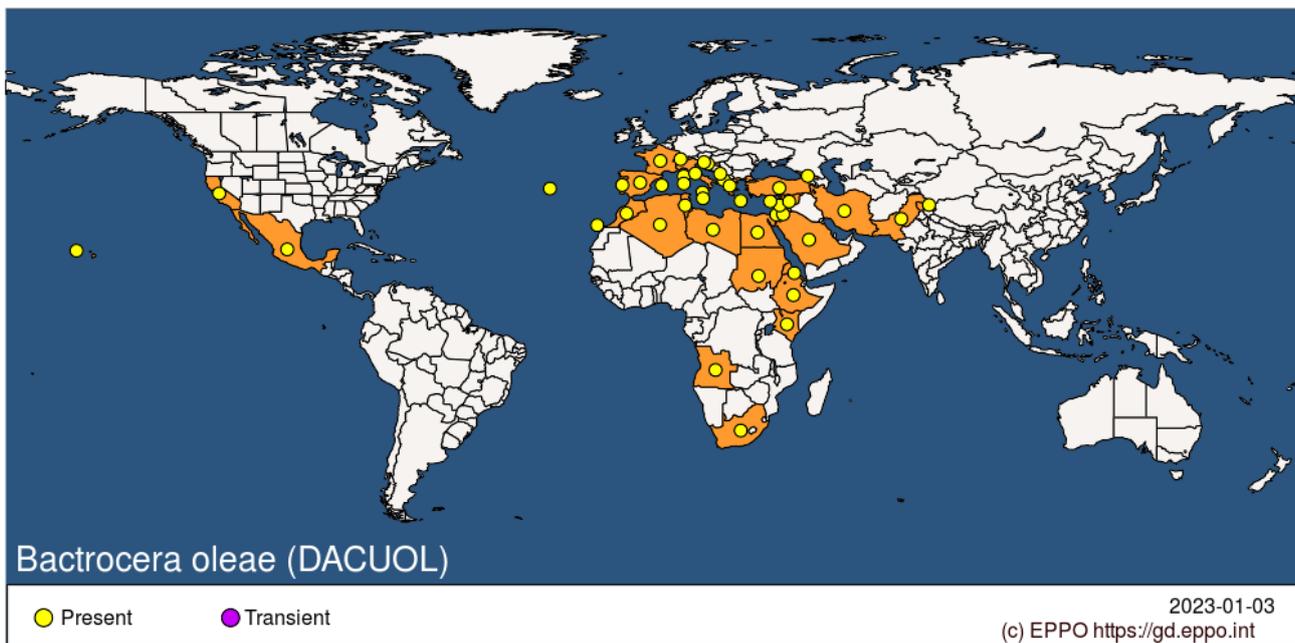


Fig. 1.5: Diffusione di *B. oleae* a livello mondiale (tratto da EPPO <https://gd.eppo.int>)

La mosca dell'olivo è monofaga e si ciba esclusivamente del genere *Olea*, in particolare della specie *Olea europaea*. Si stima che a livello mondiale *B. oleae* porta ad una diminuzione della produzione totale delle olive di circa il 5% con una perdita economica di oltre 800 milioni di dollari all'anno (Bagnoli & Iannotta, 2012).

Le drupe diventano suscettibili a partire da poco dopo l'allegagione, aumentando la sensibilità nel corso dell'estate e autunno. I danni causati dalla mosca sono sia di tipo diretto che indiretto. I danni diretti sono dovuti alla perdita di peso della drupa causata dall'attività trofica delle larve di II e III età all'interno del mesocarpo. Si stima che la perdita di polpa causato dalle larve varia del 3-5% sul peso fresco, fino ad arrivare al 20% nelle cultivar a frutto piccolo (Bagnoli & Iannotta, 2012). Le gallerie scavate dalle larve possono inoltre provocare cascola dei frutti, mentre le punture di ovideposizione, anche se sterili, costituiscono motivo di deprezzamento delle olive da mensa.

I danni indiretti causati dall'infestazione di *B. oleae* determinano una serie di alterazioni biochimiche nel frutto, andando ad inficiare sulla qualità dell'olio. Le gallerie e il foro di uscita della larva matura permettono il contatto diretto della polpa con aria e acqua. Questo comporta l'ossidazione del mesocarpo con conseguente aumento dei perossidi nell'olio. Le aperture nel frutto sono inoltre siti di entrata per agenti fitopatogeni come batteri (*Xanthomonas*), lieviti e muffe (*Fusarium*, *Penicillium*, ecc.) che causano un aumento dell'acidità (Malheiro *et al.*, 2015).

1.1.4 Metodi di contenimento

1.1.4.1 Monitoraggio

Il monitoraggio è il primo pilastro su cui si basa la difesa integrata e costituisce quindi la base per impostare qualsiasi tecnica di difesa nei confronti di *B. oleae*. In commercio sono ad oggi disponibili tre tipi di trappole: trappole alimentari innescate con sostanze zuccherine, Sali ammoniacali o proteine idrolizzate, trappole sessuali innescate con l'1.7-dioxaspiro [5,5] undecano o trappole cromotropiche gialle. Ogni tipologia riscontra però dei limiti: ad esempio nel caso di quelle chemiotropiche alimentari la selettività è piuttosto bassa e l'efficacia si riscontra soprattutto in ambienti aridi. Le trappole cromotropiche gialle sono anch'esse scarsamente selettive andando ad attirare anche l'entomofauna utile e altri artropodi. Le trappole a feromone sessuale invece dimostrano un'elevata selettività, ma solo nei confronti dei maschi che, per quanto riguarda l'infestazione, sono meno interessati rispetto alle femmine (Bagnoli & Iannotta, 2012). Per queste limitazioni sono state messe in commercio trappole che utilizzano tutte e tre le strategie andando perciò ad aumentare il numero di catture (Mucci *et al.*, 2019). Il posizionamento più favorevole delle trappole è quello a Sud-Ovest della chioma, zona maggiormente suscettibile agli attacchi di *B. oleae*, in quanto il microclima è più favorevole al suo sviluppo (Giacalone, 2011). Il numero di trappole per ettaro varia, a seconda della tipologia, da una a tre. L'obiettivo del monitoraggio è quello di stabilire se le eventuali soglie di intervento sono state superate (Franz, 1973). Il campionamento in campo è altrettanto importante: si consiglia infatti di prelevare un campione di 100 drupe ad ettaro prelevando 1-2 olive per pianta (Bagnoli & Iannotta, 2012).

1.1.4.2 Contenimento delle infestazioni

Per il controllo del dittero è importante partire dalla prevenzione. In primis è consigliabile ubicare gli oliveti in areali dove il dittero non sia in grado di esprimere il suo massimo potenziale biotico (Bagnoli & Iannotta, 2012). È altrettanto importante prendere in considerazione la suscettibilità varietale, in quanto cultivar con colorazione scura della drupa e con contenuto maggiore di oleuropeina sfavoriscono gli attacchi e lo sviluppo delle larve di prima età (Iannotta *et al.*, 2007). Uno dei metodi più conosciuti e utilizzati anche in passato è la raccolta anticipata delle olive che limita l'esposizione delle drupe nel periodo di maggior presenza della mosca in campo (Bagnoli & Iannotta, 2012).

La lotta si basa sulla recente Direttiva europea 2009/128/CE in ambito della difesa fitosanitaria che ha rivoluzionato il tipo di approccio per il controllo parassitario. Anche in ambito olivicolo si è passati da trattamenti a calendario a una lotta integrata con lo scopo di diminuire l'impiego di mezzi chimici e di selezionare quelli a minor impatto ambientale. Inoltre, a seguito del regolamento UE 2022/94, sono state revocate le autorizzazioni dei prodotti fitosanitari contenenti Imidacloprid, fosmet e dimetoato. Questi principi attivi agiscono su uova e larve, considerati i principali bersagli della difesa fitosanitaria della mosca, e la loro revoca ha portato ad una carenza di prodotti ad azione ovolarvicida con

conseguente difficoltà nel contenimento delle popolazioni (www.olivoelio.edagricole.it). Tra i gruppi di sostanze attive ammesse (Fig. 1.6) per *B. oleae* sono presenti i piretroidi (deltametrina, lambda-cialotrina o cipermetrina), il flupyradifurone, l'acetamiprid (neonicotinoide), *Beauveria bassiana* e lo spinosad (spinosine) che hanno un'azione adulticida (Calabrese & Sciarretta, 2019). La deltametrina, ad esempio, è una sostanza utilizzata insieme ad attrattivi feromonici e alimentari nella preparazione di trappole per la cattura massale (ECO-TRAP®) (Fig. 1.7). La cattura massale è un sistema di lotta tipicamente preventivo ed esprime massima efficacia quando è applicato su uliveti di superficie maggiore di due ettari o su appezzamenti isolati (Caleca *et al.*, 2012). Anche la strategia "Attract and kill" può essere utilizzata per il controllo del tefritide utilizzando lo stesso principio di attirare con sostanze attrattive su dispositivi appositi impregnati di insetticida (Ecotrap, Magnet Oil) (www.ersa.fvg.it). Lo spinosad invece può essere utilizzato per la preparazione di esche spray avvelenate con lo scopo di contenere l'incremento della popolazione (Spintorfly®). In questo caso si ha un minor impiego di acqua in quanto è sufficiente trattare il 50% di piante. Il trattamento viene ripetuto ogni 8-12 giorni dalla cattura dei primi adulti (www.corteva.it). Gli attrattivi maggiormente utilizzati in combinazione con le esche sono sostanze ammoniacali e proteiche; la loro funzione attrattiva è esercitata dalla simulazione della produzione di ammonio nella sostanza organica nelle acque stagnanti. Da questo si deduce che *B. oleae* è attratta da Sali di ammonio e da esche proteiche solo in assenza di piogge, ponendo un limite della validità del metodo.

OLIVO			
AVVERSITA'	CRITERI D'INTERVENTO	SOSTANZE ATTIVE E AUSILIARI	LIMITAZIONI D'USO
Fumaggine	Interventi agronomici E' necessario effettuare una buona aerazione della chioma Interventi chimici Di norma non sono necessari interventi diretti;	<i>Prodotti rameici</i> (1)	(1) Max 4 kg ettaro/anno di rame metallo
Mosca delle olive <i>Bactrocera oleae</i>	Difesa biologica: lanci di <i>Opius concolor</i> Difesa chimica: trattare al superamento della soglia del 5 - 7% di infestazione attiva (somma di uova e larve) su un campione di 100 drupe/ha prelevando 1-2 drupe per pianta	<i>Cattura massale con trappole a feromoni</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Opius concolor</i> <i>Esche attivate con Spinosad</i> (1) Altre Esche attivate Attract&Kill (2) Acetamiprid (3) Fosmet (4) Flupyradifurone (5)	(1) Max 8 applicazioni all'anno (2) Esche proteiche attivate con formulati autorizzati a base di Deltametrina o di Acetamiprid o di Lambda Cialotrina . (3) Max 2 interventi all'anno per trattamenti a tutta chioma (4) Max 2 interventi all'anno. Revocato: utilizzo entro 01/11/2022 (5) Max 1 tratt/anno indipendentemente dall'avversità
Tignola dell'olivo <i>Prays oleae</i>	Difesa chimica: Impiegare le trappole per il monitoraggio o fare riferimento ai Bollettini di Difesa Integrata comprensoriale; trattare eventualmente solo contro la seconda generazione)	<i>Bacillus thuringiensis</i> Fosmet (1) Acetamiprid (2) Spinetoram (3)	Max 1 trattamento all'anno. (1)Max 2 inter/anno. Revocato: utilizzo entro 01/11/2022 (2) Max 2 inter/anno per trattamenti a tutta chioma (3) Max 1 intervento all'anno
Sputacchina <i>Philaenus spumarius</i>	In caso di forte presenza effettuare un trattamento contro gli adulti tra maggio e giugno nelle prime ore del mattino avendo cura di bagnare bene la parte più interna della vegetazione. E' opportuno miscelare all'insetticida un olio minerale estivo per migliorarne l'efficacia. Fare riferimento ai bollettini di difesa integrata.	Fosmet (1) Flupyradifurone (2)	(1) Max 2 interventi all'anno. Revocato: utilizzo entro 01/11/2022 (2) Max 1 tratt/anno indipendentemente dall'avversità

Fig.1.6: Sostanze attive ammesse per il controllo di *B. oleae* (tratto da "Linee tecniche di Difesa Integrata Anno 2022, Regione del Veneto, U. O. Fitosanitario (DD n. 28 del 3 Maggio 2022)).

A livello di lotta preventiva si possono utilizzare prodotti di copertura ad azione repellente all'ovideposizione. Il più utilizzato, soprattutto in biologico, è il caolino che crea un microfilm sulla pianta limitando l'ovideposizione in quanto ostacola il riconoscimento del frutto da parte dell'insetto (Saour & Makee, 2004). Il limite del caolino sta nel fatto che sono necessari numerosi trattamenti in quanto è facilmente dilavabile.

Il controllo biologico della mosca dell'olivo sfruttando gli antagonisti naturali come il parassitoide *Opius concolor* non ha condotto a esiti soddisfacenti nel territorio italiano (Caleca *et al.*, 2012). Negli ultimi anni la ricerca si sta muovendo per trovare nuovi metodi di controllo di *B. oleae*. Tra le strategie emergenti il controllo simbiotico sembra possa essere una strada promettente al fine di una difesa efficace e sostenibile contro le infestazioni della mosca dell'olivo (Della e Nazionale, 2016; Ali *et al.*, 2016; Sacchetti *et al.*, 2017; Sinno *et al.*, 2020; Bigiotti *et al.*, 2021). Gli studi sulla simbiosi tra il simbionte primario *Ca. Erwinia dadicola* e *B. oleae* hanno infatti aperto la possibilità di utilizzare composti antibatterici al fine di interrompere la trasmissione verticale del simbionte. Alcuni prodotti antimicrobici, come ad esempio quelli a base di rame, hanno dimostrato la loro efficacia in prove di laboratorio per il controllo del carpofago (Sinna *et al.*, 2021; Belcari *et al.*, 2005; Bigiotti *et al.*, 2019b).

1.2 Le simbiosi batteriche negli insetti

La simbiosi, dal greco *syn* (insieme) + *biosis* (vivere), si riferisce a qualsiasi relazione stretta tra due entità biologiche distinte. Le simbiosi possono essere classificate in ectosimbiosi o endosimbiosi in base al legame fisico tra il simbionte e l'organismo ospite. Si parla di ectosimbiosi quando il simbionte vive sulla superficie dell'ospite, compresa la parte iniziale del tratto digestivo, mentre nell'endosimbiosi il simbionte vive all'interno del corpo o delle cellule di un altro organismo, quasi sempre in una relazione mutualistica (Kumar, 2015). Tra gli insetti, le endosimbiosi sono ampiamente diffuse, si stima infatti che più del 15-20% degli insetti presenta associazioni con microorganismi che possono localizzarsi nell'intestino, nelle cavità del corpo o nelle cellule (Buchner, 1965). Questo fattore ha permesso il loro successo evolutivo grazie alla flessibilità alimentare legata appunto agli organismi simbiotici presenti nel tratto digerente degli insetti. Un esempio è l'associazione tra il batterio del genere *Buchnera* e alcune specie di afidi: è noto, infatti, che la dieta degli ometteri è basata esclusivamente dal floema, sostanza ricca di carboidrati, ma povera di composti azotati; *Buchnera* gioca un ruolo chiave nel sintetizzare aminoacidi riuscendo quindi a favorire lo sviluppo del suo ospite (Bourtzis & Miller, 2003).

L'associazione simbiotica può avere un'ulteriore classificazione:

- obbligata (simbionti primari): quando i simbionti sono essenziali per la crescita, lo sviluppo e la sopravvivenza dell'ospite. Sono localizzati in una struttura specializzata chiamata batteriociti o

micetociti. Possono essere trasmessi da una generazione all'altra tramite trasmissione verticale (Kumar, 2015)

- facoltativa (simbionti secondari): quando i simbionti non sono necessari per la crescita e lo sviluppo dell'ospite, ma la loro presenza ne aumenta la fitness. Non vengono trasferiti da una generazione all'altra, ma sono occasionalmente trasportati orizzontalmente da un ospite all'altro (Kumar, 2015).

1.2.1 Simbiosi di *Bactrocera oleae*

I tefritidi sono ampiamente conosciuti per le associazioni batteriche che li coinvolgono (Bourtzis & Miller, n.d.; Martinez-Sañudo, 2009) e si è osservato che molte specie di questa famiglia presentano adattamenti morfologici per ospitare i batteri nel tratto digestivo (Girolami 1973, Mazzon *et al.* 2008). Petri, all'inizio del '900, fu il primo a descrivere la presenza di masse batteriche all'interno del bulbo esofageo di *B. oleae*. Negli adulti della mosca olearia è presente un diverticolo esofageo (Fig.1.7) che contiene popolazioni batteriche extracellulari in continuo accrescimento. Quest'organo, detto bulbo esofageo, rilascia periodicamente una quantità di batteri nell'esofago che colonizzano la parte anteriore dell'intestino medio (Petri, 1909; Girolami,1973; Capuzzo, 2005) La madre, dotata di ghiandole perianali contrattili che si riempiono di batteri, trasmette i simbionti alle uova durante l'ovideposizione. Una massa simile a un cappuccio batterico si trova tipicamente intorno al micropilo dell'uovo. I batteri si moltiplicano all'interno della ceca intestinale di tutti gli stadi larvali (Fig. 1.8), mentre la loro esatta localizzazione all'interno delle pupe non è nota. Inizialmente Petri ipotizzò che il batterio appartenesse alla specie *Pseudomonas savastanoi*, l'agente della rogna dell'olivo. Solo con i recenti studi attraverso analisi biomolecolari si è potuto identificare che il batterio presente nell'esofago non è *P. savastanoi*, ma mostra una marcata somiglianza con il genere *Erwinia*. Il nome, *Ca. Erwinia dacicola*, è stato proposto dopo la sua identificazione da Capuzzo *et al.*, (2005). Sono stati condotti differenti test di coltivabilità che non hanno però dato risultati positivi: ad oggi *Ca. Erwinia dacicola* risulta un batterio non coltivabile. *Ca. Erwinia dacicola* è un simbiote primario che ha un ruolo chiave in tutti gli stadi della mosca. In alcuni studi di Hagen (1966) e Hagen & Tassan (1972), è stato dimostrato che le larve di prima età provenienti da popolazioni alimentate con streptomina non riuscivano a svilupparsi, aumentandone la mortalità. Infatti, le olive immature hanno un elevato contenuto di oleuropeina, un glucoside fenolico tossico per la maggior parte degli erbivori. Grazie alla presenza del batterio la larva ha la capacità di detossificare il metabolita secondario riuscendo quindi a completare il suo sviluppo nell'oliva acerba (Ben-Yosef *et al.*, 2015). Successivamente, durante la fase adulta del dittero, il batterio svolge un ruolo fondamentale nella degradazione di composti azotati altrimenti inaccessibili alla mosca. In uno studio di Ben-Yosef (2010) è stato osservato che le femmine nutrite con una dieta povera di aminoacidi

essenziali aumentavano significativamente la produzione di uova in presenza del batterio, dimostrando il ruolo fondamentale di *Ca. Erwinia dacicola* nella fitness del dittero.

B. oleae, oltre alla simbiosi obbligata con *Ca. Erwinia dacicola*, presenta delle simbiosi facoltative con vari generi di batteri epifiti presenti sul filloplano come *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* (Bagnoli e Iannotta, 2012). Queste simbiosi secondarie devono ancora essere definite.

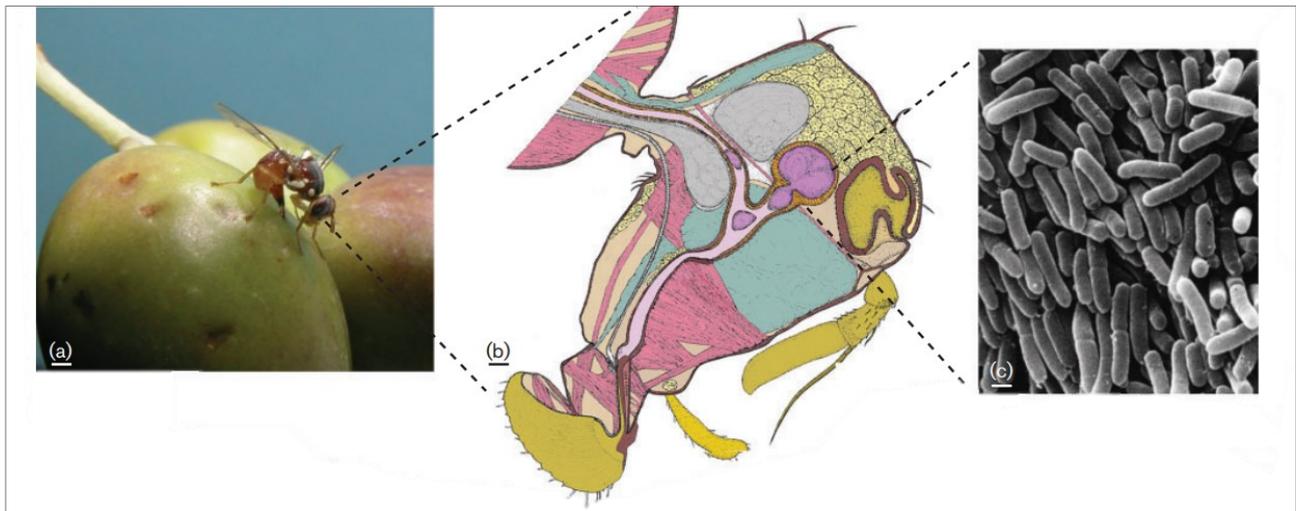


Fig. 1.7: localizzazione del batterio all'interno dell'adulto di *B. oleae*: a) Femmina di *B. oleae*; b) Sezione longitudinale del capo della mosca con indicazione del bulbo esofageo (linee tratteggiate) che espone il suo contenuto (ridisegnato da Girolami, 1973). c) Micrografia elettronica a scansione del contenuto del bulbo esofageo

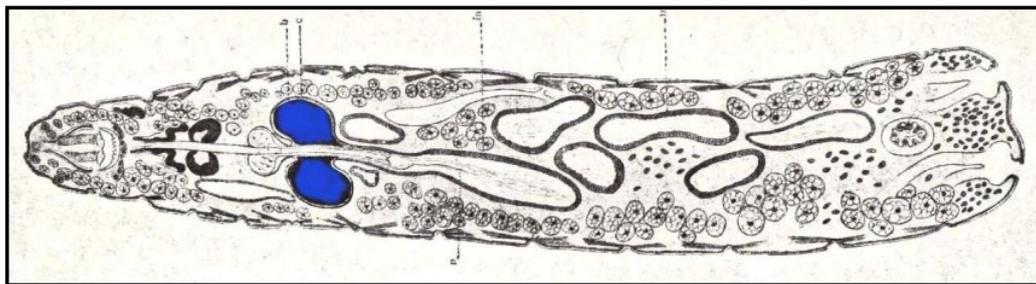


Fig. 1.8: Larva di *B. oleae*, in blu sono evidenziati i cechi intestinali con all'interno il batterio simbiote (Petri 1909).

2 Scopo del lavoro

I danni causati dal carpofago *B. oleae* sono un fattore limitante per la produzione olivicola mondiale, causando gravi perdite qualitative e quantitative sia per le olive da mensa che per l'olio extravergine di oliva.

Le recenti normative europee hanno portato a una diminuzione di sostanze attive disponibili per il controllo dell'insetto, infatti, i principali prodotti ovolarvicidi finora utilizzati, come imidacloprid (neonicotinoide) e dimetoato (fosfororganico), sono stati revocati (EU Regulation 2019/1090). È quindi necessario lo sviluppo di nuove strategie per contrastare il carpofago.

Tra le nuove possibilità, il controllo simbiotico (CS) rappresenta una possibile alternativa per la gestione sostenibile della mosca dell'olivo in un contesto di lotta integrata. La simbiosi primaria tra *Ca. Erwinia dacicola* e *B. oleae* è infatti fondamentale per la sopravvivenza del tefritide (Capuzzo *et al.*, 2005). Allo stadio larvale il simbiote ha il ruolo di degradare i composti soprattutto polifenolici presenti nella polpa delle olive (Ben-Yosef *et al.*, 2015) mentre negli adulti è coinvolto nella degradazione di composti azotati rendendoli disponibili per l'ospite (Ben-Yosef *et al.*, 2014)

Il presente lavoro di tesi si è posto come obiettivo quello di valutare se l'applicazione di prodotti ad azione antimicrobica (Dentamet®) su olive infestate da uova di *B. oleae* è in grado di bloccare o ridurre l'acquisizione dal corion dell'uovo da parte della larva del simbiote *Ca. Erwinia dacicola*, al fine di diminuirne la fitness.

3 Materiali e metodi

3.1 Allevamento di *Bactrocera oleae*

Gli allevamenti sono stati impostati secondo il protocollo da tempo messo a punto dal gruppo di ricerca. Le olive funzionali all'allevamento sono state raccolte da oliveti non trattati situati in Veneto, Toscana, Basilicata e Abruzzo nel corso dei mesi di Agosto, Settembre, Ottobre e Novembre 2022. Sono state poi trasferite presso i laboratori di entomologia del Dipartimento DAFNAE e conservate in laboratorio alla T di 23+/- 2°C e UR pari al 60%. Gli adulti sfarfallati dalle olive raccolte sono stati trasferiti in Bug Dorm (30 x 30 x 30 cm) (Fig. 3.1), e mantenuti alla temperatura di 25 ± 2°C. Ogni Bug Dorm era fornita di un abbeveratoio e di una piastra Petri contenente saccarosio e lievito in polvere liofilizzato (4:1). Gli allevamenti sono stati successivamente perpetuati esponendo olive sane alle mosche sessualmente mature per 24 ore. In seguito, le olive così infestate sono state posizionate in cassette con il fondo chiuso da una rete di maglia tale da lasciare passare le larve o le pupe uscenti dalle olive. Sottostante alla cassetta vi era un vassoio contenente farina di mais in modo da poter raccogliere facilmente le pupe cadute all'interno. La farina veniva settimanalmente setacciata e le pupe poste in nuove Bug Dorm in attesa dello sfarfallamento.



Figura 3.1: Allevamenti di *B. oleae* presso i laboratori di entomologia DAFNAE

3.2 Schema sperimentale

Per valutare l'efficacia antimicrobica dei prodotti testati, si è scelto di adottare il seguente schema sperimentale (Fig. 3.2): inizialmente, all'interno di una Bug Dorm, sono state esposte olive sane a femmine sessualmente mature per un periodo di 24 ore. Successivamente, dopo aver contato il numero di punture di ovideposizione, le olive sono state assegnate casualmente ai diversi trattamenti eseguiti subito dopo attraverso nebulizzazione.

Dopo il trattamento si sono raccolti i seguenti campioni:

- i) larve di prima età (a tre giorni dal trattamento)
- ii) larve di terza età (a dodici giorni dal trattamento)
- iii) adulti neo sfarfallati (circa 24 giorni dal trattamento)

I campioni sono stati messi in alcool 95° in attesa di essere utilizzati per le successive analisi molecolari che hanno previsto l'estrazione del DNA e la successiva analisi genomica per valutare la presenza e la quantità della carica batterica relativa a *Ca. Erwinia dadicola*. Lo schema sperimentale è stato ripetuto cinque volte.

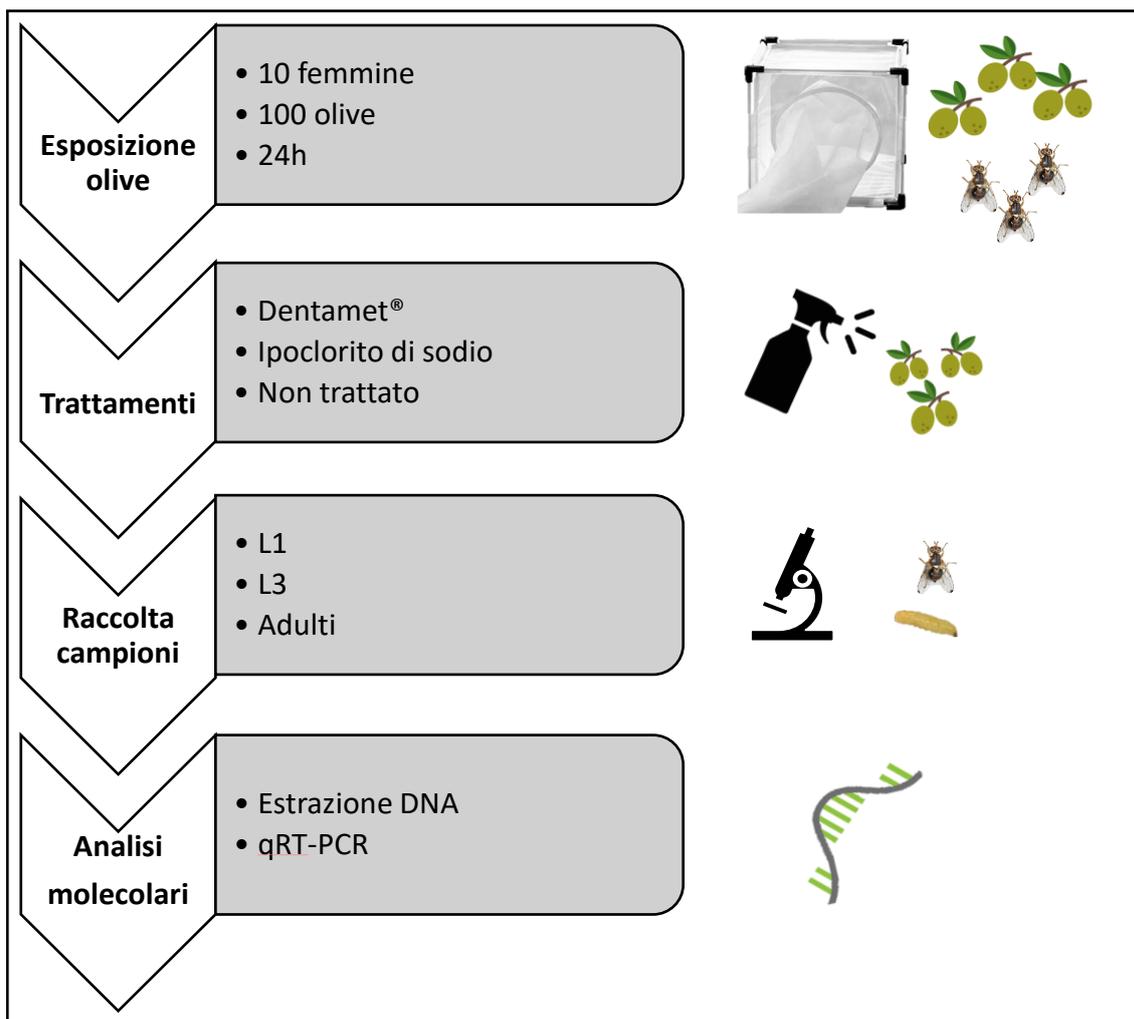


Fig. 3.2: Schema sperimentale adottato

3.3 Prodotti testati

Con lo scopo di interrompere la trasmissione verticale del simbionte, è stato individuato Dentamet® come candidato per la sperimentazione. Questo prodotto infatti è già stato utilizzato con successo nel controllo simbiotico di *Halyomorpha halys* (Gonella *et al.*, 2019) ed è registrato su olivo.

Come controllo si è scelto di analizzare olive non trattate, mentre come prodotto di riferimento per il noto potere biocida e sterilizzante è stato utilizzato ipoclorito di sodio.

Dentamet® è una miscela a base di zinco al 4% e rame al 2% complessata ad acido citrico sotto forma di idracido (Fig. 3.3). L'idracido è ottenuto per mezzo di una fermentazione simile a quella che avviene in natura ad opera di alcuni funghi del suolo. È utilizzato su varie colture, tra cui l'olivo per correggere situazioni di carenza di questi microelementi. La sua assimilazione avviene per via fogliare e radicale, permanendo nelle zone delle radici per circa due settimane. Inoltre, Dentamet® stimola la formazione di sostanze naturali di difesa (pre-inibitine) inducendo la protezione nei confronti di batteri e funghi o da situazioni da stress dovute da avversità ambientali. La sua origine naturale consente l'utilizzo del prodotto anche in agricoltura biologica, vista la sua sicurezza nei confronti dell'uomo e dell'ambiente (www.agriduemiladelprete.it, www.fertilgest.it)

<p>DENTAMET SYM Prodotto per il controllo simbiotico di <i>Halyomorpha halys</i> Liquido Solubile RAME (MoA: M, FRAC code M01)</p> <p>COMPOSIZIONE 100 g di prodotto contengono: RAME METALLO g 2 (= 25 g/L) (sotto forma di Solfato tribasico) Coformulanti q.b. a g 100</p> <p>INDICAZIONI DI PERICOLO: H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H410 Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.</p> <p>CONSIGLI DI PRUDENZA P101 In caso di consultazione di un medico, tenere a disposizione il contenitore o l'etichetta del prodotto. PREVENZIONE: P260 Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P270 Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. P273 Non disperdere nell'ambiente. REAZIONE: P303+P361+P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle. P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P391 Raccogliere il materiale fuoriuscito. CONSERVAZIONE: P405 Conservare sotto chiave. SMALTIMENTO: P501 Smaltire il contenuto/recipiente in conformità alla regolamentazione locale / regionale / nazionale</p> <p>INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI SUI PERICOLI: EUH 401 Per evitare rischi per la salute umana e per l'ambiente, seguire le istruzioni per l'uso.</p> <p>TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE DIACHEM S.p.A. - Via Tonale, 15 - 24061 Albano S. Alessandro (BG) - Tel. 0363 355611</p> <p>OFFICINA DI PRODUZIONE DIACHEM S.p.A. - U.P. SIFA - Caravaggio (BG)</p> <p>DISTRIBUITO DA DIACHEM S.p.A. - Via Tonale, 15 - 24061 Albano S. Alessandro (BG) - Tel. 0363 355611</p> <p>Registrazione Ministero della Salute n. 17878 del 19/07/2021 QUANTITÀ NETTA DEL PREPARATO: ml 250 - 500 -750; litri 1 - 5 - 10 - 20 - 25 PARTITA N.</p> <p>PRESCRIZIONI SUPPLEMENTARI Non contaminare l'acqua con il prodotto o il suo contenitore. Non pulire il materiale d'applicazione in prossimità delle acque di superficie. Evitare la contaminazione attraverso i sistemi di scolo delle acque dalle aziende agricole e dalle strade. Indossare guanti, maschera e tuta da lavoro durante le fasi di miscelazione/caricamento e applicazione del prodotto. Non rientrare nell'area trattata prima che la vegetazione sia completamente asciutta. Indossare tuta da lavoro prima di rientrare nell'area trattata.</p>	<p>INFORMAZIONI PER IL MEDICO Sintomi: denaturazione delle proteine con lesioni a livello delle mucose, danno epatico e renale e del SNC, emolisi. Vomito con emissione di materiale di colore verde, bruciori gastroesofagei, diarrea ematica, coliche addominali, ittero emolitico, insufficienza epatica e renale, convulsioni, collasso. Febbre da inalazione del metallo. Irritante cutaneo ed oculare. Terapia: gastrolisi con soluzione latte-albuminosa, se cupremia elevata usare chelanti, penicillamina se la via orale è agevole oppure CaEDTA endovena e BAL intramuscolo, per il resto terapia sintomatica. Consultare un Centro Antivelemi.</p> <p>CARATTERISTICHE DENTAMET SYM è una formulazione contenente rame. Il suo impiego viene raccomandato su nocciolo, melo, pero, olivo e fagiolo per interventi di contenimento del batterio <i>Pantoea carbekii</i> presente sulle uova di <i>Halyomorpha halys</i>. Tale azione comporta la riduzione della flora intestinale delle neanidi causandone la morte o generando malformazioni che ne compromettono la sopravvivenza.</p> <p>DOSI E MODALITÀ DI IMPIEGO Al fine di ridurre al minimo il potenziale accumulato nel suolo e l'esposizione per gli organismi non bersaglio, tenendo conto al contempo delle condizioni agroclimatiche, non superare l'applicazione cumulativa di 28 kg di rame per ettaro nell'arco di 7 anni. Si raccomanda di rispettare il quantitativo applicato medio di 4 kg di rame per ettaro all'anno. La dose consigliata è di 3-4 L/ha riferita a volumi d'acqua di 800-1500 L/ha per colture arboree e 200-500 L/ha per la coltura del fagiolo (pieno campo). DENTAMET SYM deve essere applicato in presenza del numero massimo di ovature di <i>Halyomorpha halys</i>, rilevate attraverso apposita attività di monitoraggio in campo.</p> <p>NOCCILO, MELO, PERO, OLIVO: applicare DENTAMET SYM in numero di 3-6 interventi a intervalli di 7 giorni. FAGIOLO (pieno campo): applicare DENTAMET SYM in numero di 2-4 interventi a intervalli di 7 giorni.</p> <p>COMPATIBILITÀ: il prodotto non è compatibile con i prodotti a reazione alcalina. Avvertenza: in caso di miscela con altri formulati deve essere rispettato il periodo di carenza più lungo. Devono inoltre essere osservate le norme precauzionali prescritte per i prodotti più tossici. Qualora si verificassero casi di intossicazione informare il medico della miscelazione compiuta.</p> <p>FITOTOSSICITÀ: Non trattare durante la fioritura. Non trattare piante in condizione di stress o in caso di forti escursioni termiche. Possibili sintomi fitotossici nei trattamenti in piena vegetazione su varietà di melo e pero cuprosensibili (es. Melo: Abbondanza Belford, Black Stayman, Golden delicious, Gravenstein Jonathan, Rome Beauty, Morgenduft, Stayman Red, Stayman Winesap, Black Davis, King Davis, Renetta del Canada, Rosa Mantovana. Pero: Abate Fetel, Buona Luigia d'Avranches, Butirra Clargeau, Passacassana, B.C. William, Dott. Jules Guyot, Favorita di Clapp, Kaiser, Butirra Giffard).</p> <p>INTERVALLO DI SICUREZZA: 21 giorni: Melo, Pero; 20 giorni: Nocciolo, Olivo e Fagiolo secco con e senza baccello; 3 giorni: Fagiolo fresco con e senza baccello.</p> <p>ATTENZIONE: Da impiegarsi esclusivamente per gli usi e alle condizioni riportate in questa etichetta. Chi impiega il prodotto è responsabile degli eventuali danni derivanti da uso improprio del preparato. Il rispetto di tutte le indicazioni contenute nella presente etichetta è condizione essenziale per assicurare l'efficacia del trattamento e per evitare danni alle piante, alle persone ed agli animali. NON APPLICARE CON I MEZZI AEREO. PER EVITARE RISCHI PER L'UOMO E PER L'AMBIENTE SEGUIRE LE ISTRUZIONI PER L'USO. NON CONTAMINARE ALTRE COLTURE, ALIMENTI, BEVANDE E CORSI D'ACQUA.</p>
---	---

Fig. 3.3: etichetta Dentamet® (tratto da <https://www.salute.gov.it>)

3.4 Valutazione degli effetti del Dentamet®

Le olive utilizzate per i trattamenti sono state raccolte in Toscana da un uliveto non trattato. Il materiale è stato sottoposto ad una cernita allo stereomicroscopio. Le olive che presentavano punture di ovideposizione o danni meccanici sono state scartate, mentre le olive sane e ancora verdi sono state utilizzate per la sperimentazione. In una Bug Dorm sono state messe 100 olive e 10 femmine sessualmente mature di *B. oleae*. Dopo 24 ore, le olive sono state rimosse dalla gabbia e controllate allo stereo-microscopio al fine di selezionare quelle che presentavano al massimo una o due punture di ovideposizione. Tali olive sono state suddivise in tre gruppi facendo in modo che ogni gruppo presentasse all'incirca lo stesso numero di punture di ovideposizione. Dopodiché, ciascun gruppo è stato assegnato casualmente a tre trattamenti: non trattato, ipoclorito di sodio e Dentamet®. I trattamenti sono stati fatti mediante l'uso di spray: le olive messe in setacci di metallo diversi per ogni trattamento, sono state nebulizzate con i prodotti secondo le seguenti concentrazioni:

- Dentamet®: 536 ml/hl
- Ipoclorito di sodio al 5%

Per Dentamet® è stata utilizzata la concentrazione indicata in etichetta. La nebulizzazione ha continuato fino al gocciolamento dei prodotti dalle olive, garantendo così l'uniformità della bagnatura su tutta la superficie dell'esocarpo. Le drupe trattate sono poi state lasciate asciugare su un piano non assorbente e conservate a temperatura ambiente.

Con lo scopo di evidenziare una eventuale efficacia battericida del Dentamet® attraverso la valutazione della carica del batterio *Ca. Erwinia dacicola* all'interno di vari stadi di *B. oleae*, sono stati raccolti i seguenti campioni:

- Larve di prima età dopo tre giorni dall'ovideposizione
- Larve di terza età dopo nove giorni dall'ovideposizione
- Adulti neo-sfarfallati

La raccolta dei campioni è avvenuta allo stereo-microscopio, sezionando le olive con un bisturi in ambiente microbiologicamente controllato. Dopo la raccolta, il materiale è stato conservato in tubi conici di polipropilene da 1,5 ml (Eppendorf) contenenti alcol puro a 95° e conservate in cella frigo a -18°C.

3.5 Analisi molecolari

La quantificazione del batterio *Ca. Erwinia dacicola* nei campioni, è stata valutata attraverso analisi molecolari che hanno previsto una prima fase di estrazione del DNA totale di larve e adulti di *B. oleae* e una seconda fase di quantificazione del DNA del batterio simbionte attraverso la tecnica di PCR quantitativa (qPCR).

Nella fase iniziale, al fine di massimizzare la qualità e la quantità di DNA estratto dai campioni raccolti durante la sperimentazione, sono stati valutati due differenti protocolli di estrazione del DNA:

1. il protocollo descritto da Palmano *et al.*, 2000
2. il protocollo del kit Qiagen “Dneasy blood and tissue kit”

Il primo protocollo prevede la purificazione del DNA mediante la precipitazione delle proteine. Il secondo, invece, utilizza la tecnologia su membrana di silice per l'isolamento e la purificazione. Il kit Qiagen è risultato essere quello più adatto in quanto i volumi di estrazione sono maggiori e l'estratto risulta privo di inibitori della PCR.

La procedura di estrazione con il kit Qiagen ha previsto:

- Asciugatura dei campioni dall'alcol;
- Pestellamento del capo per gli adulti e dell'intera larva per i campioni di larve di prima e terza età;
- Lisi dei campioni utilizzando la proteinasi K;
- Aggiunta della soluzione tampone al fine di favorire il legame con il DNA e successivo caricamento del lisato sulla colonna spin Dneasy Mini.
- Centrifugazione: durante questo passaggio, grazie alle capacità di legame della membrana a base di silice presente nella colonna spin Dneasy Mini, il DNA viene legato selettivamente alla membrana, mentre i contaminanti passano attraverso.
- Ulteriore rimozione dei contaminanti e inibitori enzimatici rimanenti attraverso altre due fasi di lavaggio;
- Eluizione del DNA nel tampone.

L'abbondanza del simbionte è stata valutata attraverso qRT-PCR, considerando l'amplificazione del gene *recA* ottenuta con primer già validati da Livadares *et al.* (2021): *recA-F* (5'-TCTACCGGTTTCGTTATCCCTG-3') e *recA-R* (5'-AACG ATAATCACGTCAACAGCAC-3').

È stato inoltre amplificato il gene della β -actina di *B. oleae* (*Act1F* 5'-CGGTATCCACGAAACCACAT-3' e *Act1R* 5'-ATTGTTGATGGAGCCAAAGC-3') (Livadaras *et al.* 2021) al fine di normalizzare i dati sul contenuto di DNA di *Ca. Erwinia dacicola* in relazione alle dimensioni dei campioni.

3.6 Analisi dei dati

La stima dell'abbondanza del simbionte e del DNA dell'insetto è stata calcolata attraverso il metodo $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$: l'abbondanza del DNA *recA* di *Ca. Erwinia dacicola* è stata calcolata rispetto al DNA di *B. oleae* β -actina di riferimento. Il ΔCt tra il gene di riferimento (segmento della β -actina di *B. oleae*) e il gene target (segmento *recA* di *Ca. Erwinia dacicola*) è stato calcolato per ciascun campione come $\Delta Ct = Ct_{\text{gene target}} - Ct_{\text{gene di riferimento}}$. È poi stato calcolato il $\Delta\Delta Ct$ tra il ΔCt dei campioni trattati e la media di ΔCt del gruppo di controllo attraverso la formula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{trattati}} - \text{media } \Delta Ct_{\text{controllo}}$. Infine, è

stato calcolato il fold change con la formula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. I dati ottenuti sono stati poi trasformati con il logaritmo e usati come indice dell'abbondanza del simbionte rispetto al controllo.

Successivamente, per comprendere gli effetti dei diversi trattamenti sulla quantità del batterio, sono state effettuate delle analisi statistiche sui dati logaritmici ricavati. *In primis*, i dati sono stati raggruppati per stadio larvale e divisi per i diversi trattamenti. Fatto ciò, per ciascun stadio di sviluppo dell'insetto, è stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA) ad una via mediante la funzione *lm* del software Rstudio versione 4.1.2 (2021-11-01). È stato impostato come variabile indipendente il trattamento (variabile categorica con tre livelli: controllo non trattato, ipoclorito di sodio e Dentamet®), mentre come variabile dipendente è stato considerato il valore logaritmico della quantità del batterio. L'effetto della variabile indipendente è stato valutato mediante F test. Sono stati poi eseguiti dei confronti multipli mediante test di Tukey. La soglia di significatività è stata posta pari a $P=0,05$.

Per valutare l'eventuale numero minimo di repliche da utilizzare in caso di non significatività dell'ANOVA, per ciascuno stadio di sviluppo dell'insetto si è andati ad impostare una analisi di potenza statistica mediante la funzione *power.anova.test* del software Rstudio. La funzione prevede l'inserimento in input della potenza richiesta (definita come la capacità di un test di rilevare un effetto, se esistente, e comunemente posta pari a 0,8), della soglia di significatività ($P=0,05$), della varianza tra i diversi trattamenti e della varianza all'interno di ciascun trattamento (valori ricavati dall'output della tabella ANOVA). La funzione restituisce in output il numero di repliche minimo da utilizzare per ciascun trattamento, da utilizzare in caso di future prove sperimentali.

4 Risultati

4.1 Effetto dei trattamenti su *Ca. Erwinia dacicola*

4.1.1 Larve di prima età (L1)

Dalle analisi statistiche effettuate sull'abbondanza del DNA di *Ca. Erwinia dacicola* all'interno dei campioni di larve di prima età (L1), non sono emerse differenze significative tra i diversi trattamenti effettuati (Tab 4.1). La maggiore quantità di DNA del batterio ($-0.315 \log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$) è stata osservata nel trattamento con ipoclorito di sodio, mentre il trattamento in cui è stata rinvenuta la minor quantità di DNA ($-0.338 \log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$) è stato Dentamet®. Nel grafico 4.1 (A) sono riassunte le statistiche descrittive della variabile presa in considerazione nei due trattamenti per lo stadio L1.

Effetto	G.d.l.	Valore F	Pr > F
Trattamento	2	0.35	0.7078
Errore	29		
Totale corretto	31		

Tabella 4.1: Risultati dell'analisi della varianza sui valori del $\log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$ calcolati sulle larve di prima età.

Larve di terza età (L3)

Relativamente all'abbondanza del DNA di *Ca. Erwinia dacicola* all'interno dei campioni di larve di terza età (L3), i trattamenti non hanno avuto un effetto significativo sul $\log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$ (Tab 4.2). La maggiore quantità di DNA del batterio ($0.095 \log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$) è stata osservata nel trattamento con Dentamet®, mentre il trattamento in cui è stata rinvenuta la minor quantità di DNA ($-0.188 \log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$) è stato quello che ha previsto l'applicazione dell'ipoclorito di sodio. Nel grafico 4.1 (B) sono riassunte le statistiche descrittive della variabile presa in considerazione nei due trattamenti per lo stadio L1.

Effetto	G.d.l.	Valore F	Pr > F
Trattamento	2	0.51	0.61
Errore	29		
Totale corretto	31		

Tabella 4.2 Risultati dell'analisi della varianza sui valori del $\log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$ calcolati sulle larve di terza età

4.1.2 Adulti

Per quanto riguarda l'abbondanza del DNA di *Ca. Erwinia dacicola* all'interno dei campioni degli adulti (A), i trattamenti non hanno avuto un effetto significativo sul $\log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$ (Tab.4.3). La maggiore quantità di DNA del batterio ($0.118187488\log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$) è stata osservata nel trattamento con Dentamet®, mentre il trattamento in cui è stata rinvenuta la minor quantità di DNA ($0.069490755\log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$) è stato quello che ha previsto l'applicazione dell'ipoclorito di sodio. Nel grafico 4.1 (C) sono riassunte le statistiche descrittive della variabile presa in considerazione nei due trattamenti per lo stadio di adulto.

Effetto	G.d.l.	Valore F	Pr > F
Trattamento	2	0.36	0.70
Errore	29		
Totale corretto	31		

Tabella 4.3: Risultati dell'analisi della varianza sui valori del $\log (2^{-(\Delta\Delta Ct)})$ calcolati sugli adulti

4.1.3 Power analysis

L'esecuzione dell'analisi di potenza eseguita sui dati ricavati dall'analisi della varianza eseguita per le larve di prima età ha mostrato come, per raggiungere una significatività statistica ($p=0.05$), sarebbero state necessarie 14,82 repliche per trattamento (Tab. 4.4).

Gruppi	3
Varianza tra i trattamenti	0.392
Varianza entro trattamento	1.121
Livello di significatività	0.05
Potenza del test	0.8
Numero di repliche	14.82

Tabella 4.4: Risultati della power analysis sui dati dell'ANOVA eseguita per le larve di prima età.

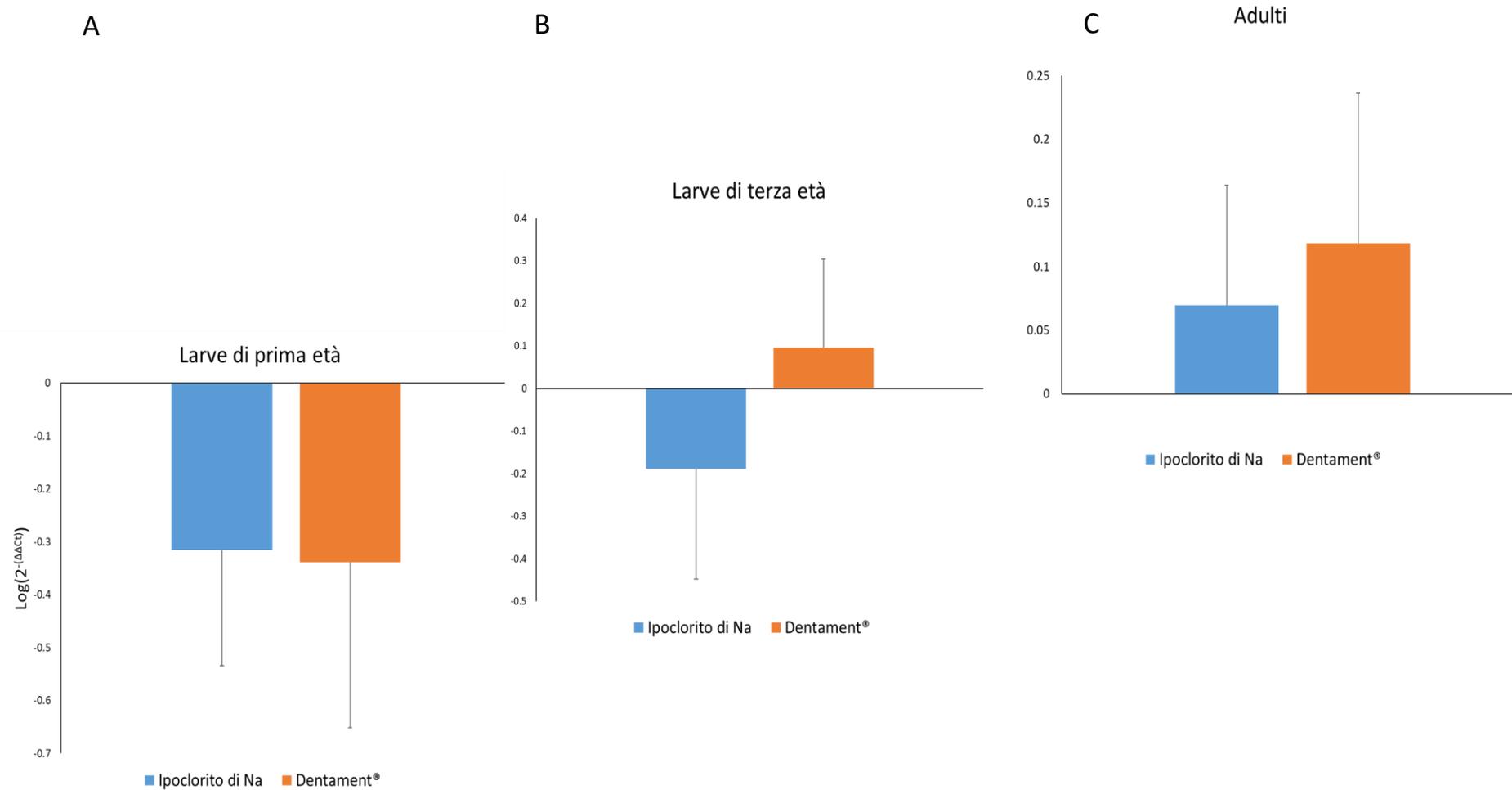


Tabella 4.5: Medie (\pm ES) dell'abbondanza di *Ca. Erwinia dacicola* risultata dalla qPCR ed espressa mediante $\log(2^{-\Delta\Delta Ct})$ divise per i due trattamenti e per i tre stadi di sviluppo dell'insetto (Grafico "A": larve di prima età; grafico "B": larve di terza età; grafico "C": Adulti). Il valore zero corrisponde alla media dell'abbondanza nella tesi "non trattato".

5 Discussione e conclusioni

B. oleae è il principale fitofago dell'olivo in quanto è causa di perdite economiche mondiali di circa 800 milioni di dollari (US\$) con una riduzione della produzione olivicola del 15% (Bueno & Jones, 2002).

Le recenti normative europee (Direttiva 2009/128/CE e Regolamento (CE) 1107/2009), che puntano a una diminuzione dell'uso di fitofarmaci in un'ottica di gestione fitoiatrica integrata e sostenibile, hanno portato ad un calo di sostanze attive (fosmet e dimetoato) (Ue 2022/94) disponibili per il controllo del tefritide. Sulla base di tali premesse, la ricerca ha aperto la possibilità di sfruttare il controllo simbiotico per diminuire le popolazioni di *B. oleae*.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare in laboratorio se l'applicazione di antimicrobici, ed in particolare del Dentamet®, mediante trattamento spray su olive artificialmente infestate può avere degli effetti nella riduzione della carica batterica del simbionte *Ca. E. dacicola* nelle successive larve e adulti nella prospettiva di un controllo simbiotico del dittero.

Le quantificazioni delle cariche batteriche del simbionte, ricavate mediante qPCR, su larve neonate, larve mature e adulti, non hanno evidenziato, all'analisi statistica, differenze significative rispetto ai rispettivi controlli (Tab. 4.1, 4.2, 4.3). Tuttavia, si osserva una tendenza alla significatività rispetto al controllo (vs Ipoclorito di sodio: $t_{2,29}=-0.89$, $p=0.38$; vs Dentamet®: $t_{2,29}=-1.11$, $p=0.28$) nella riduzione della carica batterica delle larve neonate (L1) sia derivate da olive trattate con ipoclorito di Na, sia in quelle derivate da olive trattate con Dentamet®. La tendenza alla diminuzione del simbionte nello stadio L1 è evidenziata dai risultati ottenuti mediante la Power Analysis la quale suggerisce che la significatività potrebbe essere raggiunta aumentando il numero di replicazioni per ciascuna tesi ($n=15$). Come ci si attendeva, la riduzione della carica batterica del simbionte è risultata più evidente nelle larve neonate. La tendenza all'aumento di tale carica nelle larve mature e ancora di più nell'adulto, evidenzia come le sostanze antimicrobiche testate, le dosi impiegate o la tecnica di applicazione dei prodotti adottate, abbiano causato un evidente disturbo alla trasmissione verticale, ma non siano state sufficienti ad interrompere completamente la simbiosi.

In prospettiva ai fini di un perfezionamento della tecnica, si dovranno approfondire i seguenti aspetti:

- Momento migliore per l'applicazione del prodotto: l'efficacia del prodotto antimicrobico si basa oltre che sulle caratteristiche del prodotto, sulla possibilità che questo entri attraverso il foro della ferita di ovideposizione e raggiunga l'uovo deposto appena sotto all'epicarpo. In questo lavoro l'applicazione di prodotti è avvenuta a circa 24 h dalle deposizioni ma non è nota l'evoluzione della ferita sull'oliva e se questa possa nel tempo favorire o meno l'ingresso del prodotto attraverso un suo allargamento o al contrario restringimento.
- Aggiunta di coadiuvanti che possano aumentare la capacità di penetrare per capillarità del prodotto

- Dose impiegata nel presente lavoro è stata usata la dose di etichetta di Dentamet suggerita per un suo impiego come fertilizzante fogliare biostimolante. Sarà quindi necessario testare il prodotto a dosi diverse nell'ottica di un suo impiego in qualità di antimicrobico.
- Prodotti ad attività antimicrobica: nel presente lavoro è stato testato il prodotto Dentamet® (fertilizzante approvato in agricoltura biologica e registrato su olivo) in quanto la sua attività antimicrobica è già stata dimostrata nel controllo simbiotico di *Halyomorpha halys* (cimice asiatica) (Gonella *et al.*, 2019) e in *B. oleae* mediante il dipping di frutti infestati nel prodotto (Perin *et al.*, in corso di pubblicazione). Altri prodotti, come i vari polifenoli contenuti nelle acque di vegetazione potranno essere testati nell'ottica di una loro valorizzazione e della circolarità in olivicoltura.

Sorprendono i valori di quantificazione del simbionte emersi nel bulbo esofageo degli adulti derivati da olive trattate (sia ipoclorito di sodio che Dentamet®) che sono risultati superiori a quelli emersi negli adulti di controllo. Come spiegazione di questo fenomeno si possono formulare varie ipotesi, tra le quali la più probabile potrebbe essere legata alle dinamiche di accrescimento della popolazione del simbionte all'interno del bulbo esofageo. È noto dalla letteratura che nel bulbo esofageo il simbionte nella fase successiva allo sfarfallamento si moltiplica tumultuosamente sino ad occupare tutto il volume disponibile (Capuzzo *et al.*, 2005). Le curve di accrescimento di una popolazione batterica free living prevedono una fase di crescita esponenziale, una fase stazionaria e una successiva fase di declino (Biavati *et al.*, 2012) che ovviamente nel caso di un battere simbionte nell'insetto sano non esiste. Nel caso specifico si deve immaginare che nell'adulto neosfarfallato derivato da trattamento con antimicrobici la velocità di crescita iniziale sia maggiore che nell'insetto di controllo. Nel primo caso l'insetto potrebbe favorire in modo accentuato la moltiplicazione delle poche cellule batteriche ereditate (ad esempio mediante la produzione di nutrienti) in maniera tale che al momento dell'analisi la popolazione batterica abbia raggiunto e superato quella presente nell'insetto non trattato. Quest'ultimo avendo già a disposizione il contingente di simbionte necessario non avrebbe nessun interesse di accelerarne la moltiplicazione quanto nell'insetto con una popolazione batterica non congeniale. Sarà interessante approfondire questi aspetti e valutare la fitness di adulti ottenuti da frutti trattati con antimicrobici rispetto al non trattato. Rimangono inoltre da approfondire gli effetti dei trattamenti antimicrobici sui cambiamenti della comunità batterica all'interno del fitofago.

6 Bibliografia

- Akami, M., Andongma, A. A., Zhengzhong, C., Nan, J., Khaeso, K., Jurkevitch, E., Niu, C. Y., & Yuval, B. (2019). Intestinal bacteria modulate the foraging behavior of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE*, *14*(1), 1–17.
- Ali, E. (2016). Effectiveness of Particle Film Technology and Copper Products in the Control of Olive Fruit Fly. *Journal of Plant Protection and Pathology*, *7*(7), 439–444.
- Bagnoli, B., & Iannotta, N. (2012). Accademia Nazionale dell’Olivo e dell’Olio Spoleto. *XIV*, 27.
- Bateman, M. A. (1972). The Ecology of Fruit Flies. *Annual Review of Entomology*, *17*(1), 493–518.
- Belcari, P., Sacchetti, M.C. Rosi, R. Del Pianta The use of copper products to control the olive fly (*Bactrocera oleae*) in central Italy. Integrated Protection of Olive Crops IOBC/wprs Bull. 28(9), 2005 pp. 45-48
- Benelli, G., Canale, A., Bonsignori, G., Ragni, G., Stefanini, C., & Raspi, A. (2012). Male Wing Vibration in the Mating Behavior of the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior*, *25*(6), 590–603.
- Benelli G., Canale A. (2016) Aggressive behavior in olive fruit fly females: oviposition site guarding against parasitic wasps. *Journal of Insect Behavior*, *29*(6): 680-688
- Ben-Yosef, M., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., & Yuval, B. (2014). Symbiotic bacteria enable olive flies (*Bactrocera oleae*) to exploit intractable sources of nitrogen. *Journal of Evolutionary Biology*, *27*(12), 2695–2705.
- 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).
- Bigiotti, G., Sacchetti, P., Pastorelli, R., Lauzon, C. R., & Belcari, A. (2021). Bacterial symbiosis in *Bactrocera oleae*, an Achilles’ heel for its pest control. *Insect Science*, *28*(4), 874–884.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12835>
- Bourtzis, K., & Miller, A. T. (n.d.).
Insect_Symbiosis_Kostas_Bourtzis_Thomas_A_Miller_Taylor_&Franci.pdf.

- Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience Publishers, Inc. New York
- Bueno, A. M. *et al.* "Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals." (2002).
- Calabrese, P., & Sciarretta, A. (2019). Evaluation of attractant devices for the monitoring of Olive Fruit Fly with particular reference to colour, size and selectivity toward natural enemies. June.
- Caleca, V., Belcari, A., & Sacchetti, P. (2012). *Lotta alla mosca delle olive in olivicoltura integrata e biologica. 1968*, 27–33.
- 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.
- Cristofaro, A. De, Rotundo, G., Germinara, G. S., & Tenaglia, F. (1995). Controllo della Mosca delle olive con prodotti di origine vegetale. 1–51.
- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology*, 55(January 2014), 151–169.
- Della A., N. A. (2016). Recenti acquisizioni per il controllo sostenibile di *Bactrocera oleae*.
- Di, L. T. (2019). Linee tecniche di difesa integrata. *Regione Del Veneto*, 9(21 febbraio), 185–186.
- Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009
- Fletcher, B. S. 1987. The Biology of Dacine Fruit Flies. *Ann. Rev. Entomol* 32:115-144.
- Franz, J. M. (1973). Monitoring the Health Status of Pest Populations as a Contribution towards the Establishment of Economic Thresholds. *EPPO Bulletin*, 3(3), 85–87.
- Genç, H., & Nation, J. L. (2008). Survival and development of *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera:Tephritidae) immature stages at four temperatures in the laboratory. *African Journal of Biotechnology*, 7(14), 2495–2500.
- Girolami, V. 1973. Reperti morfo-istologici sulle batteriosimbiosi del *Dacus oleae* Gmelin e di altri ditteri tripetidi, in natura e negli allevamenti su substrati artificiali. *Redia* 54: 269–294

- 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*. *Entomologia Generalis*, 39(3–4), 231–238.
- Hagen, K. S. (1966). Dependence of the olive fly, *Dacus oleae*, larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. *Nature* 209, 423–424.
- Hagen, K. S. & Tassan, R. L. (1972). Exploring nutritional roles of extracellular symbiotes on the reproduction of honeydew feeding adult chrysopids and tephritids. In *Insect and Mite Nutrition: Significance and Implications in Ecology and Pest Management*, pp. 323–351. Edited by J. G. Rodriguez. Amsterdam: North-Holland
- Haniotakis, G. E. (2005). Olive pest control: Present status and prospects. *IOBC/WPRS Bulletin*, 28(9), 1–9.
- Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2020). Relevance of microbial symbiosis to insect behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.004>
- Iannotta, N., Noce, M. E., Ripa, V., Scalercio, S., & Vizzarri, V. (2007). Assessment of susceptibility of olive cultivars to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thüm.) Zachos & Tzav. -Klon. attacks in Calabria (Southern Italy). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42(7), 789–793.
- Kumar, N. (2015). Applied Entomology and Zoology. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 59(4), 201–201.
- 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 and Technology*, 44(2), 226–242.
- Marchini, D., Petacchi, R., & Marchi, S. (2017). *Bactrocera oleae* reproductive biology: new evidence on wintering wild populations in olive groves of Tuscany (Italy). *Bulletin of Insectology*, 70(1), 121–128.
- Martinez-Sañudo, I. (2009). Phylogenetic studies of tephritid flies (Diptera, Tephritidae) and their symbiotic bacteria. *February*, 1–111.
- Mazzon, L., Piscedda, A., Simonato, M., Martinez-Sañudo, I., Squartini, A., & Girolami, V. (2008). Presence of specific symbiotic bacteria in flies of the subfamily Tephritinae (Diptera Tephritidae)

- and their phylogenetic relationships: Proposal of “*Candidatus Stammerula tephritidis*.”
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(6), 1277–1287.
- Mucci, M., Baldessari, M., Michelotti, F., Chiesa, S. G., & Angeli, G. (2019). Captures of olive fruit fly in Alto Garda Trentino with different traps. *IOBC-WPRS Bulletin*, 141, 147–152.
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K., & Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14(9), 2729–2738.
- O’dell, B. L., Woods, W. D., Laerdal, O. A., Jeffay, A. M., & Savage, J. E. (1960). Distribution of the major nitrogenous compounds and amino acids in chicken urine. *Poultry Science*, 39(2), 426–432.
- Palmano, S. (2001). A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(2), 99–107.
- Perin *et al* (2019). (n.d.). Impairing the development of the olive fly pest targeting its obligate bacterial partner in egg-infested fruits
- Petri, L. 1909. Ricerche sopra i batteri intestinali della mosca olearia. Memorie della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma (In Italian). 1–130
- Regolamento (CE) n. 1107/2009 del parlamento europeo e del consiglio del 21 ottobre 2009 relativo all’immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE
- Regolamento di esecuzione (UE) 2022/94 della commissione del 24 gennaio 2022
- Ricci, I., Valzano, M., Ulissi, U., Epis, S., Cappelli, A., & Favia, G. (2012). Symbiotic control of mosquito borne disease. *Pathogens and Global Health*, 106(7), 380–385.
- Rice, R. E., Phillips, P. A., Stewart-Leslie, J., & Sibbett, G. S. (2003). Olive fruit fly populations measured in Central and Southern California. *California Agriculture*, 57(4), 122–127.
- Rizzo, R., Caleca, V., & Lombardo, A. (2012). Relation of fruit color, elongation, hardness, and volume to the infestation of olive cultivars by the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 145(1), 15–22.

- Sacchetti, P., Liscia, A. M., Pastorelli, R., Bigiotti, G., Guidi, R., & Belcari, A. (2016). Le simbiosi batteriche nella mosca delle olive, *Bactrocera oleae*: dalla ricerca di base allo sviluppo di nuove strategie di controllo. *Atti Accademia Nazionale Italiana Di Entomologia, Anno LXIV*, 93–98.
- Saour, G., & Makee, H. (2004). A kaolin-based particle film for suppression of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* Gmelin (Dip., Tephritidae) in olive groves. *Journal of Applied Entomology*, 128(1), 28–31.
- 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.
- Solinas, Mario, M. Reborá, and A. De Cristofaro. "Functional morphology of *Bactrocera oleae* Gmel. (Diptera: Tephritidae) tarsal chemosensilla involved in interactions with the hostplant." *Entomologica* 35 (2001): 103-123.
- Stayman, B., Jonathan, G., Beauty, R., Red, S., Winesap, S., Davis, B., Davis, K., & Clargeau, B. (2021). *Dentamet sym.*
- Tremblay E. (2005) *Entomologia applicata*, Liguori Editore, vol. 3, parte seconda, 2a edizione, pp. 133, 135, 136, 145.
- Tsahar, E., Martínez del Rio, C., Izhaki, I., & Arad, Z. (2005). Can birds be ammonotelic Nitrogen balance and excretion in two frugivores. *Journal of Experimental Biology*, 208(6), 1025–1034.
- Vossen, P., & Devarenne, A. (2012). Olive fruit fly. *University of California Cooperative Extension - Somoma County. (February 2016), IIJohnson(1)*, 1–18.

7 Sitografia

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

<https://www.corteva.it/prodotti-e-soluzioni/crop-protection/insetticidi/spintor-fly.html>

<https://www.salute.gov.it>

https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards/pp1_list

<https://olivoelio.edagricole.it/agrofarmaci-difesa/lotta-a-mosca-delle-olive-dopo-lo-stop-a-dimetoato-e-fosmet/>