

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PREMESSA

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

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

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

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

EFFETTO DI DIETE PROBIOTICHE SULLA FITNESS DEGLI ADULTI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

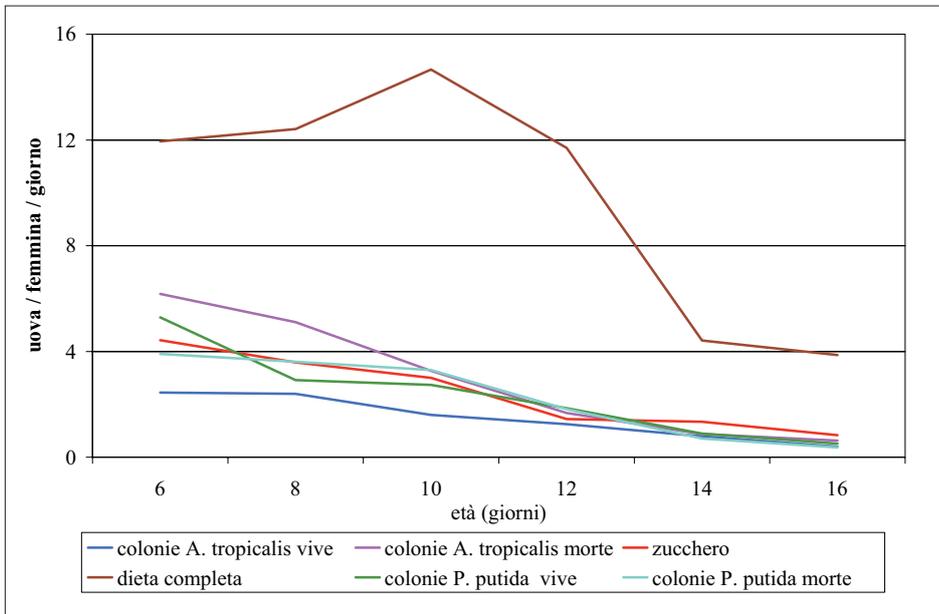
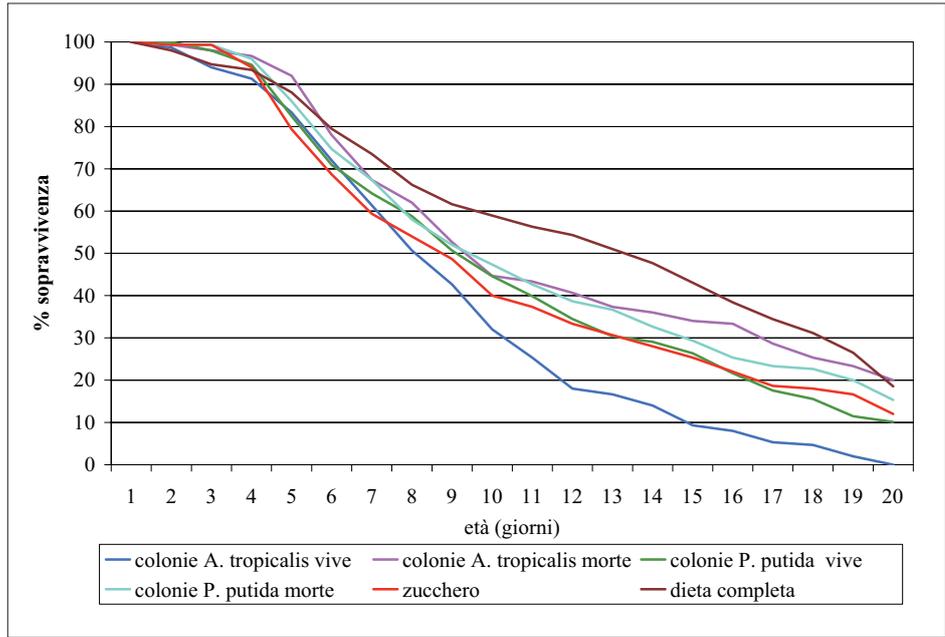
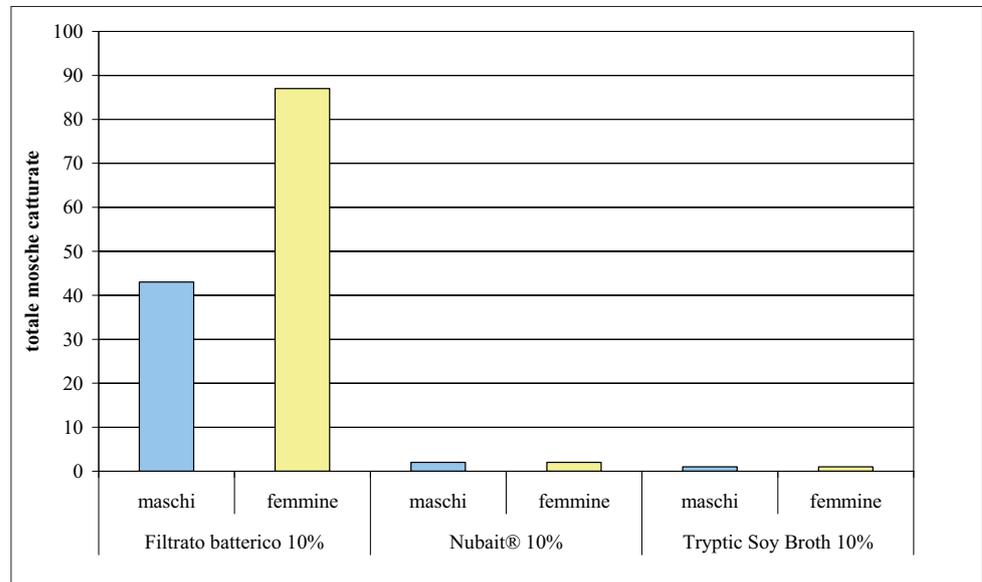


Fig. 2 – Effetto sulla fecondità di *B. oleae* di diete addizionate di probiotici a base di colonie di *A. tropicalis* o *P. putida* vive o uccise col calore, in confronto a solo zucchero e dieta completa.

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



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

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

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

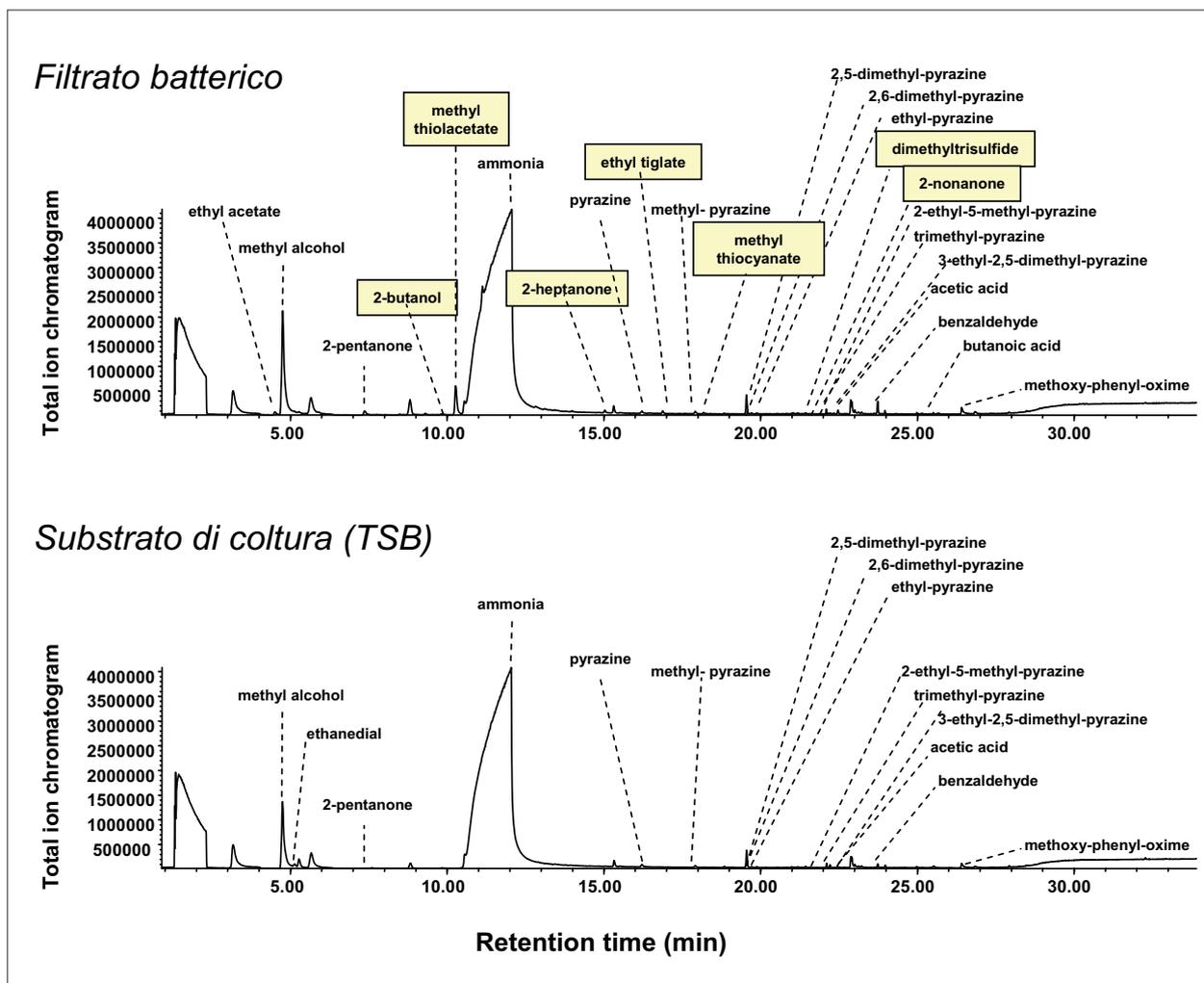


Fig. 4 – Cromatogrammi delle sostanze volatili identificate nello spazio di testa del filtrato di *P. putida* e del substrato di crescita (TSB). Sono evidenziati i composti derivanti dal metabolismo batterico.

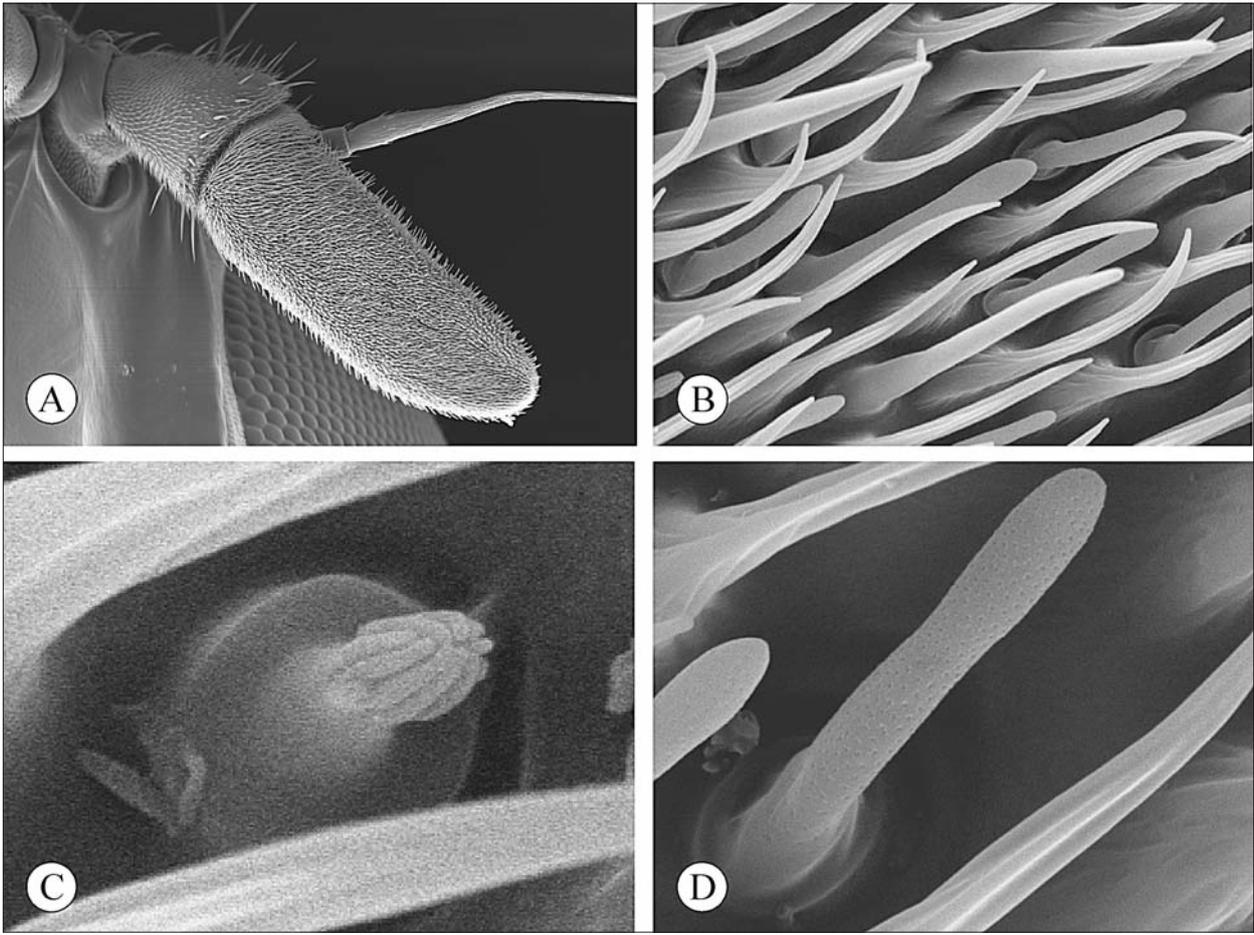


Fig. 5

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

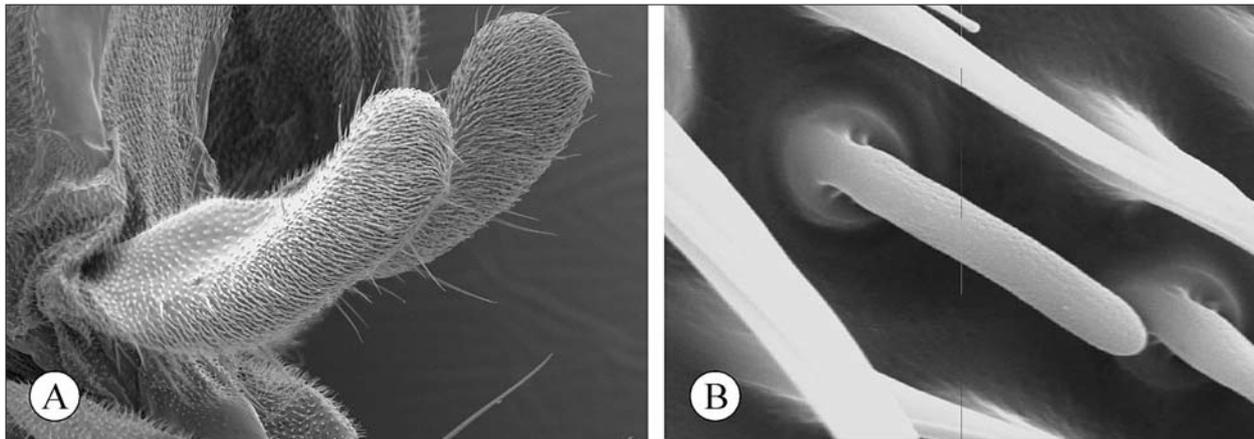


Fig. 6 - Foto al microscopio elettronico a scansione dei palpi di *B. oleae*: palpi in toto (A) e sensillo basiconico multiporo (B).

CONCLUSIONI

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

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

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

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

RIASSUNTO

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

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

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

BIBLIOGRAFIA

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

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